## UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

## JOSÉ AFONSO RIBEIRO RAMOS FILHO

Panfotocoagulação *versus* panfotocoagulação associada com ranibizumabe intravítreo para retinopatia diabética proliferativa com características de alto risco

> RIBEIRÃO PRETO 2014

## JOSÉ AFONSO RIBEIRO RAMOS FILHO

# Panfotocoagulação *versus* panfotocoagulação associada com ranibizumabe intravítreo para retinopatia diabética proliferativa com características de alto risco

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências Médicas.

**Área de Concentração:** Mecanismos Fisiopatológicos nos Sistemas Visual e Audio-Vestibular.

### Orientador: Prof. Dr. André Márcio Vieira Messias

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

## FICHA CATALOGRÁFICA

Ramos Filho, José Afonso Ribeiro

Panfotocoagulação *versus* panfotocoagulação associada com ranibizumabe intravítreo para retinopatia diabética proliferativa com características de alto risco. José Afonso Ribeiro Ramos Filho. Ribeirão Preto, 2014.

110p.: 20il.; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de Concentração: Mecanismos Fisiopatológicos nos Sistemas Visual e Audio-Vestibular.

Orientador: Messias, André Márcio Vieira

1. Angiogênese; 2. Tratamento a laser; 3. Diabetes; 4. Fator de crescimento endotelial vascular; 5. Eletrorretinograma.

### FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: José Afonso Ribeiro Ramos Filho

**Título:** Panfotocoagulação *versus* panfotocoagulação associada com ranibizumabe intravítreo para retinopatia diabética proliferativa com características de alto risco.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências Médicas.

**Área de Concentração:** Mecanismos Fisiopatológicos nos Sistemas Visual e Audio-Vestibular.

Aprovado em:

### Banca Examinadora

Prof. Dr Julgamento:	Instituição: Assinatura	
Prof. Dr Julgamento:	Instituição: Assinatura	
Prof. Dr. Julgamento:	Instituição: Assinatura	
Prof. Dr Julgamento:	Instituição: Assinatura	
Prof. Dr. Julgamento:	Instituição: Assinatura	

Dedicatória

Aos meus pais, irmãs, sobrinhos e esposa.

### Agradecimentos

Ao Professor Dr. André Márcio Vieira Messias, pela orientação, paciência, compartilhamento de seus conhecimentos e empenho no desenvolvimento deste estudo.

Ao Professor Dr. Rodrigo Jorge pela confiança, oportunidade e pelo incentivo à pesquisa.

A todos os Professores que colaboraram com esta pesquisa e aos que ministraram disciplinas na Pós-Graduação pela sua competência.

Aos amigos e colegas Bianka Yukari Yamassato, Rodrigo Sanches Oliveira, Felipe Piacentini Paes de Almeida, pela colaboração nesta pesquisa.

Aos amigos do Departamento de Oftalmologia: Cecília, Eliane, Rita, Rogério e Edson.

Aos pacientes, que acreditaram e confiaram a mim a responsabilidade por seu tratamento, possibilitando a realização deste estudo.

À minha família que sempre esteve ao meu lado, sendo responsável pela minha educação, formação de meu caráter e da pessoa que sou hoje.

À Cassia, minha esposa, pela compreensão e pelo apoio incondicional não só neste estudo, mas no convívio diário.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realização da pós-graduação.

À CAPES e FAEPA-HCFMRP-USP, pelo auxílio financeiro concedido para a realização desta pesquisa.

# Epígrafe

"Ama-se mais o que se conquista com esforço."

Benjamin Disraeli

Resumo

RAMOS FILHO, J.A.R. **Panfotocoagulação** versus panfotocoagulação associada com ranibizumabe intravítreo para retinopatia diabética proliferativa com características de alto risco. 110f. Tese (Doutorado) -Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2013.

Objetivo: Avaliar os efeitos da panfotocoagulação a laser (PRP) comparando com a PRP associada com injeção de 0,5 mg de ranibizumabe intravítreo (IVR) em pacientes com retinopatia diabética proliferativa (RDP) com características de alto risco. Métodos: Estudo prospectivo incluindo pacientes portadores de RDP de alto risco sem tratamento prévio, distribuídos aleatoriamente em dois grupos: grupo PRP e grupo PRPplus. Avaliações oftalmológicas padronizadas, incluindo melhor acuidade visual corrigida (MAVC), de acordo com o Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS), medidas da área de vazamento de fluoresceína na angiofluoresceinografia (FLA), medida da espessura do subcampo macular (ESM) na Tomografia de Coerência Óptica (OCT) foram realizadas na visita inicial e nas semanas 16 (±2), 32 (±2) e 48 (±2), além de eletrorretinograma (ERG) de campo total, realizado na visita inicial e na semana 48 (±2). Resultados: Vinte e nove de 40 pacientes (n=29) completaram as 48 semanas do estudo. Na visita inicial, a média ± erro-padrão da média (EPM) de FLA (mm<sup>2</sup>) foi de 9,0  $\pm$  1,3 e 11,7  $\pm$  1,3 (p=0,1502); MAVC (logMAR), 0,31  $\pm$  0,05  $e 0,27 \pm 0,06$  (p=0,6645) e ESM (µm), 216,3  $\pm 10,7$   $e 249,4 \pm 36,1$  (p=0,3925), nos grupos PRP e PRPplus, respectivamente. Foi notada significativa (p<0,05) redução na FLA em todas as visitas do estudo em ambos os grupos; porém significativamente maior no grupo PRPplus, em relação ao grupo PRP, no final da visita 48 (PRP =  $2.9 \pm 1.3 \text{ mm}^2$ ; PRPplus =  $5.8 \pm 1.3 \text{ mm}^2$ ; p = 0.0291). Observouse piora na MAVC em todas as visitas após o tratamento no grupo PRP (p<0,05), enquanto que no grupo PRPplus não foram encontradas mudanças na MAVC. Aumento significativo na ESM foi observado em todas as avaliações do estudo no grupo PRP e significativa diminuição na ESM foi detectada na semana 16 do grupo PRPplus, e não foi encontrada diferença significativa, em relação à visita inicial, nas semanas 32 e 48. Quanto ao ERG, foi notada significativa diminuição na amplitude da onda-b dos bastonetes para 46  $\pm$  5% (p<0,05) do valor da visita inicial no grupo PRP e para 64 ± 6% no grupo PRPplus. Essa regressão foi significativamente maior no grupo PRP do que no grupo PRPplus (p=0,024). Resultados similares foram observados para resposta máxima combinada (MC) da amplitude da onda-b, com redução na semana 48, comparada com a visita inicial, de 45 ± 4% no grupo PRP e 62 ± 5% no grupo PRPplus. A diminuição deste parâmetro foi significativamente maior no grupo PRP do que no grupo PRPplus (p=0,0094). A MC da amplitude da onda-a, os potenciais oscilatórios (PO) e a resposta ao flicker de 30 Hz mostraram redução estatisticamente significativa na análise intragrupos, mas sem diferenças na análise entre os grupos. Conclusão: Após a PRP foi associado IVR com maior redução na FLA na semana 48, comparado com PRP isoladamente, em olhos com RDP de alto risco. sendo que o uso adicional de IVR à PRP parece proteger contra discreta perda de acuidade visual e espessamento macular observado em olhos tratados com PRP isoladamente. Na análise do ERG, resultados sugerem que o tratamento de RDP de alto risco com PRP associado com IVR é efetivo para o controle da RDP e permite menor uso do laser, que, consequentemente, leva à perda funcional menor da retina do que o tratamento com PRP isoladamente.

**Palavras-chave:** Angiogênese; Diabetes; Tratamento a laser; Fator de crescimento endotelial vascular; Eletrorretinograma.

Abstract

RAMOS-FILHO, J.A.R. Panretinal photocoagulation versus panretinal photocoagulation plus intravitreal ranibizumabe for high-risc proliferative diabetic retinopathy. 110f. Thesis (Doctoral) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2014.

**Objective:** To evaluate the effects of panretinal photocoagulation (PRP) compared with PRP plus intravitreal injection of 0.5 mg of ranibizumab (IVR) in patients with high-risk proliferative diabetic retinopathy (PDR). Methods: Prospective study included patients with high-risk PDR and no prior laser treatment randomly assigned to receive PRP (PRP group) or PRP plus IVR (PRPplus group). Standardized ophthalmic evaluations including best-corrected visual acuity (BCVA) measured according to the methods used in the Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS), fluorescein angiography to measure area of fluorescein leakage (FLA) and optical coherence tomography (OCT) for the assessment of central subfield macular thickness (CSMT), were performed at baseline and at weeks 16  $(\pm 2)$ , 32  $(\pm 2)$  and 48  $(\pm 2)$ . Eletroretinographic (ERG) was measured according to ISCEV standards at baseline and at week 48 ( $\pm 2$ ). **Results:** Twenty-nine of 40 patients (n = 29 eyes) completed the 48-week study follow-up period. At baseline, mean  $\pm$  SE FLA (mm<sup>2</sup>) was 9.0  $\pm$  1.3 and 11.7  $\pm$  1.3 (p = 0.1502); BCVA (logMAR) was 0.31  $\pm$  0.05 and  $0.27 \pm 0.06$  (p = 0.6645); and CSMT (µm) was 216.3 ± 10.7 and 249.4 ± 36.1 (p = 0.3925), in the PRP and PRPplus groups, respectively. There was a significant (p < 0.05) FLA reduction at all study visits in both groups, with the reduction observed in the PRPplus group significantly larger than that in the PRP group at week 48  $(PRP = 2.9 \pm 1.3 \text{ mm}^2; PRPplus = 5.8 \pm 1.3 \text{ mm}^2; p = 0.0291)$ . Best-corrected visual acuity worsening was observed at 16, 32 and 48 weeks after treatment in the PRP group (p < 0.05), while no significant BCVA changes were observed in the PRPplus group. A significant CSMT increase was observed in the PRP group at all study visits, while a significant decrease in CSMT was observed in the PRPplus group at week 16, and no significant difference in CSMT from base-line was observed at weeks 32 and 48. ROD b-wave amplitude was significantly reduced to 46 ± 5 % (p<0.05) of baseline in the PRP group and 64±6% (p<0.05) in the PRPplus group. This reduction was significantly larger in the PRP group than in the PRPplus group (p=0.024). Similar results were observed for the darkadapted Combined Response (CR) b-wave amplitude, with a reduction at 48 weeks compared to baseline of  $45 \pm 4$  % in the PRP group and  $62 \pm 5$  % in the PRPplus group; the reduction in CR b-wave amplitude was significantly larger in the PRP group than in the PRPplus group (p=0.0094). CR a-wave, oscillatory potentials, cone single flash, and 30 Hz flicker responses showed statistically significant within-group reductions, but no differences in between-group analyses. Conclusions: Intravitreal ranibizumab after PRP was associated with a larger reduction in FLA at week 48 compared with PRP alone in eyes with high-risk PDR, and the adjunctive use of IVR appears to protect against the modest visual acuity loss and macular swelling observed in eyes treated with PRP alone. In ERG analyses, the results suggest that treating high-risk PDR with PRP plus IVR is effective for PDR control, and permits the use of less extensive PRP which, in turn, induces less retinal functional loss, than treatment with PRP alone.

**Key words:** Angiogenesis; Diabetes; Laser Treatment; Vascular endothelial growth factor; Electroretinography.

Lista de Figuras

Figura 1:	Fotografia colorida do fundo de olho23
Figura 2:	Esquema ilustrando os tipos celulares componentes da retina. (Adaptado de KOLB, 1995)24
Figura 3:	Corte histológico da retina mostrando suas 10 camadas. (Adaptado de VAUGHAN, 2002)25
Figura 4:	Esquema de um fotorreceptor (bastonete) mostrando os discos de membranas no segmento externo, e a cascata de fototransdução
Figura 5:	<ul> <li>(A) Esquema mostrando as correntes extracelulares geradas após estimulação luminosa da retina. (Adaptado de Almeida, 2012)</li></ul>
Figura 6:	Típica resposta elétrica medida no ERG de campo total. (Adaptado de Almeida, 2012)
Figura 7:	Fotografia padrão 10 A. (Adaptado de ETDRS, 1991b)
Figura 8:	Fluxograma ilustrando o plano de trabalho para cada paciente57
Figura 9:	Eletrodo DTL posicionado no olho de voluntário59
Figura 10:	Exemplos de formas de ondas das respostas elétricas registradas no protocolo padrão internacional de eletrofisiologia da visão (ISCEV). (Adaptado de Marmor; Zrenner, 1998)60
Figura 11:	Distribuição das diferenças intraindividuais da área total (mm <sup>2</sup> ) de vazamento de fluoresceína de neovasos ativos entre os valores medidos na visita inicial e nas semanas 16, 32 e 48 após o tratamento
Figura 12:	Distribuição das diferenças intraindividuais da Melhor Acuidade Visual Corrigida (MAVC) em logMAR entre os valores medidos na visita inicial e nas semanas 16, 32 e 48 após o tratamento69
Figura 13:	Distribuição das diferenças intraindividuais (Visita inicial e nas semanas 16, 32 e 48 após o tratamento). Espessura do subcampo macular no OCT(µm)70
Figura 14:	Respostas do ERG adaptado ao escuro na visita inicial. Média e intervalo de confiança de 95% das repostas dos grupos: controle (verde), PRP (vermelho), PRPplus (azul). Em A, B e C evidenciando parâmetros Vmax e K. A partir de D até H, estão representados: amplitude da onda b, tempo implícito da onda b,

- **Figura 18:** Efeitos do tratamento no ERG adaptado ao escuro. Exemplos de um paciente do grupo PRP (vermelho) e um do grupo PRPplus (azul). Linhas pontilhadas mostram respostas na visita inicial e linhas contínuas as respostas nas semanas 48 para os estímulos: ROD: 0,01 cd.s/m<sup>2</sup>, CR: 3,0 cd.s/m<sup>2</sup>, AI: 10,0 cd.s/m<sup>2</sup> .....78

- Figura 21: Efeitos do tratamento no ERG adaptado ao claro. (A) 30 Hz amplitude; (B) amplitude da onda-b; (C) 30 Hz tempo implícito;
  (D) tempo implícito da onda-b. Círculos e linhas em vermelho mostram respostas do grupo PRP e em azul do grupo PRPplus......82

Lista de Tabelas

Tabela 1:	Características demográficas dos grupos	. 67
Tabela 2:	Média das diferenças intraindividuais (valores encontrados após o tratamento menos a visita inicial) para FLA área, MAVC, ESM em ambos os grupos e em todas as visitas do estudo. A coluna da direita mostra os valores do p para análise das comparações entre os grupos usando Wilcoxon <i>rank-sum test</i>	. 71
Tabela 3:	Características demográficas da subamostra do ERG	. 72
Tabela 4:	Respostas do ERG adaptado ao escuro na visita inicial. Média $\pm$ EPM das amplitudes e tempo implícito das respostas de bastonetes (0,01 cd.s/m <sup>2</sup> ), máxima combinada (3,0 cd.s/m <sup>2</sup> ) e alta intensidade (10,0 cd.s/m <sup>2</sup> ).	. 73
Tabela 5:	Respostas do ERG adaptado ao claro na visita inicial. Média ± EPM das amplitudes e tempos implícitos em 30Hz, Cone ERG (amplitude da onda-b), 30 Hz tempo implícito, <i>flash</i> simples dos cones (tempo implícito da onda-b).	. 76
Tabela 6:	Média $\pm$ EPM da relação intraindividual da visita inicial da amplitude das ondas-a e b e potenciais oscilatórios (PO) e da relação intraindividual da visita inicial dos tempos implícitos para a resposta do ERG adaptado ao escuro. (ROD: 0.01 cd.s/m <sup>2</sup> , CR: 3.0 cd.s/m <sup>2</sup> , e Resposta AI: 10.0 cd.s/m <sup>2</sup> )	. 77
Tabela 7:	Média $\pm$ EPM da relação da visita inicial das amplitudes e tempos implícitos das respostas do ERG adaptado ao claro. (Estímulos = 30Hz: 3,0 cd.s/m <sup>2</sup> a 30 Hz e resposta bastonetes: 3,0 cd.s/m <sup>2</sup> ).	. 80

Lista de Símbolos e Abreviaturas

AGF-	Angiofluoresceinografia
Al-	Alta intensidade
ANVISA-	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AV-	Acuidade visual
Ca-	Cálcio
СНО-	Chinese hamster ovary
DCCT-	Diabetes Control and Complications Trial
DM-	Diabetes melitus
DMRI-	Degeneração macular relacionada à idade
DRCR-	Diabetic Retinopathy Clinical Research
DRCRnet-	Retinopathy Clinical Research Network
DRS-	Diabetic Retinopathy Study Research Group
EDF-	Pigment Epithelial Derived Factor
EM-	Edema macular
EMC-	espessura macular central
EMD-	Edema macular diabético
EPM-	Erro-padrão da média
EPR-	Epitélio pigmentado
ERG-	Eletrorretinograma
ETDRS-	Early Treatment Diabetic Retinopathy Study
FDA-	Food and Drug Administration
FGF2-	Basic Fibroblast Growth Factor
FLA área-	Angiofluoresceinografia fluorescente
HbA <sub>1c</sub> -	Hemoglobina glicosilada

HCFMRP-USP-	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo	
ICAM 1-	Intracellular Adhesion Molecule	
lgG1-	Imunoglobulina	
IRMA-	Anormalidades microvasculares intrarretinianas	
ISCEV-	International Society for Electrophysiology of Vision	
MARINA-	Minimally classic CNV ou occult CNV lesions em DMRI neovascular	
MAVC-	Acuidade Visual Corrigida	
NP-	Neuropilinas	
NRP	Neovascularização retiniana persisitente	
NVD-	Neovasos de disco	
NVE-	Neovasos extradiscais	
ост-	Tomografia de coerência óptica	
PEDF-	Pigment epithelial derived fator	
PIGF-	Fator de crescimento placentário	
PIO-	Pressão intraocular	
PO-	Potenciais oscilatórios	
PRP-	Panfotocoagulação	
RC-	Resposta máxima combinada	
RD-	Retinopatia diabética	
RDP-	Retinopatia diabética proliferativa	
ROD-	Baixa intensidade luminosa	
UKPDS-	UK Prospective Diabetes Study	
V.I.S.I.O.N	VEGF Inhibition Study in Ocular Neovascularization	
VEGF-	Fator de crescimento vascular endotelial (do inglês vascular endothelial growth factor)	

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1. Anatomia retiniana	23
1.2. Eletrorretinografia	27
1.3. Retinopatia Diabética	30
1.3.1. Épidemiologia	31
1.3.2 Fisiopatologia	32
1.3.3. Achados oftalmológicos e a classificação da retinopatia diabética	34
1.4. Eletrorretinografia em retinopatia diabética	37
1.4.1. Efeito da panfotocoagulação e o ERG	38
1.5. Tratamento da retinopatia diabética proliferativa	39
1.5.1. Hipofisectomia	40
1.5.2. Fotocoagulação a laser	40
1.5.3. Agentes Anti-VEGF	42
1.6. Justificativa do estudo	49
	50
2. OBJETIVO5	50
2.1. Objetivo Geral	51
2.2. Objetivos Específicos	51
	52
	52
3.1. Desenno do estudo	53
3.2. Elegibilidade dos pacientes	53
3.2.1. Uritérios de Inclusão	53
3.2.2. Uriterios de exclusao	53
3.3. Plano de trabalho	54
3.4. Metodos de Avallação	58
3.5. Procedimentos	62
3.5.1. Panfotocoagulação a LASER Full-Scatter	62
3.5.2. Paniolocoaguiação adicional	62
3.5.3 Laser focal ou Laser em grade para edema macular diabetico	63
3.5.4. Injeção Intravitrea de ranibizumabe	63
3.6. Analise estatistica	64
4. RESULTADOS	65
4 1 Resultados Acta	66
4 1 1 Evolução do estudo e adesão dos naciente	00 66
4.12 Área de vazamento de fluoresceína	00
4.1.2. Alea de vazamento de nuclescenta	יט 68
4.1.4 Espessura do subcampo macular no OCT (ESM)	00 03
4.2 Resultados Documenta	09

2.	Result	ados Documenta	71
	4.2.1.	ERG adaptado ao escuro na visita inicial	72
	4.2.2.	ERG adaptado à luz na visita inicial	75
	4.2.3.	Diferenças entre os Grupos PRP e PRPplus após tratamento no	
		ERG adaptado ao escuro	76
	4.2.4.	Diferenças entre os Grupos PRP e PRPplus após tratamento no	
		ERG adaptado ao claro	79

5. DISCUSSÃO	83
6. CONCLUSÕES	89
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
8. ANEXOS	106
ANEXO DE PUBLICAÇÃO	

1- Introdução

Há estimativas de que em 2010, 285 milhões de pessoas sofriam de diabetes melitus (DM) no mundo, e que esse número deve aumentar para 439 milhões até 2030. Esse enorme contingente de pacientes representaria 7,7% do total da população global adulta (SHAW; SICREE; ZIMMET, 2010). Os números alertam para a necessidade de investigação de métodos mais eficientes e acessíveis ao tratamento dessa doença e suas complicações.

Uma complicação frequente do paciente com DM é a retinopatia diabética (RD), que nos Estados Unidos afeta 28% dos adultos com DM (~8 milhões de pessoas), sendo que 4,4% apresentam RD com perda visual (ZHANG et al., 2010). No Brasil, estatística realizada recentemente indica que 7,6% das pessoas que se declaram diabéticas apresentam RD (SCHELLINI et al., 2014).

Os maiores riscos de perda visual grave na RD estão associados ao desenvolvimento de neovascularização da retina, configurando a retinopatia diabética proliferativa (RDP), e desde a realização do ETDRS (Early Treatment Diabetic Retinopathy Study), o tratamento com fotocoagulação a laser foi padronizado para essa situação, sendo a técnica "full scatter", ou panfotocoagulação (PRP) a mais usada (ETDRS, 1987b).

Infelizmente, somente 60% dos pacientes tratados com a PRP alcançam regressão total dos neovasos (ETDRS, 1987b), e 4,5% acabam desenvolvendo hemorragia vítrea ou descolamento de retina, necessitando de vitrectomia posterior via *pars* plana (FLYNN et al., 1992).

A associação de terapia antiangiogênica à PRP tem sido cada vez mais sugerida como alternativa para melhorar a eficácia no tratamento da RDP (AREVALO et al., 2009; HUANG et al., 2009; MASON et al., 2008; TONELLO et al., 2008). Assim, este estudo se propõe a fazer avaliação prospectiva de pacientes com RDP de alto risco comparando o tratamento com PRP, associado ou não com o antiangiogênico ranibizumabe, analisando as consequências das terapias na estrutura e função da retina.

Inicialmente, uma breve explanação sobre a estrutura e função da retina e as alterações secundárias à RD, faz-se necessária para melhor compreensão do presente estudo.

### 1.1. Anatomia retiniana

A retina é uma fina camada de tecido que reveste internamente o fundo do olho. Tem área de aproximadamente 266 mm<sup>2</sup>, se relaciona posteriormente com a coroide e anteriormente pelo vítreo; e é dividida, inicialmente, em retina sensorial e epitélio pigmentado (EPR), que estão frouxamente aderidos pela matriz extracelular.



Figura 1: Fotografia colorida do fundo de olho.

Os principais pontos de referência da retina são o nervo óptico, os vasos retinianos, a área *centralis,* a retina periférica e a ora serrata. A retina é mais espessa próxima ao nervo óptico, com afinamento progressivo em direção à periferia (BRON; TRIPATHI R; TRIPATHI B, 1997). A área *centralis* possui diâmetro de aproximadamente 5,5 mm e é divisível em fóvea e fovéola, com as regiões parafoveal e perifoveal ao redor da fóvea, que está localizada aproximadamente no centro da área *centralis* e representa uma área com

espessura da retina diminuída na parte central, produzindo a concavidade conhecida como fovéola. A fovéola é a área com melhor acuidade visual (AV) da retina, mesmo correspondendo a somente um grau do campo visual. Isto é devido à presença única de cone e à sua natureza avascular (BRON; TRIPATHI R; TRIPATHI B, 1997).

A periferia retiniana aumenta o campo visual e é dividida em quatro regiões: uma mais posterior (ao redor da área *centralis*), a média-periferia; extrema periferia e ora serrata.

Na retina estão os três primeiros neurônios da via visual aferente, os cones e os bastonetes, que são células fotossensíveis e iniciam o processo da visão. A partir daí, a informação visual segue por suas conexões com as células bipolares, o segundo neurônio, que processam os sinais em conjunto com as células horizontais e amácrinas e os transmitem para as células ganglionares, o terceiro neurônio (Figura 2).





Os axônios das células ganglionares formam o nervo óptico, que se estende até o corpo geniculado lateral. O conjunto de axônios dos neurônios do corpo geniculado lateral constitui as radiações ópticas, que fazem suas conexões sinápticas com os neurônios do córtex visual primário, ou área de associação visual (KOLB et al., 2001).

Histologicamente, a retina é dividida em 10 camadas: EPR, fotorreceptores, três camadas compostas por corpos celulares (nuclear externa, nuclear interna e células ganglionares), duas camadas intermediárias sinápticas (plexiforme interna e plexiforme externa) e a camada de fibras das células ganglionares. São consideradas, ainda, duas membranas limitantes: a externa, que não é uma membrana verdadeira e consiste no conjunto de complexos juncionais, que unem as células de Müller aos fotorreceptores no intervalo entre o seu segmento externo e interno; e a interna, formada pela lâmina basal das células de Müller e que faz a interface da retina com a membrana hialoidea posterior do vítreo (Figura 3).





A camada nuclear externa é formada pelos corpos celulares dos fotorreceptores. Seus prolongamentos sinápticos, juntamente com os das células bipolares, formam a camada plexiforme externa. Os corpos celulares das células bipolares estão situados na nuclear interna, que também é constituída pelas células amácrinas e horizontais. A segunda camada sináptica, a plexiforme interna, é responsável pela transmissão vertical da informação visual entre as células bipolares e ganglionares, e nela há também uma complexa rede moduladora, composta pelas células amácrinas e horizontais.

As células gliais são representadas pelos astrócitos, pela micróglia e principalmente pelas células de Müller, que formam o arcabouço de sustentação da retina e têm seus limites definidos entre as membranas limitantes interna e externa. Têm também função protetora e de controle da homeostase retiniana.

A circulação retiniana é o complexo de artérias, veias e capilares, que surgem na cabeça do nervo óptico e irrigam a retina interna (camada nuclear interna, camada plexiforme interna, camada de células ganglionares, camada de fibras nervosas e membrana limitante interna), já que a retina externa (EPR, camada de fotorreceptores, membrana limitante externa, camada nuclear externa e camada plexiforme externa) é nutrida pelos vasos da coroide.

A artéria central da retina, que é ramo da artéria oftálmica, divide-se em dois ramos temporais e dois nasais, que vão se subdividindo ao longo do seu trajeto em modo dicotômico, enquanto que as veias retinianas acompanham a distribuição das artérias, compartilhando com estas a mesma adventícia nos cruzamentos arteriovenosos. Os capilares retinianos têm como principal característica o fato de não apresentarem fenestrações e possuírem *zonulae occludens* ligando as suas células endoteliais, constituindo a barreira hematorretiniana interna. Outra característica importante é a presença de pericitos recobrindo cerca de 60% da superfície externa dos capilares, sendo estas células de fundamental relevância na fisiopatologia da RD (DANTÉS; SIQUEIRA, 2004).

#### 1.2. Eletrorretinografia

Na ausência da luz, os fotorreceptores são mantidos parcialmente despolarizados por uma corrente elétrica, resultante, na sua maior parte, da manutenção da abertura dos canais de íons Na<sup>+</sup> (GMPc dependentes) no seu segmento externo, da bomba de Na<sup>+</sup>/ K<sup>+</sup>, presente no segmento interno; e de uma bomba Na<sup>+</sup>/ K<sup>+</sup> /Ca<sup>+2</sup>, presente no segmento externo, que mantém elevada a concentração intracelular de Ca<sup>+2</sup>. Nesse estágio, o fotorreceptor libera constantemente o neurotransmissor glutamato em seu terminal sináptico com a célula bipolar (LAMB; PUGH, 2006) (Figura 4).

Quando um fóton de luz visível é absorvido por uma molécula de rodopsina, a energia absorvida causa a isomerização do seu cromóforo, o 11-cis *retinal* em sua forma trans, o 11-trans *retinal*. Essa reação inicia a transformação da rodopsina em metarodopsina II, que ativa uma proteína G heterotrimétrica, a transducina, iniciando uma cascata de reações enzimáticas, denominada fototransdução. Essas reações levam à diminuição da concentração intracelular de GMPc, que leva ao fechamento dos canais Na<sup>+</sup> na membrana do seguimento externo dos bastonetes causando sua hiperpolarização e o corte da liberação de glutamato no seu terminal sináptico com a célula bipolar, gerando a transmissão do estímulo visual (LAMB; PUGH, 2006) (Figura 4).

Assim, o potencial elétrico total gerado pela retina após a exposição luminosa é composto por uma fase inicial negativa causada pela hiperpolarização dos fotorreceptores seguida por uma fase positiva, devido à despolarização das células bipolares. De fato, essa resposta elétrica é conhecida por eletrorretinograma (ERG), que é á única medida objetiva da função retiniana; usado, principalmente, em diagnósticos clínicos de doenças retinianas hereditárias, reações tóxicas e avaliação funcional da retina em modelos animais e consiste basicamente no registro das alterações de potenciais elétricos na retina quando excitada pela luz.



Figura 4: Esquema de um fotorreceptor (bastonete) mostrando os discos de membranas no segmento externo, e a cascata de fototransdução (Foto cedida pelo Prof. Dr. André Messias).

No caso do ERG de campo total, toda a retina é iluminada durante o estímulo, enquanto eletrodos monoculares posicionados na córnea e na pele da têmpora ipsilateral são usados para medida do potencial elétrico externamente ao olho. O ERG é descrito como resposta em massa, pois é o resultado da soma das respostas elétricas produzidas por toda a matriz celular da retina. Um esquema simplificando o circuito elétrico, formado durante o registro do ERG, é mostrado na Figura 5, em que a retina representa a fonte de corrente gerada durante a apresentação da luz; que flui pelo vítreo, cristalino, humor aquoso, e pela córnea, sendo essas as resistências (ou impedâncias, para sinais elétricos alternados) do polo positivo. A retina, os tecidos extraoculares, a esclera, coroide e o EPR, compõem as resistências do polo negativo.



Figura 5: (A) Esquema mostrando as correntes extracelulares geradas após estimulação luminosa da retina: Entre os pontos A e B ocorre geração da corrente l<sub>1</sub> até o ponto C. A corrente l<sub>2</sub> atravessa as estruturas extraoculares voltando à esclera no ponto E, e o circuito se completa passando pela coroide, pelo epitélio pigmentado e pela retina. (B) Circuito elétrico mostrando o local de aquisição do potencial elétrico do ERG e as principais resistências elétricas envolvidas, onde R1 representa a resistência da retina, R2 do corpo vítreo, cristalino e da córnea, R3 das estruturas extraoculares e R4 (maior) do epitélio pigmentado. (Adaptado de ALMEIDA, 2012).

Os principais componentes avaliados da resposta elétrica do ERG são: onda-a (variação negativa do potencial elétrico da córnea gerada pela hiperpolarização dos fotorreceptores que ocorre após o início da exposição da retina a um *flash* de luz) (PENN; HAGINS, 1969); onda-b (variação positiva do potencial resultante da despolarização das células bipolares); e potenciais oscilatórios (PO) (variações rápidas ou de alta frequência, no potencial elétrico sobrepondo a onda-b) (Figura 6).

Apesar da principal aplicação do ERG ser em diagnóstico e seguimento clínico de doenças hereditárias da retina, várias anomalias adquiridas causam alterações eletrorretinográficas muito bem descritas na literatura, e a RD é uma dessas doenças (TZEKOV; ARDEN, 1999)



Figura 6: Típica resposta elétrica medida no ERG de campo total, após estimulação da retina de animal (rato) adaptado ao escuro (12 horas) por um *flash* de luz de 4 ms de duração e luminância de 10 cd.s/m<sup>2</sup>. Inicialmente, a resposta apresenta uma variação negativa do potencial (onda-a), gerada pela hiperpolarização dos fotorreceptores, e essa é seguida por uma variação positiva do potencial (onda-b) creditada à despolarização das células bipolares. Sobrepondo a onda-b, ocorrem variações rápidas do potencial elétrico, chamado de potencial oscilatório, que é originário das camadas intermediárias da retina, principalmente nas células amácrinas. (Adaptado de ALMEIDA, 2012).

### 1.3. Retinopatia Diabética

A RD é uma das principais complicações do DM e também uma das principais causas de deficiência visual e cegueira (BUCH et al., 2001, 2004)

Apesar de o edema macular diabético (EMD) ser a principal causa de diminuição da AV (KLEIN et al., 1984a,b), a forma proliferativa da RD é que se relaciona com mais frequência à perda visual grave, devido a eventos oculares

que levam à cegueira irreversível, como a isquemia macular e o descolamento tracional de retina (ETDRS, 1991c).

### 1.3.1 Epidemiologia

O número de indivíduos diabéticos tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, fruto da associação entre predisposição genética e fatores ambientais como alta ingesta calórica, sedentarismo e envelhecimento populacional (RATHMANN; GIANI, 2004).

Shaw, Sicree e Zimmet (2010) realizaram um estudo com o objetivo de estimar a prevalência global de diabéticos em 216 países entre 2010 e 2030. Foram utilizados dados de estudos realizados em 91 países para o cálculo das estimativas populacionais nacionais; determinando, assim, as respectivas prevalências. Os estudos foram identificados no *Medline* e por meio do contato com todos os escritórios regionais e nacionais da Federação Internacional de Diabetes. Como resultado, a prevalência mundial de DM em 2010 seria de 6,4%, correspondendo a 285 milhões de adultos, aumentando para 7,7% ou 439 milhões em 2030. O mesmo estudo previa para o Brasil uma população de 7,6 milhões em 2010, aumentando para 12,3 milhões em 2030.

A prevalência de RD, nos EUA, corresponde a 28,5% da população adulta portadora de DM, equivalente a aproximadamente oito milhões de indivíduos, sendo que 4,4 % dos casos com RD apresentam perda visual (ZHANG et al., 2010).

No Brasil, os dados sobre a morbidade relacionada com o DM são escassos. Todavia, alguns estudos epidemiológicos do sudeste do Brasil, como o relato de Fernandez, Moura e Jorge (1998) encontraram 42% de RD entre pacientes com DM do tipo 1 e 34 % entre diabéticos do tipo 2, no ambulatório da Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais. Mais recentemente, Schellini et al. (2014) mostraram que a RD estava presente em 7,62% da população de seu estudo, e que a prevalência de cegueira e baixa visão era maior entre os indivíduos portadores de DM e RD. Souza Jr. (2003) avaliou 2.303 pacientes diabéticos no Mutirão do "Olho Diabético" em Ribeirão Preto - SP - Brasil e

encontrou RD em 28%. As taxas de prevalência de cegueira legal foram de 19% nos pacientes com DM tipo 1 e 13% nos com DM tipo 2. Outro estudo sobre a prevalência da RD foi realizado por Alves (2005), sendo verificada prevalência de 12% de RD na população adulta urbana de Ribeirão Preto - SP - Brasil e taxa de cegueira legal de 5,3% devido à RD.

#### 1.3.2 Fisiopatologia

A hiperglicemia crônica, além do tempo de duração da doença, é um dos principais fatores relacionados às complicações microvasculares no DM. Há evidências de que a hiperglicemia desencadeie uma série de reações bioquímicas, eventualmente culminando na sequência de eventos: 1) acúmulo excessivo de sorbitol intracelular (produto da degradação da glicose pela enzima aldose-redutase); 2) glicosilação de colágeno da membrana basal endotelial; e 3) ativação patológica da proteína Kinase C. Essas alterações metabólicas estimulariam a expressão de múltiplas citoquinas, entre elas o fator de crescimento vascular endotelial (vascular endothelial growth factor, VEGF), que possibilita 0 aumento da fosforilação das *tight junction*, levando à hipermeabilidade vascular e ao dano endotelial observados na RD (JOUSSEN et al., 2004).

A RD tem sua origem em uma microangiopatia que afeta as arteríolas précapilares, capilares e vênulas retinianas. No entanto, vasos maiores podem também estar envolvidos (KOHNER, 1993). A microangiopatia se manifesta na forma de oclusões (manchas algodonosas), ruptura da microvasculatura da retina (hemorragias) e extravasamento de constituintes do plasma por sua parede alterada (edema e exsudatos duros). As alterações histopatológicas da RD, como o espessamento da membrana basal e a perda de pericitos dos capilares retinianos (BLOODWORTH Jr; ENGERMAN, 1973; BLOODWORTH Jr.; MOLITOR, 1965) não são detectáveis clinicamente. O que se observa como primeiro sinal clínico na RD é o microaneurisma. Dois mecanismos explicam essa formação: o primeiro, que os microaneurismas decorrem da proliferação focal de células endoteliais, que perderam o estímulo inibitório (antiproliferação), proveniente dos pericitos (LINDAHL et al., 1997) e o segundo seria que o microaneurisma decorre de fragilidades focais da parede vascular pela perda de pericitos. Diante dessas alterações, instala-se a base para a evolução da microangiopatia diabética.

Acredita-se que o espessamento da membrana basal, os danos, a proliferação das células endoteliais dos capilares e as alterações nas hemácias, levando ao transporte ineficiente de oxigênio e aumento na adesividade sejam os pela oclusão de microvasos (KOHNER, responsáveis 1993). Estudos demonstraram que a presença de inflamação crônica subclínica em fases precoces da vasculopatia diabética exerceria papel importante na patogênese da RD (JOUSSEN et al., 2004; MIYAMOTO et al., 2000; SCHRODER; PALINSKI; SCHMID-SCHONBEIN, 1991). Essa premissa ganhou força diante da constatação da evidência de adesão leucocitária no endotélio vascular retiniano, que pode desencadear a morte de células endoteliais, o extravasamento e a oclusão vascular; o evento inicial na RD (JOUSSEN et al., 2004). A oclusão capilar inicial, provocada pela inflamação crônica, resultaria em hipóxia tecidual que, por sua vez, estimularia a expressão de fatores angiogênicos com o VEGF, resultando em um ciclo vicioso. Em decorrência da hipóxia e do consequente estímulo pelo VEGF, desenvolvem-se: 1) Os shunts arteriovenosos associados a oclusões capilares significativas, que seguem das vênulas para as arteríolas, denominados de IRMA (anormalidades microvasculares intrarretinianas); 2) A neovascularização, numa tentativa de revascularizar as áreas hipóxicas da retina, papila do nervo óptico e íris (KOHNER, 1993); 3) A neovascularização vitreorretiniana estimula a fibroplasia e fibrose vítrea que progridem com o aumento do descolamento do vítreo posterior pela contração das membranas vítreas rasgando os delicados vasos sanguíneos. O resultado é a presença de hemorragias pré-retinianas e vítreas, cuja organização induz mais fibrose e tração, levando ao descolamento de retina tracional (GARNER, 1993; STANFORD, 2004).

### 1.3.3. Achados oftalmológicos e a classificação da retinopatia diabética

A presença de microaneurismas nos capilares retinianos é a primeira manifestação detectável ao oftalmoscópio, como indagado acima. Inicialmente, a maior parte dos microaneurismas situa-se no lado venoso dos capilares e, mais tardiamente, surgem no lado arterial dos mesmos (GARNER, 1981). Devido à sua permeabilidade, ocorre acúmulo de água, proteínas e lipídios no tecido retiniano. O líquido que sai dos capilares leva ao espessamento da retina, principal característica clínica do edema macular (EM). As proteínas e os lipídeos podem se acumular no interstício da retina e gerar os exsudatos duros. Quando há ruptura dos microaneurismas, surgem hemorragias intrarretinianas. Se essa hemorragia é profunda (posterior à camada nuclear interna), tem forma oval ou redonda. As hemorragias mais superficiais (camada de fibras nervosas) assumem o padrão de chama de vela, indistinguíveis daquelas ocorridas na retinopatia hipertensiva, ou oclusões venosas da retina (AIELLO et al., 1998; GARNER, 1981; KOHNER, 1993).

Com a agressão crônica da microcirculação da retina, aparecem sinais de hipóxia retiniana, incluindo-se hemorragias múltiplas, manchas algodonosas, IRMA e aumento da tortuosidade venosa. As manchas algodonosas são causadas por oclusão das arteríolas pré-capilares, levando a infartos nas camadas de fibras nervosas. As IRMAs, hemorragias retinianas e/ou microaneurismas múltiplos e alterações venosas (*venous beading*: veias em rosário) são os fatores mais importantes para a previsão de progressão da retinopatia. Quando essa progressão ocorre, há desenvolvimento de neovascularização de retina, característica da RDP (ETDRS, 1991c).

A RDP caracteriza-se pela presença de neovasos, que geralmente, se originam de vênulas. Quando estão a menos de 1 mm do disco óptico, ou se originam do mesmo, são denominados neovasos de disco (NVD). Quando estão situados a mais de 1 mm do disco óptico recebem outra denominação: neovasos extradiscais (NVE). Os NVE quase sempre crescem em direção ou estão situados em áreas retinianas de não perfusão capilar. No entanto, a não perfusão capilar é mais abundante em olhos com NVD do que com NVE (SHIMIZU; KOBAYASHI; MURAOKA, 1981).

De maneira geral, os neovasos tendem a crescer ao longo das áreas de menor resistência, o que explica a sua presença no disco óptico, devido à ausência de membrana limitante interna verdadeira. Associada aos neovasos, ocorre a formação de tecido conectivo, levando ao aparecimento de tecido fibrótico que pode ser vascular ou avascular. A variedade fibrovascular está geralmente relacionada com vasos que se estendem para dentro da cavidade vítrea ou com neovasos na superfície da retina ou do disco. A variedade avascular geralmente resulta no espessamento da face posterior da hialoide (McMEEL, 1971). Após o desenvolvimento das alterações fibrovasculares, contrações vítreas súbitas podem levar à ruptura dos neovasos, causando hemorragia vítrea. A contração do tecido fibrovascular, ancorado no vítreo posterior, também pode levar ao descolamento tracional da retina (AIELLO et al., 1998; GARNER, 1981; KOHNER, 1993; PORTA; BANDELLO, 2002), caracterizando o estágio mais avançado da RD.

A classificação da retinopatia diabética não proliferativa (RDNP) atualmente é baseada na classificação de *Arlie House* modificada (DIABETIC RETINOPATHY STUDY RESEARCH GROUP - DRS, 1981b; ETDRS, 1991b):

- RDNP leve: pelo menos um microaneurisma, não chegando à definição de RDNP moderada;
- RDNP moderada: hemorragias e/ou microaneurismas piores que a fotografia padrão 2A e/ou manchas algodonosas, veias em rosário ou IRMA, não chegando à definição de RDNP grave;
- RDNP grave: presença de uma das seguintes características: microaneurismas mais veias em rosário e/ou hemorragias/microaneurismas maiores ou iguais à fotografia padrão 2A em quatro quadrantes, ou veias em rosários notórias em dois ou mais quadrantes, ou IRMA moderada (fotografia padrão 8A) em um ou mais quadrantes;
- RDNP muito grave: duas ou mais das características acima descritas na forma grave.

A classificação da RDP se dá em relação ao risco de perda visual grave, conforme determinado abaixo:
- RDP sem características de alto risco: Caracteriza-se pela presença de NVE ou NVD menores que um quarto da área do disco, ou hemorragia vítrea ou pré-retiniana com NVE menores que a metade da área do disco óptico e sem NVD.
- RDP com características de alto risco: Caracteriza-se por NVDs maiores que um quarto da área do disco (Figura 7), ou NVD associados à hemorragia vítrea ou pré-retiniana, ou NVE maiores que a metade da área do disco associados à hemorragia vítrea ou pré-retiniana.
- RDP avançada: Presença de descolamento de retina tracional acometendo a mácula, ou hemorragia vítrea que impeça a classificação da RDP.



Figura 7: Fotografia padrão 10 A. (Adaptado de ETDRS, 1991b).

### 1.4. Eletroretinografia em retinopatia diabética

As alterações eletrorretinográficas associadas à RD são resultante do estágio de isquemia retiniana e da sua consequente perda de função na retina. Como os POs são extremamente sensíveis a alterações isquêmicas da retina, têm sido utilizados para a detecção precoce da RD (TZEKOV; ARDEN, 1999).

Pode haver período considerável entre o diagnóstico de DM e o desenvolvimento da RD, já que apenas 5% dos pacientes desenvolvem RDNP e a incidência de RDP é insignificante nos primeiros cinco anos após o diagnóstico (JAVITT et al., 1991). Todavia, com o passar do tempo, a porcentagem de pessoas que desenvolvem RD aumenta progressivamente, e após de 20 anos de doença, mais de 90% dos pacientes com DM tipo 1 e cerca de 60% com o tipo 2 têm algum grau de RD (KLEIN et al., 1984a).

As alterações no ERG, em pacientes diabéticos podem ser detectadas, mesmo antes de haver alterações visíveis na fundoscopia (TZEKOV; ARDEN, 1999). A anormalidade mais consistente neste estágio ocorre nos POs (aumento da latência e diminuição da amplitude). Em um estudo com 572 olhos de 303 pacientes portadores de DM tipo 2, o aumento da latência do OP ocorreu em quase todos os pacientes em estágios iniciais da doença (não somente antes das alterações fundoscópicas, mas também anteriormente às alterações visíveis na angiofluoresceinografia - AGF) (TZEKOV; ARDEN, 1999).

Nos casos de RDNP leve a moderada, estudos revelaram que vários outros parâmetros do ERG podem estar alterados, como a amplitude e a latência da onda-b escotópica, e do *flicker* de 30 Hz (HOLOPIGIAN et al., 1992; JUEN; KIESELBACH, 1990; TZEKOV; ARDEN, 1999).

Os poucos estudos publicados, que incluem pacientes com RDNP severa, mostram significativa redução e; algumas vezes; ausência dos POs (BRESNICK; PALTA, 1987; SPEROS; PRICE, 1981). A sensibilidade retiniana, medida pela luminância necessária para atingir metade da amplitude de saturação da onda-b escotópica no ERG e a amplitude da onda-b fotópica também são bons indicadores da gravidade da RD (CHUNG; KIM; KWAK, 1993; SATOH et al., 1994). Na RDP, anormalidades significativas em todos os parâmetros do ERG têm sido reportadas por diversos autores, incluindo diminuição ou até mesmo ausência na amplitude e atraso na latência dos POs, redução da amplitude das ondas-a e b, tanto fotópicas como escotópicas, além de atraso no *flicker* de 30 Hz (ALGVERE; GJOTTERBERG, 1974; GJOTTERBERG, 1974; TZEKOV; ARDEN, 1999).

#### 1.4.1. Efeito da panfotocoagulação e o ERG

A PRP tornou-se o tratamento de escolha para RD visando a redução do risco de cegueira (DRS, 1978). O racional dessa terapia consiste na destruição de parte substancial da retina periférica, a fim de diminuir a diferença entre a demanda e o suprimento de oxigênio, para reduzir o estímulo de neovascularização (CAPOFERRI et al., 1990; KRILL et al., 1971; PERLMAN et al., 1985).

Como já relatado previamente, o ERG reflete a soma dos potenciais elétricos gerados na retina como um todo, e por consequência, quando há destruição de parte da retina, esse potencial é reduzido proporcionalmente à quantidade de células geradoras destruídas. Nesse sentido, se comparado o ERG antes e depois do laser em um olho com RD, a redução observada nos potenciais elétricos medidos não é diretamente proporcional à área destruída pelo laser, visto que a distribuição de células na retina não é uniforme (com menor quantidade na periferia) e há a possibilidade de a fotocoagulação ser aplicada em tecido doente, que não participava intensamente da geração dos potenciais elétricos antes da aplicação do laser (CAPOFERRI et al., 1990; KRILL et al., 1971).

Como a retina anterior é a mais afetada pela isquemia causada pela RD, visto que os fotorreceptores e o EPR são nutridos pela coroide, é esperado que os potenciais elétricos mais sensíveis a essas alterações sejam aqueles gerados nessa parte da retina. De fato, os POs (células amácrinas e horizontais) e a ondab (células bipolares) encontram-se reduzidos antes da onda-a em RD (TZEKOV; ARDEN, 1999). Assim, se fosse considerada a razão entre amplitude da onda-b dividida pela amplitude da onda-a (razão b/a), ter-se-ia um parâmetro indicando a extensão da isquemia, e esse é frequentemente utilizado em estudos com ERG em RD (PERLMAN et al., 1985).

É interessante ressaltar que a aplicação de fotocoagulação a laser causa redução da onda-b muito mais intensa do que a esperada, visto que essa aplicação deveria causar lesão na retina posterior. Isso ocorre, possivelmente, pela destruição de tecido da retina interna adjacente às áreas onde as marcas de laser são feitas (PERLMAN et al., 1985).

De forma geral, o ERG pode ser utilizado para avaliar várias características da função visual associadas à RD e suas perdas funcionais antes e após a fotocoagulação.

## 1.5. Tratamento da retinopatia diabética proliferativa

Os estudos clínicos multicêntricos *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT) e *UK Prospective Diabetes Study* (UKPDS) para DM tipo 1 e tipo 2, respectivamente, mostram que o controle adequado da glicemia é o fator mais importante na prevenção e/ou diminuição da velocidade de progressão da RD (DCCT, 1993; UKPDS, 1998). No DCCT, o bom controle glicêmico mostra redução de 76% no aparecimento da RD (casos sem RD) e de 54% na sua progressão (casos de RDNP leve à moderada). Já o UKPDS, mostra diminuição de 21% na progressão da RD e 29% na redução da necessidade de PRP a LASER.

Fatores relacionados ao risco de progressão da RD incluem tempo de doença (>15-20 anos), níveis de hemoglobina glicosilada (HbA<sub>1c</sub> >7%), hipertensão sistêmica (>150/85 mmHg), pouca idade, baixo hematócrito, história de neuropatia diabética, aumento de triglicérides e baixa albumina sérica, devendo, então, serem rigorosamente controlados (DCCT, 1993; UKPDS, 1998). Além de um controle clínico rigoroso, que é essencial para o tratamento adequado da RD, alguns tratamentos específicos foram e são propostos para o controle da doença:

### 1.5.1. Hipofisectomia

Houssay e Biassoti (1930) mostraram que a hipofisectomia em cachorros, previamente pancreatectomizados, reduzia a gravidade do DM nesses animais. Vinte e dois anos após, Luft, Olivercrona e Sjgren (1952) realizaram uma hipofisectomia em humanos para amenizar as complicações vasculares do DM. Nos anos seguintes, vários métodos de supressão pituitária foram utilizados para o tratamento da RD, variando da radioterapia por feixe externo até a hipofisectomia transfrontal. O método foi avaliado prospectivamente e os resultados positivos da hipofisectomia foram publicados por Panisset et al. (1971), que relataram a favorável regressão da RD em pacientes com supressão hipofisária, quando comparados com indivíduos com pouca ou nenhuma supressão. Nos dias de hoje, a supressão hipofisária tem interesse histórico e teórico, pois a fotocoagulação com *LASER* de argônio leva a resultados tão animadores quanto aqueles da hipofisectomia, sem os efeitos colaterais desta última: lesões do sistema nervoso central, necessidade de reposição hormonal e esterilidade.

### 1.5.2. Fotocoagulação a laser

A possibilidade do uso da luz para o tratamento de doenças retinianas em geral foi aventada a partir da constatação de que a observação de um eclipse solar provocava dano retiniano. Em 1945, data de ocorrência de um eclipse solar, Meyer-Schwickerath (1950) interessou-se em estudar a luz para tratamento de doenças retinianas. A princípio, foi tentado a usar luz solar refletida, o que se revelou impraticável. Outras fontes passaram, então, a ser pesquisadas, tais como a luz de xenônio de alta pressão. Os resultados iniciais do tratamento específico de RD com luz de xenônio foram desanimadores (OKUN; CIBIS, 1966; WETZIG; JEPSON, 1966; WETZIG; WORLTON, 1963), até que evoluíram para resultados melhores que a história natural da doença (BEETHAM, 1963; CAIRD; GARRETT, 1963).

Nessa época, cresceu o interesse em usar o *LASER* para o tratamento da RD por meio de fotocoagulação retiniana. Campbell et al. (1963, 1965) e Zweng

(1964) usaram laser de rubi com sucesso limitado. Já na década de 1970, começou-se a usar o *LASER* de argônio para fotocoagulação retiniana, com bons resultados (LITTLE; ZWENG; PEABODY, 1970; PATZ; MAUMENEE; RYAN, 1971; ZWENG; LITTLE; PEABODY, 1971), mas Beetham et al. (1970) obtiveram resultados melhores com a mesma técnica, demonstrando, pela primeira vez, o efeito positivo da PRP retiniana.

A eficácia da fotocoagulação a *LASER* foi comprovada pelo DRS (1976, 1978, 1979, 1981a,b), criado em 1971 para testar a eficiência da fotocoagulação retiniana no tratamento da RD. Este estudo avaliou 1.742 pacientes com DM tipo 1 e 2, com RDNP severa em ambos os olhos ou em um apresentando RDP. Um olho foi designado para tratamento com laser e outro para controle. O resultado foi a diminuição do risco de perda visual severa em 50% nos olhos tratados. Também demonstrou, como efeito secundário do tratamento, ligeira perda de na acuidade visual e redução do campo visual periférico.

Apesar de a fotocoagulação retiniana ser comprovadamente eficaz em pacientes com RDP de alto risco, como demonstrado pelo DRS, permanecia a dúvida se o tratamento precoce para estágios menos graves da doença traria maiores benefícios. Daí o surgimento do ETDRS, desenhado com o intuito de responder à questão do tratamento precoce e também a questões sobre o EM e o uso de aspirina para pacientes com retinopatia. Nesse estudo foram avaliados 3.711 pacientes portadores de RDNP leve a grave e RDP sem características de alto risco, com e sem EM. Foram excluídos pacientes com RDP de alto risco e AV menor que 20/200. Um olho de cada paciente foi randomizado para PRP imediata, enquanto o outro apenas observado. Este último foi tratado quando a RD progrediu e apresentou características de alto risco. A comparação entre o grupo submetido à PRP precoce e o de observação mostrou discreta redução na incidência de perda visual grave nos olhos tratados. Entretanto, as taxas de perda visual grave em cinco anos foram similares nos dois grupos. Em olhos com RDNP leve a moderada, cujas taxas de progressão para perda visual grave foram ainda menores, os efeitos colaterais inerentes ao tratamento não justificavam o início do tratamento precoce com PRP. Por outro lado, em olhos com RDNP grave ou RDP inicial, os riscos do tratamento precoce seriam justificados pela maior possibilidade de progressão para RDP de alto risco (ETDRS, 1991a). A segurança e eficácia da fotocoagulação macular (focal e/ou em grade) para o tratamento do EMD também foram demonstradas pelo mesmo grupo de pesquisadores (ETDRS, 1995).

A fotocoagulação a laser é o tratamento padrão para a RDP, sendo a técnica "full scatter" a mais aceita e usada. A forma de aplicação da PRP, segundo o ETDRS, sugere 1.200 a 1.600 disparos de moderada intensidade com 500 micras de diâmetro e tempo de duração de 0,1 segundos. Emprega-se, nesses casos, tratamento a partir do polo posterior até ou além do equador, aproximadamente em dois episódios (ETDRS, 1987b). Apesar de a fotocoagulação a laser ser benéfica e reduzir o risco de perda visual grave, é um procedimento doloroso e destrutivo, que frequentemente leva a algumas complicações como diminuição do campo visual periférico, alteração na visão de cores e noturna e aumento do risco de EM (ETDRS, 1991c; SCHMIDINGER et al., 2011).

Aproximadamente 60% dos pacientes tratados com a fotocoagulação a laser do tipo *scatter* apresentam regressão completa dos neovasos num período de três meses, quando isto não acontece é denominada de neovascularização retiniana persistente (ETDRS, 1987b). Muitos pacientes necessitam de tratamento adicional com laser e 4,5% evoluem para vitrectomia posterior via *pars* plana, a despeito desse tratamento (FLYNN et al., 1992).

Acredita-se que a PRP retiniana leva à recuperação dos níveis de po2 na retina hipóxica, pela diminuição do consumo de O2 pela retina externa, com melhora da oxigenação difundida pela coroide. Nas áreas tratadas com LASER, pode ser observada a redução da expressão do VEGF, mediador da neovascularização retiniana (SCHLINGEMANN; VAN HINSBERGH, 1997).

#### 1.5.3. Agentes Anti-VEGF

A angiogênese é definida como a formação de novos vasos sanguíneos. Ela pode ser normal ou patológica (RISAU, 1997). Ao longo da vida adulta, a angiogênese normal é observada em algumas situações fisiológicas, sendo essencial para o processo de reprodução, desenvolvimento (por exemplo: ciclo reprodutivo feminino) e a reparação (como exemplo: formação de colaterais em isquemia cardíaca), então, é ativada por curto período, sendo completamente inibida (CAMPOCHIARO, 2000). O controle da angiogênese é feito por um balanço entre fatores endógenos promotores e inibidores. Como exemplos de fatores promotores têm-se: VEGF, FGF2 (Basic Fibroblast Growth Factor), angiopoietinas, ICAM 1 (Intracellular Adhesion Molecule); e de inibidores: PEDF (Pigment Epithelial Derived Factor), Tryptophanyl-tRNA synthetase, interpheron alpha e Trombospodina 1 (DORRELL et al., 2007; FOLKMAN; KLAGSBRUN, 1987).

Quando os mecanismos de controle falham, a angiogênese excessiva torna-se patológica, dando origem às doenças angiogênese-dependentes. São exemplos de doenças oculares com angiogênese excessiva: formas de retinopatia, como RD, degeneração macular relacionada à idade (DMRI), retinopatia da prematuridade, oclusão venosa retiniana, glaucoma neovascular e neovascularização corneana (AIELLO et al., 1994).

Há tempos, o VEGF tem sido estudado em doenças oculares em humanos, caracterizadas por neovascularização (FOLKMAN, 1971; MALECAZE et al., 1994). Há evidências do papel do VEGF na isquemia, induzindo o aumento da permeabilidade e angiogênese. Níveis aumentados de VEGF foram encontrados na retina e no vítreo de humanos (ADAMIS et al., 1994; AIELLO et al., 1994) e animais laboratoriais (MILLER et al., 1994; PIERCE et al., 1995) com retinopatias sugerindo isquêmicas. que 0 VEGF importante exerce papel na neovascularização retiniana.

O VEGF é uma glicoproteína de 45-kDa com grande poder angiogênico e indutor da permeabilidade vascular, sendo 50.000 vezes mais potente que a histamina (LUTTY et al., 1996). Apresenta vários subtipos: VEGF-A, VEGF-B, VGFE-C, VEGF-D e VEGF-E. Nos seres humanos, quatro isoformas de VEGF-A foram identificadas (VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub> e VEGF<sub>206</sub>), com variação no número de aminoácidos que compõem a molécula. Muitos tipos celulares são capazes de produzir VEGF, como fibroblastos, células endoteliais, macrófagos e queratinócitos. Três receptores tirosinaquinase, KDR (VEGFR-2), FIt-1 (VEGFR-1)

e Flt 4 (VEGFR-3), medeiam a atividade do VEGF, enquanto dois outros receptores, sem atividade tirosinaquinase, as neuropilinas (NP), parecem ser importantes correceptores do VEGF (ZACHARY et al., 2009).

No DM, o aumento do VEGF-A atua como fator de permeabilidade vascular na RD, acompanhando-se do aumento de receptores VEGF, dentre os quais, a localização do VEGFR-1 nos pericitos o torna possível responsável pelos efeitos iniciais do aumento de VEGF-A. O aumento de VEGFR-2 se relaciona às áreas de vazamento vascular, sugerindo-se que a expressão vascular do VEGFR-2 ocorra somente em áreas com RD estabelecida. O VEGFR-3 também foi encontrado aumentado em áreas de extravasamento vascular, sendo possível, então, que outros membros da família VEGF, como os VEGF-C e D, também participem do processo. O VEGF atua estimulando o estreitamento do lúmen capilar por hipertrofia das células endoteliais, contribuindo, dessa forma, para o fechamento capilar (HOFMAN et al., 2001). Na RDP, o VEGF atua sinergisticamente com outros fatores de crescimento, mas é o fator necessário e suficiente para induzir a neovascularização retiniana e de íris em modelos experimentais (WITMER et al., 2003).

### Pegaptanibe

O pegaptanibe sódico (Macugen; EyeTech Pharmaceuticals/Pfizer Inc, New York, USA) foi a primeira droga antiangiogênica aprovada pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para uso oftalmológico. Trata-se de um aptâmero de ácido ribonucleico ligado a moléculas de polietileno glicol de 20-kD com capacidade de bloquear especificamente a isoforma 165 do VEGF-A.

Dois estudos randomizados duplo-cegos conhecidos como V.I.S.I.O.N. (*VEGF Inhibition Study in Ocular Neovascularization*) demonstraram a segurança e efetividade do pegaptanibe na DMRI neovascular. Nesses estudos foram avaliados 1186 indivíduos com qualquer subtipo de DMRI neovascular à AGF, evidenciando que 70% dos pacientes que receberam injeções intravítreas com 0,3 mg da medicação apresentaram perda menor que 15 letras na AV após o período de um ano (GRAGOUDAS et al., 2004).

O Macugen Diabetic Retinopathy Study Group testou a segurança e eficácia do pegaptanibe no EMD em um estudo fase II randomizado, duplo-cego e controlado com placebo, envolvendo 172 indivíduos. Respectivamente, para o grupo tratado com a dose de 0,3 mg e o grupo placebo, a proporção de pacientes que ganharam dez ou mais letras na AV foi de 34% contra 10%; a redução média na espessura central da retina de 68 µm contra aumento de 4 µm e a proporção de pacientes necessitando de fotocoagulação subsequente de 25% contra 48% (CUNNINGHAM et al., 2005). Além disso, a análise retrospectiva de subgrupos revelou que o tratamento com pegaptanibe levou à regressão da neovascularização de retina em oito de 13 pacientes com RDP (ADAMIS et al., 2006). Outro estudo aberto, randomizado, comparando pegaptanibe intravítreo com PRP retiniana em RDP demonstrou que a droga foi capaz de induzir rápida regressão dos neovasos de retina em curto prazo (GONZALEZ et al., 2009). O pegaptanibe também foi utilizado no EM secundário à oclusão de ramo venoso e veia central da retina. Os achados foram favoráveis ao ganho de letras na AV e redução da espessura macular na tomografia de coerência óptica (OCT) (WROBLEWSKI et al., 2009).

### Bevacizumabe

O bevacizumabe (Avastin®, Genentech, South San Francisco, CA, USA) é um anticorpo recombinante, monoclonal, humanizado, produzido por tecnologia de DNA recombinante em um sistema de expressão em célula de ovário de hamster chinês (CHO), direcionado ao VEGF circulante, capaz de inibir todas as suas isoformas, bloqueando a interação VEGF receptor (DORRELL et al., 2007). É constituído por 214 aminoácidos e tem peso molecular de aproximadamente 149.000 daltons.

Após os resultados de uma série de estudos clínicos fase II e III, o medicamento foi aprovado em 26 de fevereiro de 2004, pelo FDA, para o tratamento de câncer metastático de cólon, associado à quimioterapia baseada no 5-fluouracil, passando a constituir a primeira droga antiangiogênica aprovada para uso em humanos (KABBINAVAR et al., 2003). O bevacizumabe obteve aprovação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) como antineoplásico e,

segundo a indicação na bula, em combinação com quimioterapia a base de fluoropirimidina, é indicado para tratamento de primeira-linha de pacientes com carcinoma metastático do cólon ou reto.

Os primeiros relatos da utilização do bevacizumabe no tratamento de patologias coroidianas e retinianas, por meio de injeção intravítrea, datam de agosto de 2005 (ROSENFELD; FUNG; PULIAFITO, 2005; ROSENFELD; MOSHFEGHI; PULIAFITO, 2005). Em um caso de neovascularização de coroide em paciente com DMRI e um de EM em paciente com oclusão da veia central da retina, observou-se melhora clinicamente significativa (>3 linhas do ETDRS) na AV e completa restauração da arquitetura retiniana normal no período de quatro semanas, após única injeção intravítrea de 1.0 mg de bevacizumabe, sem constatação de eventos adversos no período. Desde então, diversas doenças da retina já foram tratadas alternativamente com bevacizumabe intravítreo, incluindo casos de neovascularização de coroide, RDP e EMD (AVERY et al., 2006; COSTA et al., 2006; JORGE et al., 2006).

Na RDP, vários estudos evidenciaram o benefício do uso do bevacizumabe com rápida regressão dos neovasos retinianos e de íris após única injeção intravítrea de 1,25 mg (AVERY et al., 2006; MINELLA et al., 2008). O uso adjuvante do bevacizumabe intravítreo na dose de 1,5 mg na PRP retiniana em pacientes com RDP de alto risco mostrou efeito positivo na redução do vazamento de corante à AGF em curto prazo, apesar de a AV não ter sofrido mudança significativa em relação ao grupo com tratamento convencional (fotocoagulação a laser) (TONELLO et al., 2008). Não foi observado vazamento à AGF em 100% dos olhos com neovascularização retiniana persistente (NRP) secundária à RDP seis semanas após a administração de 1,5 mg de bevacizumabe intravítreo, embora uma semana após o uso do antiangiogênico já houvesse redução significativa (JORGE et al., 2006). Apesar de a dose de bevacizumabe, comumente administrada, ser em torno de 1,25 mg, doses menores podem também induzir regressão dos NVD e retina em RDP (STERGIOU; SYMEONIDIS; DIMITRAKOS, 2011).

#### Ranibizumabe

O ranibizumabe (Lucentis®, Novartis Pharma S.A.S., França) é o fragmento humanizado do sítio de ligação ao antígeno do anticorpo monoclonal contra o VEGF, desenvolvido pela empresa farmacêutica Genentech, exclusivamente para uso oftálmológico, e tem por principal finalidade se ligar e inibir todas as isoformas do VEGF. Lowe et al. (2007) demonstraram que o ranibizumabe é um potente inibidor da angiogênese e permeabilidade vascular. Essa droga foi obtida a partir da fragmentação do bevacizumabe, com redução do seu peso molecular para 58 KDa. Em teoria, o bevacizumabe não atravessaria a membrana limitante interna da retina neurossensorial devido ao seu alto peso molecular. Sendo assim, o ranibizumabe teria maior penetração e ação, alcançando níveis significativos de concentração no espaço subrretiniano e coroidiano (MORDENTI et al., 1999).

Diferentemente do bevacizumabe, o ranibizumabe foi aprovado pelo FDA para uso oftalmológico no tratamento da DMRI exsudativa. No começo de 2005, a Genentech anunciou os resultados do ensaio clínico randomizado fase III MARINA (minimally classic CNV ou occult CNV lesions em DMRI neovascular). Aproximadamente 95% dos pacientes tratados com ranibizumabe mantiveram ou melhoraram a visão após um ano de seguimento, sendo este resultado mantido após dois anos de seguimento (ROSENFELD; RICH; LALWANI, 2006). Em novembro de 2005, a Genentech anunciou os resultados do ensaio clínico randomizado fase III ANCHOR (lesões predominantemente clássicas em DMRI neovascular). Após um ano de seguimento, aproximadamente 94% dos pacientes tratados com 0,3 mg e 96% daqueles medicados com 0,5 mg de ranibizumabe mantiveram ou apresentaram alguma melhora de AV (definida como perda de até 15 letras em AV), comparado com aproximadamente 64% daqueles submetidos à terapia fotodinâmica com verteporfina (Visudyne<sup>®</sup>) (BROWN et al., 2006). Após esses estudos clínicos pioneiros (MARINA; ANCHOR), outros estudos com injeções menos frequentes de ranibizumabe foram realizados (PIER, PrONTO, SAILOR) (ROSENFELD et al., 2006), respaldando cada vez mais, o uso desse agente antiangiogênico para casos de DMRI neovascular.

Em relação à RD, em uma série de 10 casos de EMD, cinco pacientes tratados mensalmente com três doses de ranibizumabe, ganharam mais que 15 letras da tabela do ETDRS, cinco mais que 10 letras da mesma tabela e oito mais que uma letra na AV (CHUN et al., 2006).

O Retinopathy Clinical Research Network (DRCRnet, 2010), reuniu 854 olhos (691 pacientes), comparando os efeitos na AV e espessura macular central (EMC) em pacientes com EMD, tratados com: 1) injeção simuladora + laser focal/grid; 2) ranibizumabe IV seguido de laser focal/grid; 3) ranibizumabe IV + laser focal/grid a partir de 24 semanas; 4) triancinolona IV seguida de laser focal/grid. Esse estudo mostrou que, nos dois grupos tratados com ranibizumabe, houve melhora significativa da visão, se comparados aos outros grupos. A redução da EMC foi similar nos grupos de ranibizumabe e triancinolona; e superior, comparando-se os casos tratados somente com o laser. Em conclusão, a terapia combinada de ranibizumabe e laser mostrou ser mais efetiva no tratamento do EMD em um ano de seguimento, quando comparada com o laser sozinho. Entre um e dois anos de seguimento, os resultados das AVs se mantiveram estáveis. Em olhos pseudofácicos, a triancinolona seguida de laser mostrou melhora da AV comparável aos grupos de ranibizumabe, porém aumentou o risco de elevação da pressão intraocular (PIO).

Em relação à RDP, Jorge et al (2011) demonstraram que o uso de ranibizumabe, em paciente de RDP de alto risco, já panfotocoagulados e portadores de neovasos persistentes, trouxe diminuição significativa na área de vazamento na AGF e melhora na AV.

### Alfibercepte

O aflibercepte (EYLIA<sup>®</sup>, Bayer Pharma AG, Berlim-Alemanha) é uma proteína de fusão recombinante que consiste de porções de domínios extracelulares dos receptores 1 e 2 do VEGF humano, ligados à porção Fc da imunoglobulina (IgG1) humana, é produzido por tecnologia de DNA recombinante em células K1 de CHO e age como um receptor-isca solúvel que se liga ao VEGF-A e ao fator de crescimento placentário (PIGF) com afinidade maior que seus receptores naturais e, portanto, pode inibir a ligação e ativação desses

receptores cognatos de VEGF.

A segurança e eficácia de Eylia<sup>®</sup> (aflibercepte) foram analisadas em dois estudos randomizados, multicêntricos, duplo-cegos, controlados com pacientes com DMRI úmida. Um total de 2412 pacientes foram tratados e avaliados quanto à sua eficácia (1817 com Eylia<sup>®</sup> (aflibercepte) nos dois estudos (VIEW1 e VIEW2). Em ambos os estudos, o desfecho da eficácia primária foi a proporção de pacientes, estabelecida no protocolo, que mantiveram a visão, definido como perda menor que 15 letras de AV na semana 52, comparado ao período basal. Todos os grupos de tratamento com Eylia<sup>®</sup> (aflibercepte) demonstraram ser não-inferiores e clinicamente equivalentes ao grupo de ranibizumabe (SCHMIDT-ERFURTH et al., 2014). No tocante à RD, não existem dados na literatura sobre o uso de aflibercepte para a forma proliferativa dessa doença.

### 1.6. Justificativa do estudo

Segundo o exposto até aqui, fica evidente que a RD configura causa importante de perda visual.

Este estudo foi desenhado para melhorar o entendimento sobre as alternativas de tratamento da RDP de alto risco, com associação da PRP e os agentes antiangiogênicos. Nesse contexto, esta investigação inclui avaliação estrutural da retina (área de neovasos) e funcional (eletrorretinografia) antes e depois do tratamento.

2. Objetivos

# 2.1. Objetivo geral

 Avaliar comparativamente os efeitos terapêuticos e alterações funcionais e estruturais da retina da fotocoagulação a LASER com e sem a associação de injeções intravítreas de ranibizumabe, em pacientes portadores de RD com características de alto risco de perda visual.

# 2.2. Objetivos específicos

- Quantificar e comparar os efeitos das modalidades terapêuticas nas seguintes medidas:
  - área total de vazamento dos neovasos na AGF;
  - espessura macular medida por OCT;
  - AV;
  - ERG para inferir sobre as principais alterações funcionais causadas pela patologia, e suas mudanças após a terapia.

3. Casuística e Métodos

## 3.1. Desenho do estudo

Foi realizado estudo prospectivo, randomizado e aberto, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), Processo nº 11976/2008 (Anexo A), assim como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo B).

## 3.2. Elegibilidade dos pacientes

Entre fevereiro e dezembro de 2009, pacientes avaliados pelo Serviço de Retina e Vítreo do HCFMRP-USP, que apresentavam RDP com características de alto risco e que não tivessem sido submetidos a nenhum tratamento prévio para retinopatia foram convidados para participar do estudo. Os procedimentos e as avaliações do estudo foram desempenhados por um único especialista.

## 3.2.1. Critérios de inclusão

- 1. Pacientes com idade maior ou igual a 18 anos e portadores de RDP com características de alto risco;
- 2. AV maior que 20/800 (0,025) no olho do estudo;
- Ausência de tratamento a laser, cirúrgico, ou com medicação antiangiogênica prévios para RD;
- 4. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido por escrito devidamente assinado.

## 3.2.2. Critérios de exclusão:

- 1. História de Vitrectomia via pars plana no olho de estudo;
- História de eventos trombo-embólicos (infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral);
- 3. Hipertensão arterial descontrolada;

- Outras afecções oculares pré-existentes que levassem à baixa de visão ou interfirissem no resultado do tratamento;
- História de cirurgia realizada nos últimos seis meses, ou planejada nos próximos 28 dias;
- Condições médicas ou psicológicas que impedissem o paciente de concluir o estudo ou assinar o Termo de Consentimento informado, inclusive o uso abusivo de álcool ou drogas;
- Doença sistêmica que, na opinião do investigador, pudesse excluir o paciente do estudo;
- 8. Impedimento de qualquer procedimento de documentação;

# 3.3. Plano de trabalho

Os pacientes que se encaixaram nos critérios de inclusão e exclusão, foram divididos em dois grupos:

- Grupo A (PRP+Plus): pacientes submetidos à PRP a laser associado com injeção intravítrea de ranibizumabe (IVR).
- Grupo B (PRP): pacientes submetidos à PRP a laser (tratamento padrão).

## Grupo A (PRP+Plus)

- Visita de triagem\* (critérios de inclusão e exclusão), seleção do paciente;
- Dia 0 Primeiro episódio da sessão de PRP e IVR;
- Semana 2 segundo episódio de laser completando a sessão de PRP;
- · Semana 16 Reavaliação oftalmológica\*\*, IVR;
- Semana 32 Reavaliação oftalmológica\*\*, IVR;
- Semana 48 Reavaliação oftalmológica\*\*, computação final dos dados.

### Grupo B (PRP)

- Visita de triagem\* (critérios de inclusão e exclusão), seleção do paciente;
- Dia 0 Primeiro episódio de laser da sessão de PRP;
- Semana 2 Segundo episódio de laser completando a sessão de PRP;
- Semana 16 Reavaliação oftalmológica\*\*, complementação de laser caso necessário.
- Semana 32 Reavaliação oftalmológica\*\*, complementação de laser caso necessário;
- Semana 48- Reavaliação oftalmológica\*\*, computação final dos dados.

\*A visita de triagem de ambos os grupos constou da medida da melhor Acuidade Visual Corrigida (MAVC), estabelecida pelo ETDRS (1985), biomicroscopia do segmento anterior, tonometria de aplanação com tonômetro de Goldmann, mapeamento de retina, AGF, OCT e ERG.

\*\*As reavaliações oftalmológicas incluíram a medida da MAVC estabelecida pelo ETDRS, biomicroscopia do segmento anterior, tonometria de aplanação com tonômetro de Goldmann, mapeamento de retina, AGF, OCT e ERG, sendo este realizado apenas na última reavaliação (semana 48).

O quadro abaixo e a Figura 8 ilustram o plano de trabalho para cada paciente.

Visita	1	2	3	4	5	6
Semana	-1	0	2	16	32	48
Avaliação geral*	х			х	х	х
ОСТ	х			х	х	х
ERG	Х					х
Angiofluoresceinografia	Х			х	х	х
A) Ranibizumabe + Laser		x # O	Ω	O#	O#	
B) Laser		x #	Ω	¤#	¤#	

Quadro 1: Plano de trabalho para cada paciente.

\* Acuidade Visual (ETDRS), Tonometria de aplanação, biomicroscopia de fundo, retinografia, biomicroscopia de seguimento anterior e tomografia de coerência óptica.

# Laser focal ou em grade de acordo com as normas do ETDRS poderá ser realizado em pacientes de ambos os grupos para o tratamento de edema macular clinicamente significativo em todas as avaliações.

**¤** Laser entre marcas se neovasos ativos na angiofluoresceinografia.

 $\Omega$  Laser (segundo episódio, completando a sessão de panfotocoagulação tipo full scater).

O Ranibizumabe.



Figura 8: Fluxograma ilustrando o plano de trabalho para cada paciente.
 \*Cada reavaliação incluiu MAVC, mapeamento de retina, tonometria, AGF e OCT. #LASER focal ou em grade, de acordo com as normas do ETDRS, podendo ser realizado em pacientes de ambos os grupos para o tratamento de EM clinicamente significativo.

### 3.4. Métodos de Avaliação

**AV:** (Tabela logMAR ETDRS) com a melhor correção, segundo a padronização recomendada pelo ETDRS (1985).

**Biomicroscopia com Lâmpada de Fenda (BIO):** analisando todo o segmento anterior, incluindo a análise de possível opacificação do cristalino utilizando o Sistema de Classificação de Opacificação do Cristalino III (CHYLACK et al., 1993).

**PIO:** medida por meio de tonômetro de aplanação de Goldmann.

**Mapeamento de retina:** realizado com lente de 20 Dioptrias (Volk) com oftalmoscópio binocular indireto Topcon.

**Retinografia e Angiofluoresceinografia (AGF):** foram utilizados os retinógrafos digitais Topcon TRC-50IA-IMAGEnet; Tokyo, Japan e HRA-OCT; Heidelberg, Gemany. A angiografia foi obtida utilizando-se injeção de 2,5 ml de fluoresceína a 20% na veia antecubital com técnica padronizada em ambos os olhos, com enfoque no olho de estudo, para fornecer evidência angiográfica de decréscimo de atividade neovascular. As imagens para comparação foram obtidas entre um minuto e meio e dois minutos e meio após a injeção do contraste. As áreas de vazamento do contraste decorrentes de neovascularização de retina e disco óptico, as quais foram aferidas em mm<sup>2</sup> e somadas para cada fundo de olho de cada paciente, utilizando-se metodologia já descrita em estudos prévios (JORGE et al., 2006; TONELLO et al., 2008) e pelo *software* do próprio HRA-OCT; Heidelberg, Gemany.

**Tomografia de coerência óptica (OCT):** obtida pelo OCT Stratus model 3.0 *software* (Carl Zeiss Meditec) e realizada no programa de medida da espessura da retina (retinal thickness), sendo o cursor colocado, de acordo com a fixação do paciente ou manualmente, no centro da fóvea, quando a depressão foveal fosse visível. A estratégia para análise utilizada foi o mapa de espessura macular (macular thickness map), mensurada na região central da retina. **Exames laboratoriais:** foram mensuradas a HbA1c e glicemia de jejum no pré e pós-tratamento (Método Certificado pelo NGSP - "National Glycohemoglobin Standardization Program", Valor de Referência= 4,1 a 6,5%).

Eletroretinografia de campo total (ERG): para a aquisição do ERG, foram utilizados eletrodos tipo DTL (DAWSON; TRICK; LITZKOW, 1979), posicionados em contato com o globo ocular (Figura 9), eletrodos de pele nas têmporas como referência e no braço com terra.



Figura 9: Eletrodo DTL posicionado no olho de voluntário.

Em ambos os olhos foram instilados colírios de Tropicamida 0,5% e Fenilefrina 5%, para dilatação pupilar e os pacientes posicionados no escuro por (no mínimo) 25 minutos. O protocolo utilizado para estimulação luminosa, aquisição e tratamento do sinal elétrico e avaliação dos dados seguiu o padrão sugerido pela Sociedade Internacional de Eletrofisiologia da Visão (ISCEV -International Society for Electrophysiology of Vision) (MARMOR; ZRENNER, 1998) (Figura 10).



Figura 10: Exemplos de formas de ondas das respostas elétricas registradas no protocolo padrão internacional de eletrofisiologia da visão (ISCEV). (Adaptado de MARMOR; ZRENNER, 1998).

Esse protocolo recomenda o registro da resposta retiniana em cinco etapas, das quais três são realizadas em estado de adaptação ao escuro e duas após a adaptação à luz, como descrito abaixo:

- a) Onda-b dos bastonetes (rod b-wave): é registrada usando-se um flash curto (de 4 a 10 ms) de luminância, menor do que a do limiar dos cones (-4 a -3 log cd.s/m²), apresentado após 20 a 40 minutos de adaptação ao escuro. A resposta, em olhos saudáveis, mostra uma onda-b de amplitude da ordem de 300 µV e latência em torno de 100 ms. É utilizada na avaliação da via dos bastonetes e suas células bipolares.
- b) Resposta máxima combinada (RC) (maximum response): é registrada logo após a etapa anterior (onda-b dos bastonetes) usando-se um *flash* curto (4 a 10 ms) de luminância, maior do que a do limiar dos

cones (entre 0 a 1 log cd.s/m<sup>2</sup>). Portanto, a resposta elétrica constitui a somatória das vias dos bastonetes e cones. Sua forma apresenta uma onda-a com amplitude de 300  $\mu$ V e latência de 10 a 30 ms seguida por uma onda-b de amplitude da ordem de 600  $\mu$ V e latências de 60 a 80 ms. Os POs podem ser observados sobrepondo a fase ascendente da onda-b.

- c) POs: estímulo idêntico ao da CR, porém filtrado entre 75 e 200 Hz para se isolarem os Pos. Esta resposta possui três a quatro picos de amplitude em torno de 40 µV e latência de cerca de 40 ms.
- d) Resposta dos cones (cone ERG): após adaptação à luminância suficiente para saturar a resposta elétrica dos bastonetes (34 cd/m² por 10 minutos), a resposta da via retiniana dos cones é registrada por um *flash* de luz de 4 ms de duração e 0 a 1 log cd.s/m² de luminância. Esse estímulo gera uma resposta rápida, com uma pequena onda-a seguida por outra onda-b de amplitude em torno de 150 μV e latência de 30 ms.
- e) 30 Hz *Flicker*: registrado após a resposta dos cones, consiste em um estímulo de mesma luminância e duração, porém repetido com frequência de 30 Hz, produzindo resposta elétrica retiniana da mesma frequência e amplitude da ordem de 100 μV.

O aparelho utilizado foi o Espion-E2 (Diagnosys LLC), acoplado no gerador de estímulo luminoso ColorDome (Diagnosys LLC). Neste estudo, optou-se por uma série de *flashes* de luz com intensidade crescente (de 0,001 até 0,1 cd.s/m<sup>2</sup> incluindo ROD-response - 0,01cd.s/m<sup>2</sup>), durante o estado de adaptação ao escuro, para permitir a estimativa dos parâmetros da equação de Naka-Rushton (equação 1) (NAKA; RUSHTON, 1966). A V<sub>max</sub> (amplitude de saturação da ondab) e K (luminância necessária para saturar metade da onda-b), consideradas para avaliação da sensibilidade escotópica da retina.

Equação 1. 
$$V(I) = \frac{V_{\text{max}}.I^n}{k^n + I^n}$$

Onde V é a amplitude em  $\mu$ V, Vmax é o parâmetro que define a amplitude de saturação, I é a luminância, k é a luminância necessária para atingir 50% da Vmax e n é um parâmetro adimensional que se relaciona com a inclinação da curva, e não será apresentado neste estudo. Posteriormente, respostas aos estímulos de 3 cd.s/m<sup>2</sup>, chamado de RC, e ao estímulo de 10 cd.s/m<sup>2</sup>, denominado de alta intensidade (AI), gravados para permitir a avaliação da ondaa-, b- e dos POs. Os POs foram analisados após filtro de frequência *off-line* passa-faixa, com *cut-off* inferior de 75 e superior de 100 Hz. Após essa fase, os olhos foram adaptados ao claro durante 10 minutos utilizando a cúpula de campo total acesa com luz branca (6500K) de 30 cd.s/m<sup>2</sup>, e em seguida a resposta de cone simples (3,0 cd.s/m<sup>2</sup>; com fundo de de 30 cd.s/m<sup>2</sup>) e a 30 Hz (3 cd.s/m<sup>2</sup> a 30 Hz; com fundo de de 30 cd.s/m<sup>2</sup>) foram registrados.

### 3.5. Procedimentos

### 3.5.1. Panfotocoagulação à LASER Full-Scatter

A PRP foi realizada segundo o ETDRS (1987b) em uma sessão dividida em dois episódios de 700-800 marcas cada um. Sendo tratada, primeiramente, a retina inferior e, posteriormente, a retina superior, totalizando entre 1400-1600 marcas, em todos os pacientes do estudo (Grupos A e B). O tratamento foi aplicado sob anestesia tópica com uma lente de fundo de contato (Mainster Standard, Ocular Instruments, Bellevue, California). O Laser usado foi de diodo de frequência duplicada de comprimento de onda 635 nm (diodo verde).

## 3.5.2. Panfotocoagulação adicional

A PRP adicional foi aplicada em pacientes do Grupo B, se detectada na AGF a presença de neovasos ativos. Constou de aplicações adicionais de Laser

entre as marcas antigas, num total de no mínimo 500 novas marcas, de acordo ETDRS (1987a).

### 3.5.3 Laser focal ou Laser em grade para edema macular diabético

Realizado no dia 0 e nas visitas das semanas 16 e 32 em ambos grupos, desde que constatado EMD clinicamente significativo, ou seja: 1) espessamento retiniano de 500 um do centro da mácula; 2) exsudatos duros dentro de 500 um do centro da mácula se associado de espessamento da retina adjacente; 3) zona ou zonas de espessamento retiniano com área de um diâmetro de disco (1,5  $\mu$ m), com pelo menos alguma parte estivesse dentro de um diâmetro de disco do centro da mácula. A aplicação de laser focal ou em grade (Grid) seguiu as normas do ETDRS (1985).

### 3.5.4. Injeção intravítrea de ranibizumabe

A aplicação do ranibizumabe foi realizada em ambiente cirúrgico no dia 0 e nas semanas 16 e 32 do estudo nos pacientes do grupo A. A medicação utilizada na dose de 0,05 ml (0,5 mg), com agulha de seringa descartável *BD Ultra-Fine*TM 29G, via *pars plana*, com anestesia tópica, a 3 mm do limbo em pseudo-fácicos ou afácicos e a 3,5 mm do limbo em fácicos. Após o procedimento, a perfusão do nervo óptico foi avaliada por oftalmoscopia indireta, quando possível, ou pela AV, considerando-se paracentese de câmara anterior em casos de má perfusão. Os pacientes foram instruídos a usar colírio antibiótico (moxifloxacino 0,5%) uma gota de três em três horas no olho submetido ao procedimento, iniciando 24 horas antes da injeção, para fins de profilaxia, e permanecendo por uma semana após a injeção (AIELLO et al., 2004).

### 3.6. Análise estatística

As comparações dos dados longitudinais foram realizadas usando-se twoway ANOVA, considerando-se "grupo" e "tempo" (visitas) como efeitos a serem investigados. Para as variáveis de distribuição não normal (testado com Shapiro-Wilke test), foi utilizado o teste não paramétrico Wilcoxon *signed-rank test* e entre os grupos Wilcoxon *rank-sum test*. As comparações entre os grupos não longitudinais, como HbAC, na visita inicial, foram realizadas com t-Test. As contagens de variáveis ordinais ou nominais (como gênero e raça) foram comparadas com o teste de *Likelihood Ratio*. Todas as análises consideraram p<0,05 como valor de significância e os dados apresentados em forma de médias ± EPM.

4. Resultados

Os resultados deste estudo serão mostrados em duas partes. A primeira parte (Resultados Acta), foca nos dados de área de neovasos, AV e OCT (FILHO et al., 2011), e a segunda parte (Resultados Documenta), aborda os dados eletrorretinográficos (MESSIAS et al., 2012). Essa divisão foi necessária, pois nem todos os pacientes concordaram com a realização do exame de ERG, pelo desconforto, ou pela duração elevada da avaliação.

### 4.1. Resultados Acta

#### 4.1.1. Evolução do estudo e adesão dos pacientes

Vinte e nove dos 40 participantes, incluídos inicialmente, completaram as 48 semanas de seguimento. No grupo PRPplus, um participante faleceu devido a infarto agudo do miocárdio, e dois participantes não retornaram para a reavaliação na semana 16 do estudo (semana 16: n=17). Entre as semanas 16 e 32 mais um participante perdeu o seguimento (semana 32: n=16) e após a semana 32 outro faleceu (semana 48: Grupo PRPplus n=15 pacientes). No grupo PRP, um participante foi excluído do estudo, pois evoluiu com descolamento de retina tracional, um faleceu e dois participantes não retornaram para o seguimento na semana 16 (semana 16: n=16). Entre as semanas 16 e 32, um participante foi excluído do estudo, pois desenvolveu hemorragia vítrea (semana 32: n=15); e após a semana 32, outro faleceu (semana 48: Grupo PRP n=14).

Todos os participantes do Grupo PRPplus foram retratados com IVR, e todos do grupo PRP necessitaram de retratamento com fotocoagulação a laser nas semanas 16 e 32. As características demográficas dos participantes de ambos os grupos estão sumarizadas na Tabela 1. A média de idade foi maior no grupo PRP, comparado com o grupo PRPplus (p=0,0036), não sendo encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos, no que diz respeito aos níveis de HbA1c e duração do DM.

	PRP	PRP plus	Р
ldade (± dp, em anos)	$63,3 \pm 2,5$	50,5 ± 3,0	0,0036 (t-test)
Gênero (homem/mulher)	9/5	9/6	0,8120 (Likelihood Ratio)
Raça (negro/latino/branco)	3/7/4	2/7/6	0,7522 (Likelihood Ratio)
Tempo de Diabetes (média ± DP; anos)	13,1 ± 2,3	17,0 ± 2,5	0,2577 (t-test)
Tratamento (AHO/insulina)	2/12	3/12	0,6829 (Likelihood Ratio)
HbA1c (média ± dp)	9,3 ± 1,2	9,4 ± 0,8	0,7821 (t-test)

 Tabela 1: Características demográficas dos grupos.

HbA1c= hemoglobina glicosilada.

Não foi observado nenhum efeito adverso grave relacionado com a medicação nos 20 participantes tratados com ranibizumabe neste estudo. Em geral, a injecão intravítrea como procedimento foi bem tolerado e não foram detectados sinais de uveíte, endoftalmite ou toxicidade ocular. Além disso, não houve desenvolvimento de catarata ou aumento nos níveis de PIO nos olhos tratados com IVR nas 48 semanas do estudo. Efeitos colaterais relacionados com o procedimento, como hemorragia subconjuntival, sensação de corpo estranho foram relatados em 25% (5/20), 29% (5/17), e 31% (5/16) pelos pacientes nas semanas 0, 16 e 32, respectivamente. Foram eventos transitórios e resolvidos em até uma semana após a injeção em todos os pacientes.

### 4.1.2. Área de vazamento de fluoresceína

Não houve diferença estatisticamente significativa na área de vazamento de fluoresceína secundária à neovasos ativos na angiografia fluorescente (FLA área), em mm<sup>2</sup>, entre os grupos PRPplus e PRP na visita inicial. A média  $\pm$  erropadrão da média (EPM) de FLA área foi de 9,0  $\pm$  13 mm<sup>2</sup> no grupo PRP e 11,7  $\pm$  13 mm<sup>2</sup> no grupo PRPplus (p=0,1502; *t-test*). Foi observada redução significativa na FLA área comparando a visita inicial com os valores encontrados nas semanas 16, 32 e 48 em ambos os grupos (p<0,05). A comparação intragrupo mostrou

redução significativamente maior na FLA área na semana 48 no grupo PRPplus em comparação com o grupo PRP (p=0,0291) e também redução maior nas semanas 16 e 32 (p<0,1) (Figura 11 e Tabela 2).



**Figura 11:** Distribuição das diferenças intraindividuais da área total (mm<sup>2</sup>) de vazamento de fluoresceína de neovasos ativos entre os valores medidos na visita inicial e nas semanas 16, 32 e 48 após o tratamento.

### 4.1.3. Melhor acuidade visual corrigida (MAVC)

Não houve diferença estatisticamente significativa na MAVC entre os grupos PRPplus e PRP na visita inicial. A média de MAVC (expresso como logarítimo de mínimo ângulo de resolução: logMAR) foi de  $0,31 \pm 0,05$  logMAR no grupo PRP e  $0,27 \pm 0,06$  logMAR no grupo PRPplus (p=0,6645). Houve aumento de 0,08 logMAR (correspondente à perda de aproximadamente uma linha na

Tabela ETRDS) entre a visita inicial e as semanas 16, 32 e 48 após o tratamento no grupo PRP (p<0,05), enquanto no grupo PRPplus não foi observada mudança estatisticamente significativa em nenhuma das visitas do estudo (p>0,05). A análise entre os grupos demonstrou diferença significativa entre PRPplus e PRP nas semanas 32 e 48 (p<0,05) (Figura 12 e Tabela 2).



Figura 12: Distribuição das diferenças intraindividuais da Melhor Acuidade Visual Corrigida (MAVC) em logMAR entre os valores medidos na visita inicial e nas semanas 16, 32 e 48 após o tratamento.

### 4.1.4. Espessura do subcampo macular no OCT (ESM)

Não foi encontradao diferença estatisticamente significativa na ESM entre os grupos PRPplus e PRP na visita inicial. A média de ESM foi de 216,0  $\pm$  10,7  $\mu$ m no grupo PRP e 249,4  $\pm$  36,1  $\mu$ m no grupo PRPplus (p=0,3925), mas houve

aumento estatisticamente significativo na ESM, de aproximadamente 20%, após o tratamento no grupo PRP (p<0,05), enquanto que tendência à diminuição na ESM, de aproximadamente 5%, foi constatada em todas as visitas do grupo PRPplus (p<0,05) (Figura 13 e Tabela 2).



**Figura 13:** Distribuição das diferenças intraindividuais (Visita inicial e nas semanas 16, 32 e 48 após o tratamento). Espessura do subcampo macular no (μm).

	Semana	PRP	PRPplus	Entre grupos P (Wilcoxon)
	16	-2,4 ± 0,4 <i>(0,0003)</i>	-3,9 ± 0,4 (<0,0001)	0,0548
FLA	32	-3,1 ± 1,0 <i>(0,0067)</i>	-5,2 ± 0,6 (<0,0001)	0,0887
	48	-2,9 ± 1,3 <i>(0,0083)</i>	-5,8 ± 0,7 (<0,0001)	0,0291
	16	0,06 ± 0,03 <i>(0,0625)</i>	0,00 ± 0,01 <i>(0,5000)</i>	0,1142
MAVC	32	0,08 ± 0,03 <i>(0,0078)</i>	-0,01 ± 0,02 <i>(0,5000)</i>	0,0216
	48	0,08 ± 0,03 <i>(0,0078)</i>	0,00 ± 0,02 <i>(0,5000)</i>	0,0243
	16	34,4 ± 29,6 <i>(0,0085)</i>	-14,2 ± 36,9 <i>(0,0188)</i>	0,4706
ESM	32	54,7 ± 36,8 <i>(0,0025)</i>	-13,6 ± 41,8 <i>(0,0820)</i>	0,1897
	48	18,1 ± 9,4 <i>(0,0043)</i>	-14,7 ± 39,1 <i>(0,0</i> 698)	0,7106

Tabela 2: Média das diferenças intraindividuais (valores encontrados após o tratamento menos a visita inicial) para FLA área, MAVC, ESM em ambos os grupos e em todas as visitas do estudo. A coluna da direita mostra os valores do p para análise das comparações entre os grupos usando Wilcoxon *rank-sum test*.

### 4.2. Resultados Documenta

Vale ressaltar que nem todos os pacientes concordaram em realizar o ERG. No grupo PRP, dos 14 pacientes que completaram as 48 semanas apenas nove aceitaram, enquanto que no grupo PRPplus, dos 15 pacientes que completaram o estudo, 11 concordaram com a realização do ERG. Em tempo, os dados de ERG foram comparados com o grupo controle, formado por 15 indivíduos no mesmo intervalo de idade dos grupos de pacientes. Nessa amostra de pacientes avaliados com ERG, a média de disparos de laser ao final do estudo (semana 48), foi de 2.736  $\pm$  93 (2,620-2,884) no grupo PRP, que como esperado, foi muito superior à realizada no grupo PRPplus: 1636  $\pm$  96 (1494-1800) (p=0,0001). Os dados demográficos da sub amostra estão resumidos na Tabela 3.
	PRP	PRP plus	Р
ldade (± dp, em anos)	64 ± 8	59 ± 12	0,7522 (t-test)
Gênero (homem/mulher)	5/4	6/5	0,9640 (Likelihood Ratio)
Raça (negro/latino/branco)	1/5/3	1/6/4	0,9831 (Likelihood Ratio)
Tempo de Diabetes (média ± DP; anos)	13 ± 9	14 ± 6	0,6330 (t-test)
Tratamento (AHO/insulina)	1/8	1/10	0,8812(Likelihood Ratio)
HbA1c (média ± dp)	9 ± 1	9 ± 1	0,4315 (t-test)

 Tabela 3: Características demográficas da subamostra do ERG.

#### 4.2.1. ERG adaptado ao escuro na visita inicial

O ERG adaptado ao escuro revelou intensa diminuição na amplitude das ondas a e b dos pacientes com RD, se comparado aos controles. Isso foi observado para a resposta de bastonetes (0,01 cd.s/m<sup>2</sup>), a RC (MC - 3,0 cd.s/m<sup>2</sup>), e alta intensidade (AI - 10,0 cd.s/m<sup>2</sup>). Não houve diferença significativa entre PRP e PRPplus na visita inicial (Tabela 4 e Figuras 14 e 15).

O parâmetro V<sub>max</sub> (amplitude de saturação da onda-b) foi significativamente menor nos grupos PRP e PRPplus do que nos controles (ANOVA; p<0,05), e o parâmetro k (luminância necessária para atingir metade da onda-b de saturação) foi maior nos grupos PRP e PRPplus do que nos controles, porém aqui também não houve diferença estatisticamente significativa para esses dois parâmetros entre PRP e PRPplus. Salvo o tempo implícito da onda-a para a resposta de alta intensidade, os tempos implícitos das ondas-a e b dessas respostas do ERG adaptado ao escuro encontraram-se aumentados guando comparados com os olhos do grupo controle (Tabela 4 e Figuras 14 e 15). As disparidades entre olhos com RDP e olhos do grupo controle em relação aos tempos implícitos do ERG foram maiores para estímulos de menor luminância, indicando tendência para forte deterioração dos potenciais gerados pela via dos bastonetes em RDP. A amplitude dos POs encontraram-se dramaticamente reduzidas nos grupos PRP e PRPplus quando comparados com o grupo controle. Não houve diferença significativa na amplitude dos POs entre os grupos PRP e PRPplus (Tabela 4 e Figuras 14 e 15).

Tabela	4:	Respostas	do	ERG	adaptado	ao	escuro	na	visita	inicial.	Média	a ±	EPM	das
		amplitudes	е	tempo	implícito	da	s respo	stas	s de l	bastone	tes (0	),01	cd.s/	′m²),
		máxima coi	mbi	nada (	3,0 cd.s/m	<sup>2</sup> ) e	alta int	ensi	dade	(10,0 cc	1.s/m²)	).		

	cd.s/m <sup>2</sup>	Controle	PRP	PRPplus	P (ANOVA)
Onda-a	3	324,7 ± 13,0	206,2 ± 23,8	233,3 ± 20,6	<,0001
amplitude (µV)	10	392,4 ± 14,7	275,8 ± 26,8	306,5 ± 23,2	0,0003
Onda-a	3	15,6 ± 0,2	$20,2 \pm 0,4$	19,8 ± 0,4	<,0001
Tempo implicito (ms)	10	12,8 ± 0,2	$16,4 \pm 0,4$	$15,9 \pm 0,4$	<,0001
• • •	0,01	373,1 ± 17,1	178,7 ± 31,2	206,2 ± 27,0	<0,0001
Onda-b amplitude (uV)	3	556,8 ± 24,2	337,2 ± 44,1	362,8 ± 38,2	<0,0001
	10	581,6 ± 23,3	369,6 ± 42,6	401,2 ± 36,9	<0,0001
	0,01	83,8 ± 1,7	104,3 ± 3,1	101,7 ± 2,7	<0,0001
Onda-b Tempo implícito (ms)	3	49,6 ± 1,0	53,1 ± 1,7	53,8 ± 1,5	0,0387
	10	50,0 ± 1,3	55,0 ± 2,3	52,6 ± 2,0	0,1439
	3	790,4 ± 24,8	213,2 ± 45,2	255,3 ± 39,2	<0,0001
PO (µV,ms)	10	945,4 ± 33,7	272,8 ± 61,6	363,2 ± 53,4	<0,0001

Células em cinza indicam valores com diferenças estatisticamente significativas (Tukey-Kramer HSD; p<0,05). PO= Potenciais oscilatórios; PRP= Panfotocoagulação.



Figura 14: Respostas do ERG adaptado ao escuro na visita inicial. Média e intervalo de confiança de 95% das repostas dos grupos: controle (verde), PRP (vermelho), PRPplus (azul). Em A, B e C evidenciando parâmetros Vmax e K. A partir de D até H, estão representados: amplitude da onda b, tempo implícito da onda b, amplitude da onda a, tempo implícito da onda a e potenciais oscilatórios, respectivamente.



Figura 15: Respostas do ERG adaptado ao escuro na visita inicial. Exemplos das respostas de um paciente de cada grupo. Verde para o grupo controle, vermelho para o grupo PRP e azul para o grupo PRPplus.

#### 4.2.2. ERG adaptado à luz na visita inicial

A amplitude da onda-b dos cones e o *flicker* de 30 Hz estavam reduzidos enquanto 30 Hz tempo implícito e o tempo implícito da onda-b estavam prolongados nos grupos PRP e PRPplus, comparados com o grupo controle, mas não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos PRP e PRPplus para esses valores na visita inicial. (Figuras 16 e 17 e Tabela 5).



Figura 16: Respostas do ERG adaptado ao claro na visita inicial. Média e intervalo de confiança de 95% das repostas dos grupos: controle (verde), PRP (vermelho), PRPplus (azul). Cada gráfico evidenciando as respostas sobre os estímulos: amplitude em 30Hz, Cone ERG (amplitude da onda-b), 30 Hz tempo implícito, *flash* simples dos cones (tempo implícito da onda-b).



- Figura 17: Respostas do ERG adaptado ao claro na visita inicial. Exemplos das respostas de um paciente de cada grupo. Verde para o grupo controle, vermelho para o grupo PRP e azul para o grupo PRPplus.
- Tabela 5: Respostas do ERG adaptado ao claro na visita inicial. Média ± EPM das amplitudes e tempos implícitos em 30Hz, Cone ERG (amplitude da onda-b), 30 Hz tempo implícito, *flash* simples dos cones (tempo implícito da onda-b).

	Controle	PRP	PRPplus	P (ANOVA)
30Hz amplitude (µV)	142.6 ± 6.2	59.5 ± 10.7	90.7 ± 6.5	<0.0001
30Hz tempo implícito (ms)	26.6 ± 0.2	34.8 ± 1.1	34.3 ± 0.9	<0.0001
Onda-b - Amplitude (µV)	191.5 ± 9.1	78.7 ± 12.2	101.3 ± 8.5	<0.0001
Onda-b - Tempo implícito (ms)	30.0 ± 0.2	35.9 ± 0.5	35.3 ± 0.7	<0.0001

Células em cinza indicam valores com diferenças estatisticamente significativas na comparação dos grupos. (Estímulos: 30 Hz: 3.0 cd.s/m<sup>2</sup> a 30 Hz; e resposta do Cone: 3.0 cd.s/m<sup>2</sup>)

# 4.2.3. Diferenças entre os Grupos PRP e PRPplus após tratamento no ERG adaptado ao escuro

Em geral, nos grupos PRP e PRPplus houve redução nas amplitudes do ERG e aumento nos tempos implícitos, mas apesar da considerável diferença entre os grupos quanto ao número de disparos de laser (média de disparos de laser: PRP = 2,700; PRPplus = 1600), apenas alguns parâmetros demonstraram diferenças funcionais entre os grupos PRP e PRPplus. A amplitude da onda-b dos bastonetes foi significativamente reduzida para 46 ± 5% (p<0,05) do valor da visita inicial no grupo PRP, e em 64 ± 6% (p<0,05) no grupo PRPplus. Essa redução foi significativamente maior no grupo PRP quando comparado com o grupo PRPplus (p=0,0242). Resultados similares foram encontrados na amplitude da RC, com redução na semana 48 quando comparada com a visita inicial de 45 ± 4% no grupo PRP e 62 ± 5% no grupo PRPplus. A diminuição na amplitude de RC também foi significativamente maior no grupo PRPplus (p=0,0094) (Figura 17 e Tabela 6). A RC da onda-a e os POs mostraram significativa diminuição em ambos os grupos (Figura 17 e Tabela 6), mas sem diferença significativa na análise entre os grupos. Para todas as respostas, os tempos implícitos da onda-b estavam significativamente aumentados após o tratamento com PRP ou na associação de PRP com ranibizumabe, mas não houve diferença significativa na análise entre os grupos. Por outro lado, os tempos implícitos da onda-a não mostraram mudanças significativas após o tratamento com ambos os regimes. (Tabela 6 e Figuras 18 e 19).

Tabela 6: Média ± EPM da relação intraindividual da visita inicial da amplitude das ondasa e b e potenciais oscilatórios (PO) e da relação intraindividual da visita inicial dos tempos implícitos para a resposta do ERG adaptado ao escuro. (ROD: 0.01 cd.s/m<sup>2</sup>, CR: 3.0 cd.s/m<sup>2</sup>, e Resposta AI: 10.0 cd.s/m<sup>2</sup>).

	cd.s/m <sup>2</sup>	PRP	PRPplus	P (entre grupos)
Amplitude da onda-a	3	0.46 ± 0.07	$0.49 \pm 0.06$	0.3590
(relação visita inicial)	10	$0.48 \pm 0.06$	0.50 ± 0.05	0.3878
Tempo implícito da onda-a	3	0.78 ± 0.36	0.17 ± 0.21	0.9158
(diferença da visita inicial em ms)	10	0.67 ± 0.44	0.25 ± 0.30	0.7755
	0.01	0.46 ± 0.05	0.64 ± 0.06	0.0119
Amplitude da onda-b	3	$0.45 \pm 0.04$	$0.62 \pm 0.05$	0.0053
(relação visita micial)	10	$0.46 \pm 0.05$	0.59 ± 0.03	0.0254
	0.01	8.89 ± 3.11	7.92 ± 2.57	0.5937
Tempo implícito da onda-b	3	7.33 ± 2.03	6.75 ± 1.63	0.5873
(unerença da visita inicial em ins)	10	7.00 ± 1.49	5.17 ± 1.17	0.8265
	3	0.67 ± 0.07	0.69 ± 0.13	0.4456
OP (relação da visita inicial)	10	$0.63 \pm 0.06$	$0.60 \pm 0.09$	0.5849

Células em cinza escuro indicam valores sem alterações estatisticamente significativas dentro de cada grupo, após o tratamento, enquanto que células em cinza claro mostram mudança estatisticamente significativa (Tukey-Kramer HSD; p<0.05).



**Figura 18:** Efeitos do tratamento no ERG adaptado ao escuro. Exemplos de um paciente do grupo PRP (vermelho) e um do grupo PRPplus (azul). Linhas pontilhadas mostram respostas na visita inicial e linhas contínuas as respostas nas semanas 48 para os estímulos: ROD: 0,01 cd.s/m<sup>2</sup>, CR: 3,0 cd.s/m<sup>2</sup>, AI: 10,0 cd.s/m<sup>2</sup>.



**Figura 19:** Efeitos do tratamento no ERG adaptado ao escuro. Gráficos mostrando as respostas para: amplitude da onda-b, tempo implícito da onda-b, amplitude da onda-a, tempo implícito da onda-a e potenciais oscilatórios para cada estímulo: ROD: 0,01 cd.s/m<sup>2</sup>, CR: 3,0 cd.s/m<sup>2</sup>, AI: 10,0 cd.s/m<sup>2</sup>.

#### 4.2.4. Diferenças entre os Grupos PRP e PRPplus após tratamento no ERG adaptado ao claro

As amplitudes da onda-b dos cones e do *flicker* de 30 Hz mostraram significativa redução em relação à visita inicial (p < 0,05) (Tabela 7 e Figuras 19 e 20), mas não foram observadas diferenças na análise entre os grupos. O tempo implícito do flicker de 30 Hz não mostrou mudanças significativas após o

tratamento com PRP ou na associação de PRP com ranibizumabe, enquanto que o tempo implícito da onda b dos cones estava significativamente aumentado após o tratamento em ambos os grupos (Tabela 7 e Figuras 20 e 21).

**Tabela 7:** Média ± EPM da relação da visita inicial das amplitudes e tempos implícitos das respostas do ERG adaptado ao claro. (Estímulos = 30Hz: 3,0 cd.s/m<sup>2</sup> a 30 Hz e resposta cones: 3,0 cd.s/m<sup>2</sup>).

	PRP	PRPplus	P (entre grupos)
30 Hz amplitude (relação visita inicial)	0.45 ± 0.07	0.40 ± 0.04	0.7036
30 Hz tempo implícito (diferença da visita inicial em ms)	1.00 ± 0.93	0.45 ± 0.58	0.6863
Amplitude da onda-b (relação visita inicial)	2.00 ± 0.58	1.36 ± 0.45	0.7991
Tempo implícito da onda-b (diferença da visita inicial em ms)	0.45 ± 0.06	0.49 ± 0.05	0.3161

As células em cinza indicam valores sem diferenças estatisticamente significativas nos grupos após o tratamento.



Figura 20: Efeitos do tratamento no ERG adaptado ao claro. Exemplos de respostas do ERG adaptado ao claro de um paciente do grupo PRP (vermelho) e de um do grupo PRPplus (azul). Linhas pontilhadas mostram respostas da visita inicial e linhas contínuas respostas da semana 48 para estímulos de 30 Hz e resposta dos cones.



Figura 21: Efeitos do tratamento no ERG adaptado ao claro. (A) 30 Hz amplitude;
(B) amplitude da onda-b; (C) 30 Hz tempo implícito; (D) tempo implícito da onda-b. Círculos e linhas em vermelho mostram respostas do grupo PRP e em azul do grupo PRPplus.

5. Discussão

Os resultados deste estudo sugerem que as duas modalidades terapêuticas testadas: PRP e PRP associada com IVR causam significativa redução no vazamento de neovasos ativos na AGF (FLA área) em pacientes com RD com características de alto risco, sendo que, o uso de IVR foi associado com maior redução em FLA.

Esses dados estão em concordância com estudo anterior, que também revelou significativa redução na FLA área nas semanas 1, 6, 12, 24, 36 e 48, em pacientes portadores de RDP de alto risco tratados com ranibizumabe. Diferentemente, no estudo de 2011, os pacientes foram tratados com PRP previamente, e os neovasos persistentes com a medicação intravítrea trimestralmente (JORGE et al., 2011).

Em outro estudo similar, comparou-se PRP *versus* PRP associado com bevacizumabe intravítreo em pacientes com RDP de alto risco. Nessa ocasião, a média da redução na FLA área encontrada no grupo tratado com associação de PRP e bevacizumabe foi de 6,7 mm<sup>2</sup> (11,2 mm<sup>2</sup> na avaliação inicial para 4,5 mm<sup>2</sup> na semana 16) (TONELLO et al., 2008), que é até maior do que média da redução na FLA área de 3,9 mm<sup>2</sup> (11,7 mm<sup>2</sup> na avaliação inicial para 7,8 mm<sup>2</sup> semana 16) observado no presente estudo no grupo PRPplus. Como esses estudos possuem o mesmo critério de inclusão, mas não foram conduzidos simultaneamente, especulou-se que o bevacizumabe associado com PRP pode ter efeito mais persistente na supressão do vazamento de neovasos ativos do que a associação entre PRP e ranibizumabe, pois a meia-vida do bevacizumabe intravítrea é maior do que a do ranibizumabe (BAKRI et al., 2007).

De acordo com o ETDRS, aproximadamente 60% dos pacientes com RDP respondem ao tratamento com PRP com regressão de neovasos em três meses (12 semanas) (ETDRS, 1987b; VANDER et al., 1991). Entretanto, no presente estudo e no estudo similar usando bevacizumabe (TONELLO et al., 2008), nenhum paciente apresentou regressão completa no vazamento de neovasos na semana 48 após a PRP. Acredita-se que a razão mais provável para este desfecho seja devido ao pobre controle glicêmico apresentado pelos pacientes do estudo e pelo comportamento mais agressivo da RD em pacientes com maior pigmentação de pele. De fato, nenhum paciente deste estudo apresentou nível de

HbA<sub>1c</sub> inferior a 7%. Além disso, em contraste com o ETDRS, a população do presente estudo foi composta, principalmente, por indivíduos latinos e negros, e como relatado por Emanuele et al. (2005), a severidade da RD foi maior nesses grupos étnicos.

Apesar de ambos os tratamentos estarem associados com significativa regressão dos neovasos ativos, nenhuma alteração na AV foi observada após o tratamento no grupo PRPplus, enquanto piora significativa na AV foi observada nos pacientes que receberam somente fotocoagulação a laser (grupo PRP). Analogicamente, em recente estudo (DRCRnet, 2010), observou-se que o IVR associado com laser focal ou em grade causa significativa melhora na acuidade, se comparado com os resultados obtidos no tratamento com laser focal ou em grade isoladamente em pacientes portadores de EMD.

No presente estudo, pacientes com EM clinicamente significativo, receberam laser focal ou em grade e IVR na visita inicial, enquanto que no estudo DRCRnet (2010) foi administrado IVR na visita inicial e o laser focal ou em grade após uma semana, ou possivelmente após 24 semanas, de acordo com critérios do estudo. Neste estudo, a maioria dos pacientes incluídos não era portadora de EM clinicamente significativo, e nesses, houve tendência para diminuição na espessura macular no grupo PRPplus, enquanto que aumento, estatisticamente significativo, na espessura macular foi encontrado nos pacientes do grupo PRP.

O provável mecanismo de redução do edema, com consequente preservação da função retiniana e melhora da AV, após o uso de IVR associado com PRP, é a estabilização da barreira hematorretiniana (ZHANG et al., 2006), visto que essa droga pode reduzir a presença de fluido intersticial na mácula ou mesmo o EM, que mesmo quando subclínico pode causar comprometimento funcional retiniano (BROWNING; FRASER; CLARK, 2008; RAMALHO et al., 2009).

Não houve diferença na PIO e na classificação de opacificação do cristalino entre os dois grupos ao longo de todo o estudo, e tampouco foi observada mudança significativa na PIO em qualquer visita. Esses resultados são coincidentes com os desfechos de outros estudos, não demonstrando aparente associação entre IVR e aumento da PIO, desenvolvimento ou progressão de

catarata, ou aumento na taxa de endoftalmite (AVERY et al., 2006; CHUN et al., 2006; DRCRnet, 2010; JORGE et al., 2006; MASON et al., 2008). Além disso, ocorreu progressão para RDP avançada apenas em pacientes do grupo PRP (um paciente evoluiu com descolamento de retina tracional e outro com hemorragia vítrea densa), mas conclusões relacionadas à segurança neste quesito são limitadas devido ao pequeno número de pacientes envolvidos.

Ao conhecimento dos autores, este é o primeiro estudo a reportar medidas eletrorretinográficas após associação de ranibizumabe e PRP. O principal objetivo da inclusão dessa metodologia no estudo foi investigar se o uso do IVR em combinação com PRP permite menor perda funcional da retina do que o tratamento com laser isoladamente.

Os dados aqui apresentados confirmam descrições prévias de alterações eletrorretinográficas em RDP como: redução das amplitudes das ondas-a e b, aumento nos tempos implícitos para respostas dos cones e bastonetes e uma dramática redução na amplitude dos POs (HOLOPIGIAN et al., 1997; TZEKOV; ARDEN, 1999). Além disso, a maior diferença entre os pacientes do estudo e os do grupo controle foi encontrada para a área sob a curva dos POs, indicando predominância de disfunção da retina interna sobre a dos fotorreceptores em olhos com RDP de alto risco.

O modelo de inter-relação entre a onda-b adaptada ao escuro e a luminância do estímulo mostra que a amplitude de saturação (parâmetro  $V_{max}$ ) é proporcionalmente mais reduzida do que está aumentada a luminância necessária para atingir metade da saturação (parâmetro k). De fato, já foram mostrados que outros parâmetros do ERG, como a razão da amplitude b/a (BRETON et al., 1989) e o tempo implícito da onda-b (CHUNG; KIM; KWAK, 1993), podem ser mais sensíveis que o parâmetro k. Provavelmente, o parâmetro k indica quanto de luz é necessário para que as células remanescentes sejam estimuladas, e se essas estiverem em bom funcionamento, esse parâmetro não será alterado. Em contrapartida, o parâmetro  $V_{max}$  indica a soma dos potenciais de todas as células e, portanto, quanto maior o número de células afetadas, menor será sua amplitude, independente da integridade das células remanescentes.

Os achados, após extensiva PRP, documentados neste estudo, foram similares a estudos anteriores (CAPOFERRI et al., 1990), em que reduções significativas nas amplitudes das ondas-a e b, tanto nas respostas adaptadas ao escuro quanto ao claro, foram observadas. E isso pode ser explicado devido ao dano ao tecido retiniano causado pela PRP.

Curiosamente, o parâmetro do ERG, que sofreu maior redução após extensiva PRP, foi a onda-b adaptada ao escuro e ao estímulo de baixa intensidade luminosa (onda b dos bastonetes). Esta resposta é gerada, principalmente, pela despolarização das células bipolares da via dos bastonetes (SLAUGHTER; MILLER, 1981), que estão localizadas na retina interna, que, por conseguinte, é suscetível á isquemia retiniana presente na RDP de alto risco (NILSSON, 1971); e também para a detecção de alterações funcionais após a PRP, pois o laser é aplicado na retina periférica, onde os bastonetes são dominantes.

Pode-se somente especular porque redução de magnitude similar não foi observada nas amplitudes da onda-a, uma vez que a fotocoagulação retiniana afeta primariamente a retina posterior, ou seja, o EPR da retina e, consequentemente, os fotorreceptores. Baseado em teoria que propõe que a fotocoagulação a laser não apenas destrói as áreas da retina diretamente atingidas, mas também áreas adjacentes na retina interna (OGDEN; CALLAHAN; RIEKHOF, 1976). Pearman et al. (1985) sugerem que a PRP leva à maior redução na amplitude da onda-b do que a da onda-a, devido à transmissão subnormal do sinal dos fotorreceptores na retina proximal. Há de se concordar que este pode ser um mecanismo para explicar a maior redução na amplitude da onda-b comparada com a da onda-a. Além disso, é possível que pelo menos parte da retina fotocoagulada não estivesse isquêmica e, portanto, teria retina interna funcional, que poderia gerar parte substancial da amplitude da onda-b documentada antes da PRP. Com a destruição dessas áreas, causada pelo laser, as amplitudes das ondas-a e b diminuiriam, como observado, mas na onda-b em maior escala.

As amplitudes dos POs foram dramaticamente reduzidas, ou até mesmo abolidas em olhos com RDP de alto risco, mesmo antes da PRP, e assim, não foram úteis para avaliar os efeitos pós-tratamento. Consistentemente, diferenças entre os grupos PRP e PRPplus foram encontradas na amplitude da onda-b, mas não para outros parâmetros do ERG. Além disso, respostas do ERG adaptado ao claro mostraram menor redução após a PRP e não evidenciaram diferenças entre os grupos PRP e PRPplus, provavelmente devido à retina central ser menos afetada pela PRP do que a retina periférica.

De maneira geral, os dados aqui apresentados sugerem que a estratégia de tratamento combinado é associada com melhor controle no vazamento de neovasos associado à menor perda de função retiniana, indicado pela menor redução na amplitude da onda-b, comparado com o tratamento com PRP isoladamente. O menor número de disparos de laser realizados no grupo PRP fus em relação ao grupo PRP é a provável explicação para a menor perda funcional.

6. Conclusões

- A associação de IVR ao tratamento com PRP, em pacientes portadores de RD com características de alto risco de perda visual, produz melhor controle da RD em relação ao outro grupo do estudo, evidenciado por:
  - · menor vazamento de neovasos ativos;
  - ausência de aumento da espessura macular pós-tratamento;
  - não houve piora significativa da AV.
- Pacientes com RDP com características de alto risco de perda visual apresentam redução significativa da amplitude do ERG, principalmente com estímulo de baixa intensidade em estado de adaptação ao escuro;
- A associação de IVR a PRP causa menor redução da amplitude do ERG do que a PRP isolada;
- Não foi observado aumento de efeitos adversos, como descolamento e retina, endoftalmite, ou hemorragia vítrea nos casos tratados com IVR + PRP.

7. Referências Bibliográficas

ADAMIS, A. P. et al. Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. **Am J Ophthalmol**, v. 118, n. 4, p. 445-50, 1994.

ADAMIS, A. P. et al. Changes in retinal neovascularization after pegaptanib (Macugen) therapy in diabetic individuals. **Ophthalmology**, v. 113, n. 1, p. 23-8, 2006.

AIELLO, L. P. et al. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. **N Engl J Med**, v. 331, n. 22, p. 1480-7, 1994.

AIELLO, L. P. et al. Diabetic retinopathy. **Diabetes Care**, v. 21, n. 1, p. 143-56, 1998.

AIELLO, L. P. et al. Evolving guidelines for intravitreous injections. **Retina**, v. 24, n. 5 Suppl, p. S3-19, 2004.

ALGVERE, P.; GJOTTERBERG, M. The diagnostic value of the oscillatory potentials of the ERG and fluorescein angiography in diabetic proliferative retinopathy. **Ophthalmologica**, v. 168, n. 2, p. 97-108, 1974.

ALMEIDA, F. P. P. **Estudo da farmacocinética vítrea e toxicidade da ciclosporina intravítrea em olhos de coelhos**. 92f. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

ALVES, L. A. **Prevalencia de Retinopatia Diabética na população adulta urbana de Ribeirão Preto**. Departamento de Oftalmologia, Otorrinoralingologia e Cabeça e Pescoço, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, Universidade de São Paulo, 2005.

AREVALO, J. F. et al. Intravitreal bevacizumab (Avastin) for proliferative diabetic retinopathy: 6-months follow-up. **Eye (Lond)**, v. 23, n. 1, p. 117-23, 2009.

AVERY, R. L. et al. Intravitreal bevacizumab (Avastin) in the treatment of proliferative diabetic retinopathy. **Ophthalmology**, v. 113, n. 10, p. 1695-705.e6, 2006.

BAKRI, S. J. et al. Pharmacokinetics of intravitreal ranibizumab (Lucentis). **Ophthalmology**, v. 114, n. 12, p. 2179-82, 2007.

BEETHAM, W. P. Visual Prognosis of Proliferating Diabetic Retinopathy. **Br J Ophthalmol**, v. 47, n., p. 611-9, 1963.

BEETHAM, W. P. et al. Ruby laser photocoagulation of early diabetic neovascular retinopathy. Preliminary report of a long-term controlled study. **Arch Ophthalmol**, v. 83, n. 3, p. 261-72, 1970.

BLOODWORTH JR., J. M. B.; MOLITOR, D. L. Ultrastructural aspects of human and canine diabetic retinopathy. **Invest Ophthalmol**, v. 4:, n., p. 1037., 1965.

BLOODWORTH JR, J. M. B.; ENGERMAN, R. L. Diabetic microangiography in the experimentally-diabetic dog and its prevention by careful control with insulin. **Diabetes**, v. 22:, n., p. 290., 1973.

BRESNICK, G. H.; PALTA, M. Predicting progression to severe proliferative diabetic retinopathy. **Arch Ophthalmol**, v. 105, n. 6, p. 810-4, 1987.

BRETON, M. E. et al. Electroretinogram parameters at presentation as predictors of rubeosis in central retinal vein occlusion patients. **Ophthalmology**, v. 96, n. 9, p. 1343-52, 1989.

BRON, A.; TRIPATHI, R.; TRIPATHI, B. The Retina. In: (Ed.). Wolff's Anatomy of the Eye and Orbit: Chapman & Hall Medical, 1997, p.454-87.

BROWN, D. M. et al. Ranibizumab versus verteporfin for neovascular age-related macular degeneration. **N Engl J Med**, v. 355, n. 14, p. 1432-44, 2006.

BROWNING, D. J.; FRASER, C. M.; CLARK, S. The relationship of macular thickness to clinically graded diabetic retinopathy severity in eyes without clinically detected diabetic macular edema. **Ophthalmology**, v. 115, n. 3, p. 533-9 e532, 2008.

BUCH, H. et al. The prevalence and causes of bilateral and unilateral blindness in an elderly urban Danish population. The Copenhagen City Eye Study. **Acta Ophthalmol Scand**, v. 79, n. 5, p. 441-9, 2001.

BUCH, H. et al. Prevalence and causes of visual impairment and blindness among 9980 Scandinavian adults: the Copenhagen City Eye Study. **Ophthalmology**, v. 111, n. 1, p. 53-61, 2004.

CAIRD, F. I.; GARRETT, C. J. Prognosis for Vision in Diabetic Retinopathy. **Diabetes**, v. 12, n., p. 389-97, 1963.

CAMPBELL, C. J. et al. Intraocular Temperature Changes Produced by Laser Coagulation. **Acta Ophthalmol Suppl**, v., n., p. SUPPL76:22-31, 1963.

CAMPBELL, C. J. et al. Clinical Studies in Laser Photocoagulation. Arch **Ophthalmol**, v. 74, n., p. 57-65, 1965.

CAMPOCHIARO, P. A. Retinal and choroidal neovascularization. **J Cell Physiol**, v. 184, n. 3, p. 301-10, 2000.

CAPOFERRI, C. et al. Electroretinographic findings in panretinal photocoagulation for diabetic retinopathy. A randomized study with blue-green argon and red krypton lasers. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol**, v. 228, n. 3, p. 232-6, 1990.

CHUN, D. W. et al. A pilot study of multiple intravitreal injections of ranibizumab in patients with center-involving clinically significant diabetic macular edema. **Ophthalmology**, v. 113, n. 10, p. 1706-12, 2006.

CHUNG, N. H.; KIM, S. H.; KWAK, M. S. The electroretinogram sensitivity in patients with diabetes. **Korean J Ophthalmol**, v. 7, n. 2, p. 43-7, 1993.

CHYLACK Jr, L. T. et al. The Lens Opacities Classification System III. The Longitudinal Study of Cataract Study Group. **Arch Ophthalmol**, v. 111, n. 6, p. 831-6, 1993.

COSTA, R. A. et al. Intravitreal bevacizumab for choroidal neovascularization caused by AMD (IBeNA Study): results of a phase 1 dose-escalation study. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 47, n. 10, p. 4569-78, 2006.

CUNNINGHAM Jr, E. T. et al. A phase II randomized double-masked trial of pegaptanib, an anti-vascular endothelial growth factor aptamer, for diabetic macular edema. **Ophthalmology**, v. 112, n. 10, p. 1747-57, 2005.

DANTÉS, D.; SIQUEIRA, R. C. Angiografia da retina - fluoresceína e indocianina verde. v., n., p. 1-9, 2004.

DAWSON, W. W.; TRICK, G. L.; LITZKOW, C. A. Improved electrode for electroretinography. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 18, n. 9, p. 988-91, 1979.

DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP (DCCT) The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. **N Engl J Med**, v. 329:, n., p. 977-86., 1993.

DIABETIC RETINOPATHY CLINICAL RESEARCH NETWORK (DRCRnet) et al. Randomized trial evaluating ranibizumab plus prompt or deferred laser or triancinolone plus prompt laser for diabetic macular edema. **Ophthalmology**, v. 117, n., p. 1064-77, 2010.

DIABETIC RETINOPATHY CLINICAL RESEARCH NETWORK (DRCRnet) et al. Randomized trial evaluating short-term effects of intravitreal ranibizumab or triamcinolone acetonide on macular edema after focal/grid laser for diabetic macular edema in eyes also receiving panretinal photocoagulation. **Retina**, v. 31, n. 6, p. 1009-27, 2011.

DIABETIC RETINOPATHY STUDY RESEARCH GROUP (DRS). Preliminary report on effects of photocoagulation therapy. **Am J Ophthalmol**, v. 81:, n., p. 383-96, 1976.

DIABETIC RETINOPATHY STUDY RESEARCH GROUP (DRS). Photocoagulation treatment of proliferative diabetic retinopathy. DRS report number 2. **Ophthalmology**, v. 85:, n., p. 82-106, 1978.

DIABETIC RETINOPATHY STUDY RESEARCH GROUP (DRS). Four risk factors for severe visual loss in diabetic retinopathy. DRS report number 3. Arch Ophthalmol 97:654-655. **Arch Ophthalmol**, v. 97:, n., p. 654-5., 1979.

DIABETIC RETINOPATHY STUDY RESEARCH GROUP (DRS). Design, methods and photocoagulation: a reanalysis of five studies. DRS Report Number 6. **Surv Ophthalmol**, v. 21:, n., p. 149-209., 1981a.

DIABETIC RETINOPATHY STUDY RESEARCH GROUP (DRS). A modification of the Airlie House classification of Diabetic Retinopathy. DRS report Number 7. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 21:, n., p. 210-26., 1981b.

DORRELL, M. et al. Ocular neovascularization: basic mechanisms and therapeutic advances. **Surv Ophthalmol**, v. 52 Suppl 1, n., p. S3-19, 2007.

EARLY TREATMENT DIABETIC RETINOPATHY STUDY RESEARCH GROUP (ETDRS). Photocoagulation for diabetic macular edema. ETDRS report Number 1. **Arch Ophthalmol**, v. 103, n., p. 1796-806, 1985.

EARLY TREATMENT DIABETIC RETINOPATHY STUDY RESEARCH GROUP (ETDRS). Treatment techniques and clinical guidelines for photocoagulation of diabetic macular edema. ETDRS Report Number 2. **Ophthalmology**, v. 94, n., p. 761-74, 1987a.

EARLY TREATMENT DIABETIC RETINOPATHY STUDY RESEARCH GROUP (ETDRS). Techniques for Scatter and Local Photocoagulation Treatment of Diabetic-Retinopathy. ETDRS report number 3. International Ophthalmology Clinics, v. 27, n. 4, p. 254-64, 1987b.

EARLY TREATMENT DIABETIC RETINOPATHY STUDY RESEARCH GROUP (ETDRS). Early photocoagulation for diabetic retinopathy. ETDRS report number 9. **Ophthalmology**, v. 98, n. 5 Suppl, p. 766-85, 1991a.

EARLY TREATMENT DIABETIC RETINOPATHY STUDY RESEARCH GROUP (ETDRS). Grading diabetic retinopathy from stereoscopic color fundus photographs-an extension of the modified Airlie House classification. ETDRS report number 10. **Ophthalmology**, v. 98, n. 5 Suppl, p. 786-806, 1991b.

EARLY TREATMENT DIABETIC RETINOPATHY STUDY RESEARCH GROUP (ETDRS). Fundus photographic risk factors for progression of diabetic retinopathy. ETDRS report number 12. **Ophthalmology**, v. 98, n. 5 Suppl, p. 823-33, 1991c.

EARLY TREATMENT DIABETIC RETINOPATHY STUDY RESEARCH GROUP (ETDRS). Focal photocoagulation treatment of diabetic macular edema. Relationship of treatment effect to fluorescein angiographic and other retinal characteristics at baseline: ETDRS report number 19. **Arch Ophthalmol**, v. 113, n. 9, p. 1144-55, 1995.

EMANUELE, N. et al. Ethnicity, race, and baseline retinopathy correlates in the veterans affairs diabetes trial. **Diabetes Care**, v. 28, n. 8, p. 1954-8, 2005.

FERNANDEZ, M. L. M. P.; MOURA, C. A. A.; JORGE, P. T. Estudo da prevalência da retinopatia diabética no ambulatório da Universidade Federal de Uberlândia. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 42, n., p. 368-73, 1998.

FILHO, J. A.; MESSIAS, A.; ALMEIDA, F. P.; RIBEIRO, J. A.; COSTA, R. A.; SCOTT, I. U.; JORGE, R. Panretinal photocoagulation (PRP) versus PRP plus intravitreal ranibizumab for high-risk proliferative diabetic retinopathy. **Acta Ophthalmol,** v. 89, n. 7, p. e567-72, 2011.

FLYNN Jr, H. W. et al. Pars plana vitrectomy in the Early Treatment Diabetic Retinopathy Study. ETDRS report number 17. The Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. **Ophthalmology**, v. 99, n. 9, p. 1351-7, 1992.

FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. **N Engl J Med**, v. 285, n. 21, p. 1182-6, 1971.

FOLKMAN, J.; KLAGSBRUN, M. Angiogenic factors. **Science**, v. 235, n. 4787, p. 442-7, 1987.

GARNER, A. Developments in the pathology of diabetic retinopathy: a review. **J R Soc Med**, v. 74, n. 6, p. 427-31, 1981.

GARNER, A. Histopathology of diabetic retinopathy in man. **Eye (Lond)**, v. 7 Pt 2, p. 250-3, 1993.

GJOTTERBERG, M. The electroretinogram in diabetic retinopathy. A clinical study and a critical survey. **Acta Ophthalmol (Copenh)**, v. 52, n. 4, p. 521-33, 1974.

GONZALEZ, V. H. et al. Intravitreal injection of pegaptanib sodium for proliferative diabetic retinopathy. **Br J Ophthalmol**, v. 93, n. 11, p. 1474-8, 2009.

GRAGOUDAS, E. S. et al. Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. **N Engl J Med**, v. 351, n. 27, p. 2805-16, 2004.

HOFMAN, P. et al. Endothelial cell hypertrophy induced by vascular endothelial growth factor in the retina: new insights into the pathogenesis of capillary nonperfusion. **Arch Ophthalmol**, v. 119, n. 6, p. 861-6, 2001.

HOLOPIGIAN, K. et al. A comparison of photopic and scotopic electroretinographic changes in early diabetic retinopathy. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 33, n. 10, p. 2773-80, 1992.

HOLOPIGIAN, K. et al. Evidence for photoreceptor changes in patients with diabetic retinopathy. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 38, n. 11, p. 2355-65, 1997.

HOUSSAY, B.; BIASSOTI, A. La diabetes pancratica de los perros hipofisoprivos. **Rev Soc Argent Biol**, v. 6:, n., p. 251-96, 1930.

HUANG, Y. H. et al. Intravitreal bevacizumab and panretinal photocoagulation for proliferative diabetic retinopathy associated with vitreous hemorrhage. **Retina**, v. 29, n. 8, p. 1134-40, 2009.

JAVITT, J. C. et al. Detecting and treating retinopathy in patients with type I diabetes mellitus. Savings associated with improved implementation of current guidelines. American Academy of Ophthalmology. **Ophthalmology**, v. 98, n. 10, p. 1565-73; discussion 1574, 1991.

JORGE, R. et al. Intravitreal bevacizumab (Avastin) for persistent new vessels in diabetic retinopathy (IBEPE study). **Retina**, v. 26, n. 9, p. 1006-13, 2006.

JORGE, R. et al. Ranibizumab for retinal neovascularization. **Ophthalmology**, v. 118, n. 5, p. 1004e1, 2011.

JOUSSEN, A. M. et al. A central role for inflammation in the pathogenesis of diabetic retinopathy. **FASEB J**, v. 18, n. 12, p. 1450-2, 2004.

JUEN, S.; KIESELBACH, G. F. Electrophysiological changes in juvenile diabetics without retinopathy. **Arch Ophthalmol**, v. 108, n. 3, p. 372-5, 1990.

KABBINAVAR, F. et al. Phase II, randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU)/leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer. **J Clin Oncol**, v. 21, n. 1, p. 60-5, 2003.

KLEIN, R. et al. The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. II. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is less than 30 years. **Arch Ophthalmol**, v. 102, n. 4, p. 520-6, 1984a.

KLEIN, R. et al. The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. III. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is 30 or more years. **Arch Ophthalmol**, v. 102, n. 4, p. 527-32, 1984b.

KOHNER, E. M. Diabetic retinopathy. BMJ, v. 307, n. 6913, p. 1195-9, 1993.

KOLB, H. Gross Anatomy of the Eye. In: KOLB, H.; NELSON, R.; FERNANDEZ, E; JONES, B. (Eds.). Webvision The organization of the retina and visual system. Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center; 1995. Disponível em: http://webvision.med.utah.edu. Acesso em: 21/09/2014.

KOLB, H. et al. Cellular organization of the vertebrate retina. **Prog Brain Res**, v. 131, n., p. 3-26, 2001.

KRILL, A. E. et al. Photocoagulation in diabetic retinopathy. **Am J Ophthalmol**, v. 72, n. 2, p. 299-321, 1971.

LAMB, T. D.; PUGH, E. N., JR. Phototransduction, dark adaptation, and rhodopsin regeneration the proctor lecture. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 47, n. 12, p. 5137-52, 2006.

LINDAHL, P. et al. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. **Science**, v. 277, n. 5323, p. 242-5, 1997.

LITTLE, H. L.; ZWENG, H. C.; PEABODY, R. R. Argon laser slit-lamp retinal photocoagulation. **Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol**, v. 74, n. 1, p. 85-97, 1970.

LOWE, J. et al. Ranibizumab inhibits multiple forms of biologically active vascular endothelial growth factor in vitro and in vivo. **Exp Eye Res**, v. 85, n. 4, p. 425-30, 2007.

LUFT, R.; OLIVECRONA, H.; SJOGREN, B. [Hypophysectomy in man]. Nord Med, v. 47, n. 11, p. 351-4, 1952.

LUTTY, G. A. et al. Localization of vascular endothelial growth factor in human retina and choroid. **Arch Ophthalmol**, v. 114, n. 8, p. 971-7, 1996.

MALECAZE, F. et al. Detection of vascular endothelial growth factor messenger RNA and vascular endothelial growth factor-like activity in proliferative diabetic retinopathy. **Arch Ophthalmol**, v. 112, n. 11, p. 1476-82, 1994.

MARMOR, M. F.; ZRENNER, E. Standard for clinical electroretinography (1999 update). International Society for Clinical Electrophysiology of Vision. **Doc Ophthalmol**, v. 97, n. 2, p. 143-56, 1998.

MASON, J. O., 3<sup>rd</sup> et al. Intravitreal bevacizumab (Avastin) prevention of panretinal photocoagulation-induced complications in patients with severe proliferative diabetic retinopathy. **Retina**, v. 28, n. 9, p. 1319-24, 2008.

McMEEL, J. W. Diabetic retinopathy: fibrotic proliferation and retinal detachment. **Trans Am Ophthalmol Soc**, v. 69, n., p. 440-93, 1971.

MESSIAS, A. et al. Electroretinographic findings associated with panretinal photocoagulation (PRP) versus PRP plus intravitreal ranibizumab treatment for high-risk proliferative diabetic retinopathy. **Doc Ophthalmol,** v. 124, n. 3, p. 225-36, 2012.

MEYER-SCHWICKERATH, G. Koagulation der Netz-haut mit Sonnenlicht. Ber Dtsch Ophthalmol Ges, v. 55, n. 1, p. 256-9, 1950.

MILLER, J. W. et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is temporally and spatially correlated with ocular angiogenesis in a primate model. **Am J Pathol**, v. 145, n. 3, p. 574-84, 1994.

MINELLA, A. M. et al. Intarvitreal bevacizumab (Avastin®) in proliferative diabetic retinopathy. **Acta Ophthalmol**, v. 86(6), n., p. 683-7, 2008.

MIYAMOTO, K. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced retinal vascular permeability is mediated by intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). **Am J Pathol**, v. 156, n. 5, p. 1733-9, 2000.

MORDENTI, J. et al. Comparisons of the intraocular tissue distribution, pharmacokinetics, and safety of 125I-labeled full-length and Fab antibodies in

rhesus monkeys following intravitreal administration. **Toxicol Pathol**, v. 27, n. 5, p. 536-44, 1999.

NAKA, K. I.; RUSHTON, W. A. S-potentials from luminosity units in the retina of fish (Cyprinidae). **J Physiol**, v. 185, n. 3, p. 587-99, 1966.

NILSSON, S. Human retinal vascular obstructions. A quantitative correlation of angiographic and electroretinographic findings. **Acta Ophthalmol (Copenh)**, v. 49, n., p. 111-33, 1971.

OGDEN, T. E.; CALLAHAN, F.; RIEKHOF, F. T. The electroretinogram after peripheral retinal ablation in diabetic retinopathy. **Am J Ophthalmol**, v. 81, n. 4, p. 397-402, 1976.

OKUN, E.; CIBIS, P. A. The role of photocoagulation in the therapy of proliferative diabetic retinopathy. **Arch Ophthalmol**, v. 75, n. 3, p. 337-52, 1966.

PANISSET, A. et al. Diabetic retinopathy: new vessels arising from the optic disc. II. Response to pituitary ablation by yttrium 90 implant. **Diabetes**, v. 20, n. 12, p. 824-33, 1971.

PATZ, A.; MAUMENEE, A. E.; RYAN, S. J. Argon laser photocoagulation. Advantages and limitations. **Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol**, v. 75, n. 3, p. 569-79, 1971.

PENN, R. D.; HAGINS, W. A. Signal transmission along retinal rods and the origin of the electroretinographic a-wave. **Nature**, v. 223, n. 5202, p. 201-4, 1969.

PERLMAN, I. et al. Retinal function of the diabetic retina after argon laser photocoagulation assessed electroretinographically. **Br J Ophthalmol**, v. 69, n. 4, p. 240-6, 1985.

PIERCE, E. A. et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 3, p. 905-9, 1995.

PORTA, M.; BANDELLO, F. Diabetic retinopathyA clinical update. **Diabetologia**, v. 45, n. 12, p. 1617-34, 2002.

RAMALHO, L. H. et al. Subclinical diabetic macular edema and mild nonproliferative diabetic retinopathy: data correlation with the retinal thickness analyzer (RTA)]. **Arq Bras Oftalmol**, v. 72, n. 4, p. 503-8, 2009.

RATHMANN, W.; GIANI, G. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v. 27, n. 10, p. 2568-9; author reply 2569, 2004.

RISAU, W. Mechanisms of angiogenesis. Nature, v. 386, n. 6626, p. 671-4, 1997.

ROSENFELD, P. J.; MOSHFEGHI, A. A.; PULIAFITO, C. A. Optical coherence tomography findings after an intravitreal injection of bevacizumab (avastin) for neovascular age-related macular degeneration. **Ophthalmic Surg Lasers Imaging**, v. 36, n. 4, p. 331-5, 2005.

ROSENFELD, P. J.; FUNG, A. E.; PULIAFITO, C. A. Optical coherence tomography findings after an intravitreal injection of bevacizumab (avastin) for macular edema from central retinal vein occlusion. **Ophthalmic Surg Lasers Imaging**, v. 36, n. 4, p. 336-9, 2005.

ROSENFELD, P. J. et al. Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. **N Engl J Med**, v. 355, n. 14, p. 1419-31, 2006.

ROSENFELD, P. J.; RICH, R. M.; LALWANI, G. A. Ranibizumab: Phase III clinical trial results. **Ophthalmol Clin North Am**, v. 19, n. 3, p. 361-72, 2006.

SATOH, S. et al. Photopic electroretinogram implicit time in diabetic retinopathy. **Jpn J Ophthalmol**, v. 38, n. 2, p. 178-84, 1994.

SCHELLINI, S. A. et al. Prevalence of diabetes and diabetic retinopathy in a Brazilian population. **Ophthalmic Epidemiol**, v. 21, n. 1, p. 33-8, 2014.

SCHLINGEMANN, R. O.; VAN HINSBERGH, V. W. Role of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in eye disease. **Br J Ophthalmol**, v. 81, n. 6, p. 501-2, 1997.

SCHMIDINGER, G. et al. Repeated intravitreal bevacizumab (Avastin((R))) treatment of persistent new vessels in proliferative diabetic retinopathy after

complete panretinal photocoagulation. Acta Ophthalmol, v. 89, n. 1, p. 76-81, 2011.

SCHMIDT-ERFURTH, U. et al. Intravitreal aflibercept injection for neovascular age-related macular degeneration: ninety-six-week results of the VIEW studies. **Ophthalmology**, v. 121, n. 1, p. 193-201, 2014.

SCHRODER, S.; PALINSKI, W.; SCHMID-SCHONBEIN, G. W. Activated monocytes and granulocytes, capillary nonperfusion, and neovascularization in diabetic retinopathy. **Am J Pathol**, v. 139, n. 1, p. 81-100, 1991.

SHAW, J. E.; SICREE, R. A.; ZIMMET, P. Z. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 87, n. 1, p. 4-14, 2010.

SHIMIZU, K.; KOBAYASHI, Y.; MURAOKA, K. Midperipheral fundus involvement in diabetic retinopathy. **Ophthalmology**, v. 88, n. 7, p. 601-12, 1981.

SLAUGHTER, M. M.; MILLER, R. F. 2-amino-4-phosphonobutyric acid: a new pharmacological tool for retina research. **Science**, v. 211, n. 4478, p. 182-5, 1981.

SOUZA Jr, G. S. Estudo da Freqüência da Retinopatia Diabética e Fatores Associados na População do Primeiro Mutirão do Olho Diabético da Região de Ribeirão Preto. Departamento de Oftalmologia, Otorrinoralingologia e Cabeça e Pescoço, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, FMRP-USP, Ribeirão Preto, 2003.

SPEROS, P.; PRICE, J. Oscillatory potentials. History, techniques and potential use in the evaluation of disturbances of retinal circulation. **Surv Ophthalmol**, v. 25, n. 4, p. 237-52, 1981.

STANFORD, M. R. The pathogenesis of diabetic retinopathy. **Br J Ophthalmol**, v. 88, n. 4, p. 444-5, 2004.

STERGIOU, P. K.; SYMEONIDIS, C.; DIMITRAKOS, S. A. Descending doses of intravitreal bevacizumab for the regression of diabetic neovascularization. **Acta Ophthalmol**, v. 89, n. 3, p. 218-21, 2011.

TONELLO, M. et al. Panretinal photocoagulation versus PRP plus intravitreal bevacizumab for high-risk proliferative diabetic retinopathy (IBeHi study). Acta **Ophthalmol**, v. 86, n. 4, p. 385-9, 2008.

TZEKOV, R.; ARDEN, G. B. The electroretinogram in diabetic retinopathy. **Surv Ophthalmol**, v. 44, n. 1, p. 53-60, 1999.

UK PROSPECTIVE DIABETES STUDY GROUP (UKPDS). Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes (UKPDS 38). **BMJ**, v. 317, n. 7160, p. 703-13, Sep. 1998. Erratum in: **BMJ**, v. 318, n. 7175, p. 29, Jan. 1999.

VANDER, J. F. et al. Long-term stability and visual outcome after favorable initial response of proliferative diabetic retinopathy to panretinal photocoagulation. **Ophthalmology**, v. 98, n. 10, p. 1575-9, 1991.

VAUGHAN, D. W. **A Learning system in histology**. Oxford University Press, 2002, CD-ROM and Guide. Disponível em: <u>http://www.bu.edu/histology/</u>. Acesso em: 21/09/2014.

WETZIG, P. C.; WORLTON, J. T. Treatment of Diabetic Retinopathy by Light-Coagulation: A Preliminary Study. **Br J Ophthalmol**, v. 47, n., p. 539-41, 1963.

WETZIG, P. C.; JEPSON, C. N. Treatment of diabetic retinopathy by light coagulation. **Am J Ophthalmol**, v. 62, n. 3, p. 459-65, 1966.

WITMER, A. N. et al. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. **Prog Retin Eye Res**, v. 22, n. 1, p. 1-29, 2003.

WROBLEWSKI, J. J. et al. Pegaptanib sodium for macular edema secondary to central retinal vein occlusion. **Arch Ophthalmol**, v. 127, n. 4, p. 374-80, 2009.

ZACHARY, I. C. et al. The role of neuropilins in cell signalling. **Biochem Soc Trans**, v. 37, n. Pt 6, p. 1171-8, 2009.

ZHANG, S. X. et al. Pigment epithelium-derived factor downregulates vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and inhibits VEGF-VEGF receptor 2 binding in diabetic retinopathy. **J Mol Endocrinol**, v. 37, n. 1, p. 1-12, 2006.

ZHANG, X. et al. Prevalence of diabetic retinopathy in the United States, 2005-2008. **JAMA**, v. 304, n. 6, p. 649-56, 2010.

ZWENG, H. C. Retinal Laser Photocoagulation. **Trans Pac Coast Otoophthalmol Soc Annu Meet**, v. 45, n., p. 423-39, 1964.

ZWENG, H. C.; LITTLE, H. L.; PEABODY, R. R. Argon laser photocoagulation of diabetic retinopathy. **Arch Ophthalmol**, v. 86, n. 4, p. 395-400, 1971.

8. Anexos

## **ANEXO A**

### APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



Ribeirão Preto, 03 de fevereiro de 2009

Oficio nº 276/2009 CEP/SPC

#### Prezado Senhor,

O trabalho intitulado **"PANFOTOCOAGULAÇÃO** VERSUS PANFOTOCOAGULAÇÃO ASSOCIADA COM RANIBIZUMABE INTRA VÍTREO PARA RETINOPATIA DIABÉTICA PROLIFERATIVA COM CARACTERÍSTICAS DE ALTO RISCO (IRaHi)", foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 279<sup>a</sup> Reunião Ordinária realizada em 02/02/2009 e enquadrado na categoria: <u>APROVADO</u>, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com o Processo HCRP nº 11976/2008.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

PROF. DR. SÉRGIO PEREIRA DA CUNHA Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimo Senhor **JOSÉ AFONSO RIBEIRO RAMOS FILHO** Depto. de Oftalmo, Otorrino e Cirurgia de Cabeça e Pescoço
# ANEXO B

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PANFOTOCOAGULAÇÃO VERSUS PANFOTOCOAGULAÇÃO ASSOCIADA COM RANIBIZUMABE INTRA VÍTREO PARA RETINOPATIA DIABÉTICA PROLIFERATIVA DE ALTO RISCO (IRaHi)

O sr. (a) tem um tipo de doença denominada retinopatia diabética proliferativa de alto risco para perda visual grave e está sendo convidado(a) a participar de um estudo intitulado Panfotocoagulação versus Panfotocoagulação associada com Ranibizumabe Intra Vítreo para Retinopatia Diabética proliferativa com características de Alto Risco (IRaHi).

A retinopatia diabética proliferativa (RDP) caracteriza-se pela formação de vasos anormais, ruins, que sangram com facilidade. Estes sangramentos podem acontecer na RETINA, tecido que forra o fundo de olho, ou na gelatina que fica dentro do olho, chamada de gel vítreo. Para que estas complicações não aconteçam, é preciso "secar" os vasos ruins da retina. Para tal, pode-se utilizar o tratamento a LASER, chamado de fotocoagulação retiniana, ou utilizar-se tratamento farmacológico, com drogas que também são capazes de "secar" os vasos anormais decorrentes da retinopatia diabética.

No presente momento, o tratamento para retinopatia diabética proliferativa é baseado em um estudo multicêntrico denominado "Early Treatment Diabetic Retinopathy Study". Este estudo indica o uso da fotocoagulação a LASER como principal alternativa terapêutica para o tratamento da Retinopatia Diabética Proliferativa. O tratamento é realizado sob anestesia tópica (colírio anestésico) no ambulatório e leva a regressão de neovasos de retina em 4-6 meses, podendo ser necessárias novas aplicações a cada 4 meses.

Alternativamente, há medicamentos capazes de secar os vasos ruins da retina, os antiangiogênicos. São capazes de regredir os vasos ruins e são injetados dentro do olho (injeção intra-vítrea). Durante o procedimento da injeção intra-vítrea de ranibizumabe, o sr. (a) poderá experimentar alguns desconfortos, principalmente relacionados à agulhada (dor no local da injeção, queda temporária da pálpebra e olho vermelho), sendo utilizada anestesia local (colírio). Por outro lado, a droga precisa ser injetada dentro do olho e há o risco adicional de infecção de 0,01%, ou seja, de cada 10.000 pacientes que fazem a injeção intra-vítrea, um pode ter infecção no olho.

O objetivo desta pesquisa é comparar a regressão da neovascularização retiniana, utilizando 2 grupos de pacientes: A- que serão submetidos a tratamento com laser associado com uma medicação dentro do olho chamada Ranibizumabe, e B- que farão o tratamento convencional, ou seja, somente com uso do laser. Estaremos avaliando se o Ranibizumabe intravítreo é capaz de auxiliar a redução de neovasos retinianos.

Caso aceite participar da pesquisa, o sr. (a) será sorteado para ser incluído em um dos dois grupos da pesquisa, podendo ser submetido ao tratamento em estudo para o seu caso, ou seja, tratamento a laser COM o uso da medicação Ranibizumabe a cada 4 meses durante o período de 1 ano, ou o tratamento convencional, tratamento a laser, com necessidade de novas aplicações a cada quatro meses.

Caso o sr. (a) não deseje participar do estudo ou não deseje ser sorteado para um dos grupos do estudo, receberá o tratamento convencional dado aos pacientes com problemas semelhantes ao seu,ou seja, tratamento a laser.

Antes do procedimento, será necessária a realização de consultas oftalmológicas direcionadas, com os seguintes exames: medida da acuidade visual, medida da pressão intraocular, biomicroscopia (avaliação da porção anterior e posterior do olho com lâmpada de fenda), mapeamento de retina, Angiofluoresceinografia, Tomografia de Coerência Óptica (OCT), Eletrorretinograma de campo total (ERG), medida da glicemia de jejum e hemoglobina glicosilada.

A cada quatro meses durante um ano, serão realizadas novas aplicações de Ranibizumabe intra vítreo nos pacientes do grupo A, e novas aplicações de laser nos pacientes do grupo B, além de avaliações oftalmológicas como descrito acima.

Os riscos que envolvem o seu tratamento são: aumento da pressão intra-ocular (pressão interna do olho), inflamação ocular, infecção ocular, hemorragia dentro do gel vítreo, catarata, descolamento de retina. Para resolver as complicações podem ser necessárias medicações específicas e/ou cirurgias adicionais.

Os benefícios esperados do tratamento com laser e ranibizumabe são: diminuir a neovascularização retiniana proveniente da retinopatia diabética, reduzindo as complicações decorrentes desta, e assim, diminuir o risco de perda visual.

Para que o estudo tenha sucesso, o sr. (a) deverá comparecer ao Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP) para consultas oftalmológicas a cada quatro meses idênticas à consulta descrita acima durante o decorrer de um ano, no ambulatório de retina do HCFMRP, como ocorre de rotina com os pacientes tratados com problemas semelhantes ao seu pelo setor de retina e vítreo do HCFMRP.

Os médicos José Afonso Ribeiro Ramos Filho (CRM-SP 118871) e Rodrigo Jorge (CRM-SP 81886), que podem ser contatado todos os dias da semana através dos seguintes telefones (16) 3602-2523 ou (16) 3602-2323 e no endereço Divisão de Oftalmologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Avenida Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto - São Paulo - Brasil, são os responsáveis pelo seu tratamento e farão o seu acompanhamento conforme consta no padrão Ético e Vigente no Brasil.

Estão garantidas todas as informações que o sr. (a) queira, antes durante e depois do estudo.

A sua participação neste estudo é voluntária, tendo a liberdade de recusar participar. Caso o sr. (a) aceite participar, poderá retirar seu consentimento a qualquer momento. Este fato não implicará na interrupção de seu atendimento, que está assegurado.

As informações relacionadas ao estudo poderão ser inspecionadas pelos médicos que executam a pesquisa e pelas autoridades legais, no entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a confidencialidade seja mantida.

Pela sua participação no estudo, o sr. (a) não receberá qualquer valor em dinheiro. O sr. (a) terá a garantia de que qualquer problema decorrente do estudo será tratado no próprio Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina Ribeirão Preto.

Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

li o texto acima e

Eu, compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual fui convidado a participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios do estudo, assim como o tratamento alternativo. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação no estudo a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão afete meu tratamento com o meu médico. Eu entendi o que não posso fazer durante o tratamento e sei que qualquer problema relacionado ao tratamento será tratado sem custos para mim.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

Assinatura do paciente

Nome do pesquisador

Ribeirão Preto, \_\_/\_\_/\_\_\_

Anexos de Publicação

## Acta Ophthalmologica

Acta Ophthalmologica 2011 -

# Panretinal photocoagulation (PRP) versus PRP plus intravitreal ranibizumab for high-risk proliferative diabetic retinopathy

José A. R. Filho,<sup>1</sup> André Messias,<sup>1</sup> Felipe P. P. Almeida,<sup>1</sup> Jefferson A. S. Ribeiro,<sup>1</sup> Rogério A. Costa,<sup>1</sup> Ingrid U. Scott<sup>2</sup> and Rodrigo Jorge<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, School of Medicine of Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, SP, Brazil

<sup>2</sup>Departments of Ophthalmology and Public Health Sciences, Penn State College of Medicine, Hershey, Pennsylvania, USA

#### ABSTRACT.

*Purpose:* To evaluate the effects of panretinal photocoagulation (PRP) compared with PRP plus intravitreal injection of 0.5 mg of ranibizumab (IVR) in patients with high-risk proliferative diabetic retinopathy (PDR).

Methods: Prospective study included patients with high-risk PDR and no prior laser treatment randomly assigned to receive PRP (PRP group) or PRP plus IVR (PRPplus group). PRP was administered in two sessions (weeks 0 and 2), and IVR was administered at the end of the first laser session in the PRPplus group. Standardized ophthalmic evaluations including best-corrected visual acuity (BCVA) measured according to the methods used in the Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (BCVA), fluorescein angiography to measure area of fluorescein leakage (FLA) and optical coherence tomography (OCT) for the assessment of central subfield macular thickness (CSMT), were performed at baseline and at weeks 16 ( $\pm$ 2), 32 ( $\pm$ 2) and 48 ( $\pm$ 2).

**Results:** Twenty-nine of 40 patients (n = 29 eyes) completed the 48-week study follow-up period. At baseline, mean  $\pm$  SE FLA (mm<sup>2</sup>) was 9.0  $\pm$  1.3 and 11.7  $\pm$  1.3 (p = 0.1502); BCVA (logMAR) was 0.31  $\pm$  0.05 and 0.27  $\pm$  0.06 (p = 0.6645); and CSMT (mm) was 216.3  $\pm$  10.7 and 249.4  $\pm$  36.1 (p = 0.3925), in the PRP and PRP*plus* groups, respectively. There was a significant (p < 0.05) FLA reduction at all study visits in both groups, with the reduction observed in the PRP*plus* group significantly larger than that in the PRP group at week 48 (PRP = 2.9  $\pm$  1.3 mm<sup>2</sup>; PRP*plus* = 5.8  $\pm$  1.3 mm<sup>2</sup>; p = 0.0291). Best-corrected visual acuity worsening was observed at 16, 32 and 48 weeks after treatment in the PRP group (p < 0.05), while no significant BCVA changes were observed in the PRP*plus* group. A significant CSMT increase was observed in the PRP group at all study visits, while a significant decrease in CSMT improves observed in the PRP*plus* group at week 16, and no significant difference in CSMT from baseline was observed at weeks 32 and 48.

*Conclusions:* Intravitreal ranibizumab after PRP was associated with a larger reduction in FLA at week 48 compared with PRP alone in eyes with high-risk PDR, and the adjunctive use of IVR appears to protect against the modest visual acuity loss and macular swelling observed in eyes treated with PRP alone.

 $\textbf{Key words:} \ angiogenesis-diabetes-laser \ treatment-vascular \ endothelial \ growth \ factor \\$ 

Acta Ophthalmol. 2011: 89: e567–e572 © 2011 The Authors Acta Ophthalmologica © 2011 Acta Ophthalmologica Scandinavica Foundation

doi: 10.1111/j.1755-3768.2011.02184.x

## Introduction

Diabetic retinopathy is the most common cause of vision loss in working-aged individuals in developed nations (Klein 1992). Retinal neovascularization (NV) represents an important risk factor for severe vision loss in patients with diabetes mellitus (ETDRS Research Group 1991b). About 60% of patients with proliferative diabetic retinopathy (PDR) respond to panretinal photocoagulation (PRP) with regression of NV within 3 months (Vander et al. 1991). However, many patients require additional laser treatment, and 4.5% ultimately undergo pars plana vitrectomy despite PRP (Flynn et al. 1992).

Although severe central vision loss because of PDR can be prevented with PRP in most cases, this destructive, often painful, laser procedure may be associated with decreased peripheral vision and an increased risk of macular oedema (ETDRS Research Group 1991a).

Vascular endothelial growth factor (VEGF) has been implicated in the pathogenesis of human eye diseases characterized by NV (Folkman 1971; Adamis et al. 1994; Aiello et al. 1994; Malecaze et al. 1994), and blockage of VEGF has been associated with inhibition of iris NV and suppression of

#### — Acta Ophthalmologica 2011

retinal NV in primates (Aiello et al. 1995; Adamis et al. 1996; Sawada et al. 2007; Matsuyama et al. 2009) and in humans. Several clinical trials are currently evaluating the role of anti-VEGF agents, such as pegaptanib and ranibizumab (Cunningham et al. 2005; Adamis et al. 2006; Chun et al. 2006), for the treatment of macular oedema and retinal NV in diabetic patients with encouraging preliminary results.

Regression of optic disk NV was demonstrated after intravitreal injection of the antiangiogenic agent bevacizumab (Avastin<sup>®</sup>; Genentech, Inc.; South San Francisco, CA, USA) in the setting of diabetic retinopathy (Avery 2006; Spaide & Fisher 2006). Nevertheless, this effect seems to be transient as retinal NV tended to recur by 12 weeks after a single intravitreal injection of bevacizumab (Jorge et al. 2006).

In 2007, Tonello et al. (2007) reported a synergistic effect of PRP and intravitreal bevacizumab for the treatment of patients with high-risk PDR. The objective of the current study is to investigate whether there are similar effects using IVR in conjunction with PRP in eyes with high-risk PDR.

## Methods

The study protocol adhered to the tenets of the Declaration of Helsinki and was approved by the local Institutional Review Board, and all participants gave written informed consent before entering in the study.

Between February 2009 and December 2009, all patients evaluated at the Retina and Vitreous Section of the Department of Ophthalmology, School of Medicine of Ribeirão Preto, who presented with high-risk PDR and had not received any prior retinal laser treatment were invited to participate in the study.

A single masked certified examiner performed Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS) best-corrected visual acuity (BCVA) measurements prior to any other study procedure. A single retinal specialist performed the ophthalmic evaluations (JARF) and the stereoscopic fundus photography (FPPA). Study data were analysed and interpreted by AM, RAC, IUS, JASR, RJ.

#### Patient eligibility and baseline evaluation

Patients were included if they had highrisk PDR, which was defined according to the guidelines set forth by the ET-DRS (The diabetic retinopathy study Research Group, 1979; ETDR Study Research Group 1991b), as follows: (i) presence of neovascularization at the disc (NVD) greater than ETDRS standard photograph 10A, (ii) presence of NVD associated with vitreous or preretinal haemorrhage or (iii) neovascularization elsewhere (NVE) with more than a half-disk area associated with vitreous or preretinal haemorrhage. Exclusion criteria included the following: (i) history of prior laser treatment or vitrectomy in the study eye; (ii) history of thromboembolic event - including myocardial infarction or cerebral vascular accident; (iii) major surgery within the prior 6 months or planned within the next 28 days; (iv) uncontrolled hypertension [according to guidelines of the seventh report of the joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure (JNC-7)] (Chobanian et al. 2003); (v) known coagulation abnormalities or current use of anticoagulative medication other than aspirin; or (vi) any condition affecting documentation.

During the study enrolment period, high-risk PDR was identified in one eye of five patients and in both eyes of 35 patients based on clinical examination and confirmed by fluorescein angiography. At baseline, each patient received a detailed ophthalmologic examination including measurement of ETDRS BCVA according to a standardized refraction protocol (using modified ETDRS charts 1, 2 and R), as well as applanation tonometry, dilated slit lamp biomicroscopic examinations (including lenticular status using the Lens Opacities Classification System III) (Chylack et al. 1993) and indirect funduscopic examination. Digital redfree fundus photography and fluorescein angiography were performed using two fundus camera systems (HRA-OCT; Heidelberg, Germany, and TRC-50IA-IMAGEnet; Topcon, Tokyo, Japan).

#### Treatment assignment

All patients received PRP, which was performed in two sessions (at week 0

and week 2) according to ETDRS guidelines (ETDRS Research Group 1987). Six to eight hundred 500-µm spots were performed per session, at the discretion of the treating investigator. If patients had clinically significant macular oedema (ETDRS Research Group 1985), macular focal/grid laser was performed at the time of the first PRP session. Patients could be retreated with focal laser at the 16- and 32-week study visits. If both eyes were eligible for the study, the eye with best visual acuity was included.

Patients were enrolled in groups of two. The technician was asked to pick up one of two identical opaque envelopes; one contained the designation for PRP, and the other contained the designation for PRPplus treatment. The second patient was automatically assigned to the treatment designated in the second envelope. For the 20 eyes selected to receive combined treatment, PRP plus IVR (PRPplus), one intravitreal injection of 0.5 mg (0.05 ml) of ranibizumab was performed approximately 60 min after the completion of the first PRP session (at week 0) by a single retinal specialist (JARF). Ranibizumab was injected into the vitreous cavity via a 29-gauge needle inserted through the inferotemporal pars plana 3.0-3.5 mm posterior to the limbus using topical proparacaine drops under sterile conditions (eyelid speculum and povidone-iodine) (Ribeiro et al. 2009). Patients were instructed to instill one drop of 0.3% ciprofloxacin into the injected eye four times daily for 1 week after the procedure.

#### **Retreatment** protocol

At weeks 16 and 32, if active new vessels were detected on fluorescein angiography, patients in the PRP*plus* group received IVR and patients in the PRP group received five hundred  $500-\mu$ m additional spots per quadrant of active new vessels. Also at weeks 16 and 32, if clinically significant macular oedema was present, patients could be retreated with focal/gird laser if additional laser spots were possible.

#### **Outcome measures**

Patients were examined 16  $(\pm 2)$ , 32  $(\pm 2)$  and 48  $(\pm 2)$  weeks after base-

Acta Ophthalmologica 2011 —

line and underwent the exact same procedures performed at baseline. Systemic and local adverse events were monitored throughout the study, including changes in intraocular pressure and lens status.

Three measures were used to evaluate the effects of ranibizumab: total area (mm<sup>2</sup>) of fluorescein leakage (FLA) from active NV was the primary outcome; if more than one site of active NV were found, the sum area, including all sites, was considered for analysis. Secondary outcome measures were BCVA (logMAR) and the central subfield macular thickness (CSMT) ( $\mu$ m).

#### Statistical analysis

Group comparisons at baseline were performed with one-way analysis of variance (ANOVA) and a *t*-test, while the effect of treatment (PRP and PRP*plus*) was compared within (Wilcoxon signed-rank test) and between (Wilcoxon rank-sum test) groups for the intraindividual differences of FLA, BCVA and CSMT values found after treatment minus baseline. All analyses considered p < 0.05 as the level of significance.

#### Results

Twenty-nine of 40 patients initially included in this trial completed the 48-week follow-up evaluation. In the PRPplus group, one patient died from myocardial infarction and two patients did not return for the 16week study visit (week 16: n = 17). Between weeks 16 and 32, one patient was lost to follow-up (week 32: 16 patients evaluated) and one patient died after week 32 (week 48: PRPplus n = 15 patients). In the PRP group, one patient was excluded because of tractional retinal detachment, one patient died and two patients did not return for the 16-week study visit (week 16: n = 16). Between weeks 16 and 32, one patient was excluded because of development of vitreous haemorrhage (week 32: n = 15), and after week 32, another patient died (week 48: PRP group  $\hat{n} = 14$ ). All patients in the PRPplus group were retreated with IVR, and all patients in the PRP group received an additional 500-µm laser spots at weeks 16 and 32.

Patients' demographic characteristics are summarized in Table 1. Mean age was higher in the PRP compared with the PRP*plus* group (p = 0.0036), but there were no statistically significant differences between groups with respect to glycosylated haemoglobin (HbA1c) level or duration of diabetes mellitus.

No serious drug-related adverse events were observed in the 20 eyes (20 patients) treated with ranibizumab in this study. Overall, the intravitreal injection procedure was well tolerated, and no clinical evidence of uveitis, endophthalmitis or ocular toxicity was observed. Further, no significant changes in lens status or intraocular pressure were observed in any of the 20 injected eyes during the 48-week follow-up period. Minor local adverse events related to the treatment procedure, such as subconjunctival haemorrhage and foreign body sensation, were reported in 25% (5/20), 29.4% (5/17) and 31.25% (5/16) of patients at baseline, week 16 and week 32, respectively. These events were transient and resolved in all patients by 1 week after injection.

#### FLA area

There was no statistically significant difference between FLA in the PRP and PRP*plus* groups at baseline. Mean  $\pm$  SE FLA was 9.0  $\pm$  1.3 mm<sup>2</sup> in the PRP group and 11.7  $\pm$  1.3 mm<sup>2</sup> in the PRP*plus* group (p = 0.1502; *t*-test).

A within-group statistically significant FLA reduction compared with baseline was found at weeks 16, 32 and 48 in both groups (p < 0.05). Intragroup comparison showed a significantly larger reduction in FLA at week 48 in the PRP*plus* group compared with the PRP group (p =

Table 1. Patient demographics.

	PRP	PRPplus	р
Age (mean $\pm$ SE; in years)	$63.3 \pm 2.5$	$50.5 \pm 3.0$	0.0036 (t-test)
Gender (Male/Female)	9/5	9/6	0.8120 (Likelihood Ratio)
Race (Black/Hispanic/Caucasian)	3/7/4	2/7/6	0.7522 (Likelihood Ratio)
Duration of Diabetes (mean $\pm$ SE; in years)	$13.1~\pm~2.3$	$17.0~\pm~2.5$	0.2577 (t-test)
Treatment regimen (no insulin/insulin)	2/12	3/12	0.6829 (Likelihood Ratio)
$HbA1c$ (mean $\pm$ SD)	$9.3 \pm 1.2$	$9.4 \pm 0.8$	0.7821 (t-test)

HbAlc, glycosylated haemoglobin; PRP, panretinal photocoagulation; PRPplus, panretinal photocoagulation and intravitreal injection of ranibizumab; SD, standard deviation.

0.0291) and showed a trend towards significance at weeks 16 and 32 (p < 0.1) (Fig. 1, Table 2).

### BCVA

There was no statistically significant difference between the groups in baseline BCVA. The mean  $\pm$  SEM BCVA (expressed as the logarithm of the minimum angle of resolution [log-MAR]) was 0.31  $\pm$  0.05 logMAR in the PRP group and 0.27  $\pm$  0.06 logMAR in the PRP*plus* group (p = 0.6645).

A BCVA decrease of 0.08 logMAR compared with baseline was observed at 16, 32 and 48 weeks after treatment in the PRP group (p < 0.05), while no statistically significant change in BCVA was observed in the PRP*plus* group at any study visit (p > 0.05). Between-group analysis showed significantly better BCVA in the PRP*plus* group compared with the PRP group at weeks 32 and 48 (p < 0.05) (Fig. 1, Table 2).

#### CSMT

At baseline, the mean  $\pm$  SEM CSMT was 216.3  $\pm$  10.7  $\mu$ m in the PRP group and 249.4  $\pm$  36.1  $\mu$ m in the PRP*plus* group (p = 0.3925).

A statistically significant CSMT increase of approximately 20% was observed after treatment in the PRP group (p < 0.05), while a trend towards significant decrease in CSMT (approximately 5%) was observed in the PRP*plus* group (p < 0.05) at all study visits (Fig. 1, Table 2).

#### Discussion

Results of the current study suggest that both treatments (PRP and the combination of IVR with PRP) are

— Аста Ophthalmologica 2011



Fig. 1. Distributions of the intraindividual differences (16, 32 and 48 weeks after treatment – baseline) of (A) total area  $(mm^2)$  of fluorescein leakage from active neovascularization (B) best-corrected visual acuity (logMAR); and (C) central subfield macular thickness ( $\mu m$ ) for Panretinal photocoagulation (PRP) and PRPplus. The ends of the boxes are the 25th and 75th quartiles. The line across the middle of the box identifies the median and the horizontal line is the mean. The lines extend from the ends of the box to the outermost data point that falls within the distances computed as upper/lower quartile  $\pm$  1.5\* (interquartile range).

associated with significant regression of actively leaking NV in patients with high-risk PDR. However, the use of IVR in addition to PRP was associated with a larger reduction in FLA than PRP alone. A previous study from our group (Jorge et al. 2011) has also shown significant regression of actively leaking NV at 1,6,12, 24, 36 and 48 weeks after IVR, which was performed quarterly after baseline if active new vessels were detected on fluorescein angiography in patients with persistent retinal new vessels associated with PDR.

In a similar study from our group comparing PRP versus PRP plus intravitreal bevacizumab for high-risk PDR

— e570

Table 2. Mean  $\pm$  SEM intraindividual difference (values found after treatment minus baseline) and within group p-value of Wilcoxon signedrank test for FLA, BCVA and CSMT in both groups for all study visits. The most right column shows the p-values for between-group comparisons analyse using Wilcoxon rank-sum test.

Outcome	Week	PRP	PRPplus	Between groups p (Wilcoxon)
FLA	16	$-2.4 \pm 0.4 (0.0003)$	$-3.9 \pm 0.4 (< 0.0001)$	0.0548
	32	$-3.1 \pm 1.0 (0.0067)$	$-5.2 \pm 0.6 (< 0.0001)$	0.0887
	48	$-2.9 \pm 1.3 (0.0083)$	$-5.8 \pm 0.7 (< 0.0001)$	0.0291
BCVA	16	$0.06 \pm 0.03 (0.0625)$	$0.00 \pm 0.01 (0.5000)$	0.1142
	32	$0.08 \pm 0.03 (0.0078)$	$-0.01 \pm 0.02 (0.5000)$	0.0216
	48	$0.08 \pm 0.03 (0.0078)$	$0.00 \pm 0.02 (0.5000)$	0.0243
CSMT	16	$34.4 \pm 29.6 (0.0085)$	$-14.2 \pm 36.9 (0.0188)$	0.4706
	32	$54.7 \pm 36.8 (0.0025)$	$-13.6 \pm 41.8 (0.0820)$	0.1897
	48	$18.1 \pm 9.4 (0.0043)$	$-14.7 \pm 39.1 (0.0698)$	0.7106

BCVA, best-corrected visual acuity; CSMT, central subfield macular thickness; logMAR, logarithm of minimum angle of resolution; FLA, total area (mm<sup>2</sup>) of fluorescein leakage from active neovascularization; PRP, panretinal photocoagulation; PRP*plus*, panretinal photocoagulation plus intravitreal injection of 0.5 mg of ranibizumab; SEM, standard error of the mean; p values regarding within group analysis in italics.

(Tonello et al. 2007), a mean reduction of 6.7 mm<sup>2</sup> of FLA (11.2 mm<sup>2</sup> at baseline to  $4.5 \text{ mm}^2$  at week 16) was observed in the group treated with PRP and bevacizumab, compared with a 3.9 mm<sup>2</sup> mean reduction (from 11.7  $mm^2$  at baseline to 7.8  $mm^2$  at week 16) observed in the present study in the group treated with PRP plus IVR. Because these studies had the same inclusion criteria, but were not conducted simultaneously, we speculate that bevacizumab plus PRP may lead to a more persistent effect on the suppression of NV leakage than ranibizumab plus PRP given that bevacizumab has a longer half-life in the vitreous cavity than ranibizumab (Bakri et al. 2007).

According to the ETDRS, approximately 60% of patients with PDR respond to PRP with regression of NV within 3 months (12 weeks) of treatment using ETDRS guidelines (ETDR Study Research Group 1987; Vander et al. 1991). However, in the present study, similar to a previous study using bevacizumab (Tonello et al. 2007), no patient demonstrated complete regression of retinal NV 48 weeks after PRP. We believe that the most probable reason for the limited rate of decreased leakage from active NV in the current study is the poor glycemic control and somewhat more aggressive behaviour of diabetic retinopathy in more pigmented Latin individuals. In fact, none of the patients included in this study had a HbA1C level below 7%. Moreover, in contrast to the ETDRS, the population of the current study was mostly composed of Hispanic white and black individuals, which have been reported by Emmanuele et al. (2005) to have higher diabetic retinopathy severity scores than non-Hispanic whites.

Although both treatments are associated with significant regression of active NV, no BCVA change was observed after treatment in the PRPplus group, while significant visual acuity worsening was observed in patients treated only with PRP. Similarly, a recent study from the Diabetic Retinopathy Clinical Research (DRCR) Network (2010) showed that IVR associated with focal/grid laser was associated with significantly improved BCVA compared to treatment with focal/grid laser alone in patients with diabetic macular oedema. In our study, patients with clinically significant diabetic macular oedema received focal/grid photocoagulation and IVR at the baseline visit, whereas in the DRCR Network study, IVR was performed at baseline and focal/grid laser was administered either within 1 week of baseline (prompt laser) or possibly after week 24 (deferred laser). Of note, our study included mainly patients without clinically significant macular oedema and, in these patients, a trend towards CSMT decrease was observed in the PRPplus group, while a statistically significant CSMT increase was observed in eyes treated with PRP alone. Even though mechanisms involved in retina preservation that contribute to better BCVA results when IVR is administered in addition to PRP remain speculative, the IVR stabilization of the blood-retinal barrier (Zhang et al. 2006) might be a reasonable explanation, because IVR can reduce macular interstitial fluid or oedema that, even when subclinical, might cause retinal functional impairment. (Browning et al. 2008; Ramalho et al. 2009),

No difference in intraocular pressure and lens grading score between the two groups was observed throughout the study, and no significant change in intraocular pressure was observed at any study visit compared with baseline in either group. The results of the current study are consistent with data from other studies regarding no apparent association between IVR injection and increase in intraocular pressure, cataract development/progression, or an increased rate of endophthalmitis related to the study drug (Avery et al. 2006; Chun et al. 2006; Iturralde et al. 2006; Jorge et al. 2006; Mason et al. 2006; DRCR net 2010). In addition, progression to advanced PDR occurred only in patients in the PRP group (one patient had tractional retinal detachment and another had nonclearing vitreous haemorrhage), but conclusions regarding differences in safety related to this parameter are limited by the small number of patients included.

Overall, combining alternative therapeutic agents (Grant et al. 2000; Tonello et al. 2007) with laser photocoagulation is a promising strategy. In the present study, the combination of IVR injection with PRP was associated with stable CSMT, a significant improvement in BCVA and a trend towards a higher rate of regression of actively leaking NV than PRP alone in patients with high-risk PDR. Despite — Acta Ophthalmologica 2011

these benefits, one must bear in mind the 0.4% risk of endophthalmitis related to IVR injections (DRCR Network 2010). Finally, further studies with a larger number of patients and longer follow-up are warranted to confirm our preliminary findings.

## Acknowledgments

Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Grant number: 2009/01036-3.

## References

- Adamis AP, Miller JW, Bernal MT et al. (1994): Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. Am J Ophthalmol 118: 445–450.
- Adamis AP, Shima DT, Tolentino MJ et al. (1996): Inhibition of vascular endothelial growth factor prevents retinal ischemia associated iris neovascularization in a nonhuman primate. Arch Ophthalmol 114: 66–71.
- Adamis AP, Altaweel M, Bressler NM et al. (2006): Changes in retinal neovascularization after pegaptanib (Macugen) therapy in diabetic individuals. Ophthalmology 113: 23–28.
- Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG et al. (1994): Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. N Engl J Med 331: 1480–1487.
- Aiello LP, Pierce EA, Foley ED et al. (1995): Suppression of retinal neovascularization in vivo by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGFreceptor chimeric proteins. Proc Natl Acad Sci USA 92: 10457–10461.
- Avery RL (2006): Regression of retinal and iris neovascularization after intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment. Retina **26**: 352– 354.
- Avery RL, Pearlsman J, Pieramici DJ et al. (2006): Intravitreal bevacizumab (Avastin) in the treatment of proliferative diabetic retinopathy. Ophthalmology 113: 1695.e1-1695.e15
- Bakri SJ, Snyder MR, Reid JM, Pulido JS, Ezzat MK & Singh RJ (2007): Pharmacokinetics of intravitreal ranibizumab (Lucentis). Ophthalmology 114: 2179–2182.
- Browning DJ, Fraser CM & Clark S (2008): The relationship of macular thickness to clinically graded diabetic retinopathy severity in eyes without clinically detected diabetic macular edema. Ophthalmology 115: 533-539. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR et al.
- Chobanian AV, Bakris GL, Black HR et al. (2003): National Heart, Lung, and Blood Institute Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. The seventh report of the joint national committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure: the JNC 7 report. JAMA 289: 2560– 2572.

- Chun DW, Heier JS, Topping TM et al. (2006): Pilot study of multiple intravitreal injections of ranibizumab in patients with center-involving clinically significant diabetic macular edema. Ophthalmology 113: 1707–1712.
- Chylack LT, Wolfe JK, Singer DM et al. (1993): The lens opacities classification system III. Arch Ophthalmol 111: 831-836.
- Cunningham ET Jr, Adamis AP, Altaweel M et al. (2005): A phase II randomized doublemasked trial of pegaptanib, an anti-vascular endothelial growth factor aptamer, for diabetic macular edema. Ophthalmology **112**: 1747–1757.
- Diabetic Retinopathy Clinical Research Network (2010): Randomized trial evaluating ranibizumab plus prompt or deferred laser or triamcinolone plus prompt laser for diabetic macular edema. Ophthalmology 117: 1064– 1077.
- Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group (1985): Photocoagulation for diabetic macular edema. ETDRS report number 1. Arch Ophthalmol 103; 1796–1806.
- Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group (1987): Techniques for scatter and local photocoagulation treatment of diabetic retinopathy: ETDRS Report number 3. Int Ophthalmol Clin 27: 254-264.
- Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group (1991a): Early photocoagulation for diabetic retinopathy. ETDRS report number 9. Ophthalmology 98: 766-785.
- Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group (1991b). Fundus photographic risk factors for progression of diabetic retinopathy. ETDRS report number 12. Ophthalmology 98: 823-833.
- Emmanuele N, Sacks J, Klein R et al. (2005): Veterans affairs diabetes trial group. Diabetes Care 28: 1954–1958.
- Flynn HW Jr, Chew EY, Simons BD et al. (1992): Pars plana vitrectomy in the early treatment diabetic retinopathy study. ETDRS report number 17. Ophthalmology 99: 1351-1357.
- Folkman J (1971): Tumor angiogenesis: therapeutic implications. N Engl J Med 285: 1182– 1186.
- Grant MB, Mames RN, Fitzgerald C et al. (2000): The efficacy of ocreotide in the therapy of severe nonproliferativeand early proliferative diabetic retinopathy: a randomized controlled study. Diabetes Care 23: 504-509.
- Iturralde D, Spaide RF, Meyerle CB et al. (2006): Intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment of macular edema in central retinal vein occlusion: a short-term study. Retina 26: 279–284.
- Jorge R, Costa RA, Calucci D et al. (2006): Intravitreal bevacizumab (Avastin) for persistent new vessels in diabetic retinopathy (IBEPE study). Retina 26: 1006-1013.
  Jorge R, Oliveira RS, Messias A, Almeida FP,
- Jorge R, Oliveira RS, Messias A, Almeida FP, Strambe ML, Costa RA & Scott IU (2011): Ranibizumab for retinal neovascularization. Ophthalmology 118: 1004–1005.
- Klein R (1992): Retinopathy in a populationbased study. Trans Am Ophthalmol Soc 90: 561-594.
- Malecaze F, Clamens S, Simorre-Pinatel V et al. (1994): Detection of vascular endothelial growth factor messenger RNA and vascular endothelial growth factor-like activity in pro-

liferative diabetic retinopathy. Arch Ophthalmol 112: 1476-1482.

- Mason JO, Nixon PA & White MF (2006): Intravitreal injection of bevacizumab (Avastin) as adjunctive treatment of proliferative diabetic retinopathy. Am J Ophthalmol 142: 685–688.
- Matsuyama K, Ogata M, Jo N et al. (2009): Levels of vascular endothelial growth factor and pigment epithelium-derived factor in eyes before and after intravitreal injection of bevacizumab. Jpn J Ophthalmol 53: 243-248.
- Ramalho LH, Avila MP, Moraes Júnior HV & Damasceno Ede F (2009): Subclinical diabetic macular edema and mild non-proliferative diabetic retinopathy: data correlation with the retinal thickness analyzer (RTA)]. Arg Bras Oftalmol 72: 503-508.
- Ribeiro JAS, Messias AMV, Scott IU et al. (2009): Alternative technique for reducing compound waste during intravitreal injections. Arq Bras Oftalmol 72: 641–644.
- Sawada O, Kawamura H, Kakinoki M et al. (2007): Vascular endothelial growth factor in áqüeos humor before and after intravitreal injection of bevacizumab in eyes with diabetic retinopathy. Arch Ophthalmol 125: 1363-1366.
- Spaide RF & Fisher YL (2006): Intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment of proliferative diabetic retinopathy complicated by vitreous hemorrhage. Retina 26: 275–278.
- The diabetic retinopathy study Research Group (1979): Four risk factors for severe visual loss in diabetic retinopathy. The third report from the diabetic retinopathy study. Arch Ophthalmol **97**: 654–655.
- Tonello M, Costa RA, Almeida FPP, Barbosa JC, Scott IU & Jorge R (2007): Panretinal photocoagulation versus PRPplus intravitreal bevacizumab for high-risk proliferative diabetic retinopathy (IBeHi study). Acta Opthalmol 86: 385–389.
- Vander JF, Duker JS, Benson WE et al. (1991): Long-term stability and visual outcome after favorable initial response of proliferative diabetic retinopathy to pararetinal photocoagulation. Ophthalmology 98: 1575–1579.
- Zhang XS, Wang JJ, Gao G et al. (2006): Pigment epithelium-derived factor downregulates vascular endothelial growth factor (VEGF) expression an inhibits VEGF-VEGF receptor 2 binding in diabetic retinopathy. J Mol Endocrinol 37: 1–12.

Received on October 31th, 2010. Accepted on April 21th, 2011.

Correspondence:

Rodrigo Jorge, MD, PhD

Departamento de Oftalmologia

Otorrinolaringologia e Cirurgia da Cabeça e Pescoço

FMRP. USP

Av. Bandeirantes 3900

Ribeirão Preto, SP, 14049-900

Brazil Tel: 55 (16) 3602 2523

Fax: 55 (16) 3602 2860 Email: rjorge@fmrp.usp.br Doc Ophthalmol (2012) 124:225–236 DOI 10.1007/s10633-012-9322-5

ORIGINAL RESEARCH ARTICLE

## Electroretinographic findings associated with panretinal photocoagulation (PRP) versus PRP plus intravitreal ranibizumab treatment for high-risk proliferative diabetic retinopathy

André Messias · José Afonso Ramos Filho · Katharina Messias · Felipe P. P. Almeida · Rogério A. Costa · Ingrid U. Scott · Florian Gekeler · Rodrigo Jorge

Received: 1 December 2011/Accepted: 8 March 2012/Published online: 29 March 2012 © Springer-Verlag 2012

**Abstract** To evaluate changes in electroretinographic (ERG) findings after panretinal photocoagulation (PRP) compared to PRP plus intravitreal injection of ranibizumab (IVR) in eyes with high-risk proliferative diabetic retinopathy (PDR). Patients with high-risk PDR and no prior laser treatment were assigned randomly to receive PRP (PRP group; n = 9) or PRP plus IVR (PRPplus group; n = 11). PRP was administered in two sessions (weeks 0 and 2), and IVR was administered at the end of the first laser session (week 0) in the PRPplus group. Standardized ophthalmic evaluations including (ETDRS) best-corrected visual acuity (BCVA), and fluorescein angiography to measure area of fluorescein leakage (FLA), were

www.clinicaltrials.gov: NCT00993525.

A. Messias (⊠) · J. A. R. Filho · K. Messias ·
F. P. P. Almeida · R. A. Costa · R. Jorge
Department of Ophthalmology, Otorhinolaryngology and
Head and Neck Surgery – School of Medicine of Ribeirão
Preto, University of São Paulo, Av. Bandeirantes 3900,
Ribeirão Preto, SP 14049-900, Brazil
e-mail: amessias@usp.br

#### I. U. Scott

Departments of Ophthalmology and Public Health Sciences, Penn State College of Medicine, Hershey, PA, USA

F. Gekeler

Centre for Ophthalmology, University of Tübingen, Schleichstr. 12 - 16, 72076 Tübingen, Germany performed at baseline and at weeks 16 ( $\pm 2$ ), 32 ( $\pm 2$ ) and 48  $(\pm 2)$ . ERG was measured according to ISCEV standards at baseline and at week 48  $(\pm 2)$ . At 48 weeks, 2,400-3,000 laser spots had been placed in eyes in the PRP group, while only 1,400-1,800 spots had been placed in the PRPplus group. Compared to baseline, there was a statistically significant (P < 0.05) FLA reduction observed at all study visits in both groups, with the reduction observed in the PRPplus group significantly larger than that in the PRP group at week 48. ROD b-wave amplitude was significantly reduced to  $46 \pm 5 \%$  (P < 0.05) of baseline in the PRP group and  $64 \pm 6 \% (P < 0.05)$  in the PRPplus group. This reduction was significantly larger in the PRP group than in the PRPplus group (P = 0.024; t Test). Similar results were observed for the dark-adapted Combined Response (CR) b-wave amplitude, with a reduction at 48 weeks compared to baseline of 45  $\pm$  4 % in the PRP group and 62  $\pm$  5 % in the PRPplus group; the reduction in CR b-wave amplitude was significantly larger in the PRP group than in the PRP*plus* group (P = 0.0094). CR a-wave, oscillatory potentials, cone single flash, and 30 Hz flicker responses showed statistically significant within-group reductions, but no differences in between-group analyses. These results suggest that treating high-risk PDR with PRP plus IVR is effective for PDR control, and permits the use of less extensive PRP which, in turn, induces less retinal functional loss, in particular for rod-driven post-receptoral responses, than treatment with PRP alone.

**Keywords** Electroretinography · Angiogenesis · Diabetes · Laser treatment · Vascular endothelial growth factor (VEGF)

### Introduction

Retinal neovascularization (NV) represents an important risk factor for severe vision loss in patients with diabetic retinopathy [1, 2]. Approximately 60 % of patients with proliferative diabetic retinopathy (PDR) respond to panretinal photocoagulation (PRP) [3, 4], which is a destructive and painful procedure and is commonly associated with decreased peripheral vision and increased risk of macular edema [5].

Vascular endothelial growth factor (VEGF) has been associated in the pathogenesis of PDR and other eye diseases characterized by NV [6–9]. Levels of VEGF are increased in the vitreous of eyes with PDR. Blockage of VEGF has been associated with inhibition NV formation [10–12]. Several clinical trials are currently evaluating the role of anti-VEGF agents for the treatment of retinal NV in diabetic patients with encouraging preliminary results [13–15].

Combining anti-VEGF therapy with PRP has been proposed as a promising alternative for PRP alone for high-risk PDR [16–18], and for the management of diabetic macular edema in eyes also receiving PRP [19]. Our group recently reported that intravitreal ranibizumab after PRP is associated with a larger reduction in fluorescein angiography leakage (FLA) compared with PRP alone in eyes with high-risk PDR, with potential protection against the visual acuity loss and macular swelling that has been observed following PRP alone [20].

Electroretinography (ERG) has been used to detect early functional changes and predict progression in diabetic retinopathy [21], to evaluate retinal ischemia [22], and to record retinal function loss after PRP [23–25]. It has been shown that PRP reduces the amplitudes of a- and b-waves of the ERG [24].

In a previous study, we demonstrated that less extensive PRP is needed to control high-risk PDR if the combination of PRP and IVR is used [20], and there is also evidence that intravitreal anti-VEGF drugs can improve ERG responses if associated with reduction of retinal edema [26].

In the current study, we aim to evaluate changes in electroretinographic (ERG) findings after PRP compared to PRP plus intravitreal injection of ranibizumab (IVR) in eyes with high-risk PDR.

## Methods

The study protocol adhered to the tenets of the Declaration of Helsinki and was approved by the local Institutional Review Board; all participants gave written informed consent before entering the study.

Patient eligibility and baseline evaluation

Patients were included if they had high-risk PDR, which was defined according to the guidelines of the Early Treatment Diabetic Retinopathy Study [2, 27] as follows: (1) presence of NV at the disc (NVD) greater than ETDRS standard photograph 10A, or (2) presence of NVD associated with vitreous or pre-retinal hemorrhage, or (3) NV elsewhere (NVE) with more than a half disk area associated with vitreous or pre-retinal hemorrhage.

Exclusion criteria were the following: (1) history of prior laser treatment or vitrectomy in the study eye; (2) history of thromboembolic event—including myocardial infarction or cerebrovascular accident; (3) major surgery within the prior 6 months or planned within the next 28 days; (4) uncontrolled hypertension (according to guidelines of the seventh report of the joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure [JNC-7] [28]); (5) known coagulation abnormalities or current use of anticoagulative medication other than aspirin; or (6) any condition affecting documentation.

Standardized ophthalmic evaluations including (ETDRS) best-corrected visual acuity (BCVA) and fluorescein angiography were performed at baseline and at weeks 16 ( $\pm$ 2), 32 ( $\pm$ 2) and 48 ( $\pm$ 2); ERGs were performed at baseline and at week 48 ( $\pm$ 2).

### ERG protocol

ERG was performed using an extended protocol based on the ISCEV standard [29], using the Espion E2 recording unit and the ColorDome (Diagnosys LLC, Middleton, MA, USA) as Ganzfeld LED stimulator, using DTL electrodes.

After dark-adaptation and pupil dilatation, a series of increasing light intensity flashes (from 0.001 to

#### Doc Ophthalmol (2012) 124:225-236

0.1 cd.s/m<sup>2</sup>, including the ROD-response (0.01 cd.s/m<sup>2</sup>)) were used to allow estimation of parameters  $V_{\text{max}}$  (saturation amplitude) and k (luminance for reaching  $\frac{1}{2} V_{\text{max}}$ ), considered for evaluation of the retinal scotopic sensitivity [30].

Subsequently, responses to the Combined Response (CR) stimulus  $(3 \text{ cd.s/m}^2)$  and the High Intensity (HI) response stimulus  $(10 \text{ cd.s/m}^2)$  were recorded to allow evaluations of the a-wave and the oscillatory potentials (OPs). OPs were filtered from the CR using a built-in band pass filter set between 75 and 100 Hz; the wavelet's area under the curve was used for analysis.

Thereafter, eyes were light adapted for 10 min using a light background of 30 cd/m<sup>2</sup> with the same Ganzfeld unit. Cone single flash (3 cd.s/m<sup>2</sup>; background of 30 cd/m<sup>2</sup>) and 30 Hz flicker responses (3 cd.s/m<sup>2</sup> at 30 Hz; background of 30 cd/m<sup>2</sup>) were recorded.

#### Treatment assignment

All patients received PRP performed in two sessions (at week 0 and week 2) according to ETDRS guidelines [31]. Six to eight hundred 500  $\mu$ m spots were applied per session, at the discretion of the treating investigator. If eyes showed clinically significant macular edema [32], macular focal/grid laser was performed at the time of the first PRP session. Patients could be retreated with focal laser at the 16-week and 32-week study visits.

If both eyes of one patient were eligible for the study, the eye with best visual acuity was included. Patients were enrolled in groups of two, and treatment group was assigned randomly. A technician was asked to pick one of two identical opaque envelopes: one contained the designation for PRP, and the other contained the designation for PRP plus intravitreal ranibizumab (PRP*plus*) treatment. The second patient was automatically assigned to the treatment designated in the second envelope.

For eyes assigned to the PRP*plus* group, intravitreal ranibizumab (0.5 mg, 0.05 ml) was administered 60 min after completion of the first PRP session as described elsewhere [20]. At weeks 16 and 32, if active new vessels were detected on fluorescein angiography, patients in the PRP*plus* group received IVR and patients in the PRP group received five hundred additional 500 µm spots per quadrant of

active new vessels. Also at weeks 16 and 32, if clinically significant macular edema was present, patients could be retreated with focal/gird laser if, in the opinion of the treating investigator, additional laser spots were possible.

The patients included in the current study (9 patients in the PRP group and 11 patients in the PRP*plus* group) were also enrolled in the study reported previously [20]. Fifteen normal-sighted subjects (similar age range) with no known eye disease were evaluated with the same protocol as the treated patients.

#### Fluorescein leakage area (FLA) measurement

Digital red-free fundus photography and fluorescein angiography were performed using two fundus camera systems (HRA-OCT, Heidelberg, Germany, and TRC-50IA-IMAGEnet; Topcon, Japan). The total area (mm<sup>2</sup>) of fluorescein leakage from active NV was measured manually on the digital image using the Image J software (version 1.38, available at http://rsb. info.nih.gov/ij/); if more than one site of active NV were found, the sum area, including all sites, was measured for analysis.

#### Statistical analysis

ERG parameters (amplitudes and latencies) were compared between groups at baseline using one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey–Kramer HSD for the multiple comparison (Controls, PRP and PRP*plus*). The effect of treatment was compared within each group (PRP and PRP*plus*) using paired t tests, and between groups using t tests. In all analyses, P < 0.05 was considered the level of significance.

#### Results

At 48 weeks, a mean  $\pm$  standard deviation of 2,736  $\pm$  93 (2,620–2,884) laser spots were present in eyes in the PRP group, compared to 1,636  $\pm$  96 (1,494–1,800) spots in eyes in the PRP*plus* group (P < 0.0001). Only 2 patients from the PRP group and 3 patients from the PRP*plus* group had been treated with focal macular laser. Patients' demographic data are shown in Table 1.

-	PRP plus	PRP	Р
Age (mean $\pm 1$ SD)	$59\pm12$	$64\pm8$	(0.7522)
Gender (male/female)	6/5	5/4	(0.9640— Likelihood ratio)
Race (Black/Hispanic/ Caucasian)	1/6/4	1/5/3	(0.9831— Likelihood ratio)
Duration of diabetes (mean $\pm$ 1 SD)	$14\pm 6$	$13\pm9$	(0.6330)
Treatment regimen (no insulin/insulin)	1/10	1/8	(0.8812— Likelihood Ratio)
HbA1c (mean $\pm$ SD)	$9\pm1$	$9\pm1$	(0.4315)

HbA1c glycosylated hemoglobin; PRP panretinal photocoagulation; PRPplus panretinal photocoagulation and intravitreal injection of ranibizumab, SD standard deviation

## Fluorescein leakage area (FLA)

Compared to baseline, there was a statistically significant (P < 0.05) FLA reduction at all study visits in each group, with the reduction in the PRP*plus* group significantly larger than that in the PRP group at week 48. The mean  $\pm$  SE FLA was 10.5  $\pm$  1.6 mm<sup>2</sup> and 11.6  $\pm$  1.3 mm<sup>2</sup> at baseline, and 7.0  $\pm$  1.9 (P = 0.0007) and 6.0  $\pm$  1.1 (P < 0.0001) at week 48 in the PRP group and the PRP*plus* group, respectively (P = 0.0074).

## Best-corrected visual acuity (BCVA)

There was no statistically significant change in BCVA for eyes in the PRP and the PRP*plus* groups during the follow-up period. Mean  $\pm$  SE BCVA was 0.30  $\pm$  0.06 logMAR and 0.28  $\pm$  0.07 logMAR at baseline; and 0.37  $\pm$  0.07, and 0.28  $\pm$  0.07 at week 48 in the PRP and PRP*plus* group, respectively (P > 0.05).

## Dark-adapted ERG at baseline

The  $V_{\text{max}}$  parameter (dark-adapted b-wave saturation amplitude) was significantly lower in the PRP and PRP*plus* groups when compared to controls (ANOVA; P < 0.05), and parameter k (luminance necessary to reach  $\frac{1}{2}$  of saturated dark-adapted b-wave amplitude) was higher in the PRP and PRP*plus* groups when

## Doc Ophthalmol (2012) 124:225-236

compared to controls. There was no statistically significant difference between the PRP and PRP*plus* groups for either  $V_{\rm max}$  or k (Fig. 1). The mean  $\pm$  SE  $V_{\rm max}$  ( $\mu$ V) at baseline was 430.7  $\pm$  26.0; 240.3  $\pm$  53.1; and 255.8  $\pm$  19.9, and the mean K (Log<sub>10</sub> cd.s/m<sup>2</sup>) was  $-2.70 \pm 0.03$ ;  $-2.45 \pm 0.06$ ; and  $-2.55 \pm 0.04$  for controls, PRP eyes and PRP*plus* eyes, respectively.

ROD-response b-wave, CR, and HI flash response a- and b-wave amplitudes were significantly reduced in PRP and PRP*plus* eyes when compared to control eyes, but there were no significant differences between the PRP and PRP*plus* groups at baseline (Table 2; Fig. 1).

ROD b-wave, and CR a- and b-wave implicit times were increased in PRP and PRPplus eyes when compared to control eyes; for the high intensity flash response, only the a-wave implicit time showed differences between the PRP and PRPplus groups compared to the control group, but there were no differences between the PRP and PRPplus groups (Table 2; Fig. 1). Disparities between eyes with PDR and control eyes with respect to ERG implicit times are larger for the lower luminance stimulus, indicating a tendency for stronger deterioration of rod-driven potentials in PDR.

OP amplitude was dramatically reduced for PRP and PRP*plus* eyes compared to control eyes. There was no significant difference in OP amplitudes at baseline between the PRP and PRP*plus* groups OP (Table 2; Fig. 1).

## Light-adapted ERG at baseline

30 Hz flicker and Cone b-wave amplitudes were reduced while second peak time and b-wave implicit time were prolonged in the PRP and PRP*plus* groups compared to controls, but there were no significant differences between the PRP and PRP*plus* groups for these values at baseline (Table 3; Fig. 2).

## Effects of PRP and PRPplus on dark-adapted ERG

In general, PRP and PRP*plus* treatments were associated with reduced ERG amplitudes and increased implicit times, but despite considerable group differences in number of applied laser spots (mean number of spots: PRP = 2,700; PRP*plus* = 1,600), only few ERG parameters demonstrated functional differences between the PRP and PRP*plus* groups.

228

## Table 1 Patient demographic data

Fig. 1 Dark-adapted ERG at baseline: On top, examples of dark-adapted ERG responses from one control subject, one patient from group PRP, and one patient from PRPplus group. In a circles represent b-wave amplitude plotted against stimulus luminance and lines are the best fit with the Naka-Rushton function. Parameters  $V_{max}$  and k are highlighted for the controls. In b circles represent the mean and the error bars the 95 % confidence limit for parameter  $V_{\text{max}}$ , and in c for parameter k. From d to h circles represent the mean and the error bars the 95 % confidence limit for b-wave amplitude d; b-wave implicit time e; a-wave amplitude f; a-wave implicit time g; and oscillatory potentials h for each stimulus (ROD: 0.01 cd.s/m<sup>2</sup>, Combined Response: 3.0 cd.s/m<sup>2</sup>, and high intensity response: 10.0 cd.s/m<sup>2</sup>). Circles and lines in green show results from controls, red: PRP and blue: PRPplus



229

🙆 Springer

b-wave amplitude and implicit times and oscillatory potentials intensity response: 10.0 cd.s/m <sup>2</sup> ) area under the curve (OP) for dark-adapted ERG responses					
	cd.s/m <sup>2</sup>	Controls	PRP	PRPplus	P (ANOVA)
a-wave amplitude (µV)	3	$324.7\pm13.0$	$206.2\pm23.8$	$233.3\pm20.6$	<.0001
	10	$392.4\pm14.7$	$275.8\pm26.8$	$306.5\pm23.2$	0.0003
a-wave implicit time (ms)	3	$15.6\pm0.2$	$20.2\pm0.4$	$19.8\pm0.4$	<.0001
	10	$12.8\pm0.2$	$16.4\pm0.4$	$15.9\pm0.4$	<.0001
b-wave amplitude $(\mu V)$	0.01	$373.1\pm17.1$	$178.7\pm31.2$	$206.2\pm27.0$	< 0.0001
	3	$556.8\pm24.2$	$337.2\pm44.1$	$362.8\pm38.2$	< 0.0001
	10	$\textit{581.6} \pm \textit{23.3}$	$369.6\pm42.6$	$401.2\pm36.9$	< 0.0001
b-wave implicit time (ms)	0.01	$83.8\pm1.7$	$104.3\pm3.1$	$101.7\pm2.7$	< 0.0001
	3	$49.6\pm1.0$	$53.1\pm1.7$	$53.8\pm1.5$	0.0387
	10	$50.0\pm1.3$	$55.0\pm2.3$	$52.6\pm2.0$	0.1439
OP (µV.ms)	3	$790.4\pm24.8$	$213.2\pm45.2$	$255.3\pm39.2$	< 0.0001
	10	$945.4 \pm 33.7$	$272.8 \pm 61.6$	$363.2 \pm 53.4$	< 0.0001

Table 2 Mean  $\pm$  Standard Error (SE) of baseline a- and

(ROD: 0.01 cd.s/m<sup>2</sup>, combined response: 3.0 cd.s/m<sup>2</sup>, and high

Italic values indicate significantly different results for group comparison (Tukey-Kramer HSD; P < 0.05)

Table 3 Mean ± Standard Error (SE) of baseline a- and b-wave amplitude and implicit times for light-adapted ERG responses (30 Hz: 3.0 cd.s/m<sup>2</sup> at 30 Hz; and Cone Response: 3.0 cd.s/m<sup>2</sup>)

ау С	Controls	PRP	PRPplus	P (ANOVA)
30 Hz amplitude (µV)	$142.6\pm 6.2$	$59.5 \pm 10.7$	$90.7\pm6.5$	<0.0001
30 Hz peak time (ms)	$26.6\pm0.2$	$34.8\pm1.1$	$34.3\pm0.9$	< 0.0001
Cone b-wave amplitude (µV)	$191.5\pm9.1$	$78.7 \pm 12.2$	$101.3\pm8.5$	< 0.0001
Cone b-wave implicit time (ms)	$30.0\pm0.2$	$35.9\pm0.5$	$35.3\pm0.7$	< 0.0001

Italic values indicate significantly different values for group comparison. Stimulus luminance = 3.0 cd.s/m<sup>2</sup>, for Cone and 30 Hz

The ROD b-wave amplitude was significantly reduced to  $46 \pm 5 \%$  (P < 0.05) of baseline in the PRP group, and to  $64 \pm 6$  % (P < 0.05) in the PRPplus group. This reduction was significantly higher in the PRP group compared to the PRPplus group (P = 0.0242). Similar results were observed for the CR amplitude, with a reduction at 48 weeks compared to baseline of  $45 \pm 4$  % in the PRP group and  $62 \pm 5$  % in the PRPplus group; the reduction in CR amplitude was significantly larger in the PRP group than in the PRPplus group (P = 0.0094)(Table 4; Fig. 3).

CR a-wave and OP showed significant withingroup reductions (Table 4; Fig. 3), but no significant differences in between-group analyses.

For all responses, the b-wave implicit times were significantly increased after treatment with PRP or PRPplus, but there were no significant differences in between-group analyses. On the other hand, a-wave implicit times did not show significant changes after treatment with PRP or PRPplus (Table 4; Fig. 3).

#### Effects of PRP and PRPplus on light-adapted ERG

30 Hz and Cone b-wave amplitudes showed significant within-group reductions in the PRP and PRPplus groups (P < 0.05) (Table 5; Fig. 4), but no differences in between-group analyses were observed.

30 Hz time-to-peak did not show significant changes after treatment with PRP or PRPplus, while Cone b-wave implicit time was significantly increased after treatment in the PRP and PRPplus groups (Table 5; Fig. 4).



Fig. 2 Light-adapted ERG at baseline. On top, examples of light-adapted ERG responses from one control subject, one patient from group PRP, and one patient from PRP*plus* group. In a 30 Hz amplitude; b Cone b-wave amplitude; c 30 Hz time-to-

peak; and **d** Cone b-wave implicit time. *Circles* and *lines* in *green* show results from controls, *red*: PRP and *blue*: PRPplus. *Circles* represent the mean and the *error bars* the 95 % confidence limit

Table 4 Mean  $\pm$  Standard Error (SE) of intra-individual ratio of baseline of a- and b-wave amplitude and OP and intra-individual difference of baseline of implicit time for dark-

adapted ERG responses (ROD:  $0.01 \text{ cd.s/m}^2$ , Combined Response:  $3.0 \text{ cd.s/m}^2$ , and High Intensity Response:  $10.0 \text{ cd.s/m}^2$ )

	cd.s/m <sup>2</sup>	PRP	PRPplus	P (between-groups)
a-wave amplitude (ratio of baseline)	3	$0.46\pm0.07$	$0.49\pm0.06$	0.3590
	10	$0.48\pm0.06$	$0.50\pm0.05$	0.3878
a-wave implicit time	3	$0.78 \pm 0.36$	$0.17 \pm 0.21$	0.9158
(difference of baseline in ms)	10	$0.67 \pm 0.44$	$0.25\pm0.30$	0.7755
b-wave amplitude (ratio of baseline)	0.01	$0.46\pm0.05$	$0.64\pm0.06$	0.0119
	3	$0.45\pm0.04$	$0.62\pm0.05$	0.0053
	10	$0.46\pm0.05$	$0.59\pm0.03$	0.0254
b-wave implicit time (difference of baseline in ms)	0.01	$8.89\pm3.11$	$7.92\pm2.57$	0.5937
	3	$7.33\pm2.03$	$6.75 \pm 1.63$	0.5873
	10	$7.00\pm1.49$	$5.17 \pm 1.17$	0.8265
OP (ratio of baseline)	3	$0.67\pm0.07$	$0.69\pm0.13$	0.4456
	10	$0.63\pm0.06$	$0.60\pm0.09$	0.5849
b-wave implicit time (difference of baseline in ms) OP (ratio of baseline)	10 0.01 3 10 3 10	$\begin{array}{c} 0.46 \pm 0.05 \\ 8.89 \pm 3.11 \\ 7.33 \pm 2.03 \\ 7.00 \pm 1.49 \\ 0.67 \pm 0.07 \\ 0.63 \pm 0.06 \end{array}$	$\begin{array}{c} 0.59 \pm 0.03 \\ 7.92 \pm 2.57 \\ 6.75 \pm 1.63 \\ 5.17 \pm 1.17 \\ 0.69 \pm 0.13 \\ 0.60 \pm 0.09 \end{array}$	0.0254 0.5937 0.5873 0.8265 0.4456 0.5849

Bold highlight cells with no statistically significant within-group changes after treatment, while italic value indicate the betweengroups statistically significant different results (Tukey–Kramer HSD; P < 0.05)

231

Doc Ophthalmol (2012) 124:225-236

Fig. 3 Treatment effects on dark-adapted ERG. On top, examples of dark-adapted ERG responses from one patient from PRP (red) and one patient from PRPplus group (blue). Dashed lines show the responses at baseline and filled line at week 48 for each stimulus (ROD: 0.01 cd.s/m<sup>2</sup>, Combined response: 3.0 cd.s/m<sup>2</sup>, and high intensity response: 10.0 cd.s/m<sup>2</sup>). In  $\mathbf{a}$  the b-wave amplitude; b b-wave implicit time; c a-wave amplitude; d a-wave implicit time; and e oscillatory potentials for each stimulus (ROD:  $0.01 \text{ cd.s/m}^2$ , combined response: 3.0 cd.s/m<sup>2</sup>, and high intensity response: 10.0 cd.s/m<sup>2</sup>). Circles and lines in red show results from PRP and blue: PRPplus. Circles represent the mean and the error bars the 95 % confidence limit



🖗 Springer

#### Doc Ophthalmol (2012) 124:225-236

Table 5 Mean  $\pm$  Standard Error (SE) of intra-individual ratio of baseline amplitude and intra-individual difference of baseline implicit time for light-adapted ERG responses (30 Hz: 3.0 cd.s/m<sup>2</sup> at 30 Hz; and cone response: 3.0 cd.s/m<sup>2</sup>)

	PRP	PRPplus	P (between-groups)
30 Hz amplitude (ratio of baseline)	$0.45\pm0.07$	$0.40\pm0.04$	0.7036
30 Hz peak time (difference of baseline in ms)	$1.00\pm0.93$	$0.45\pm0.58$	0.6863
Cone b-wave amplitude (ratio of baseline)	$2.00\pm0.58$	$1.36\pm0.45$	0.7991
Cone b-wave implicit time (difference of baseline in ms)	$0.45\pm0.06$	$0.49\pm0.05$	0.3161

Italic highlights cells with no statistically significant within-group changes after treatment

## Discussion

We have previously shown that combining IVR with PRP reduces the amount of PRP needed to control high-risk PDR progression, with even larger reduction in FLA leakage than using PRP alone [20]. In the current study, we aimed to describe retinal function, using ERG, in eyes with high-risk PDR, to record the functional impairment caused by extensive PRP, and to investigate if the combination of IVR plus PRP is associated with less retinal functional loss than treatment with PRP alone.

ERG is the only objective method of evaluating retinal function in vivo and is employed to detect distinct local or widespread hereditary or acquired retinal disorders including DR [33]. As an example, OP amplitude shows correlations with retinal arteriolar caliber in diabetic patients [34] and has been proposed to be useful for predicting DR progression and even to detect retinal dysfunction that precedes the onset of clinically detectable DR [35].

Data presented confirm previous descriptions of ERG changes in PDR: reduced a- and b-wave amplitudes and prolonged implicit times, for rod and cone driven responses, and dramatically reduced OP amplitudes [21, 36]. Moreover, the largest difference between controls and patients was found for OP area under the curve, indicating a predominance of innerretina over photoreceptor dysfunction in eyes with high-risk PDR.

Similarly, by modeling the interrelation between dark-adapted b-wave and stimulus luminance, we showed that the saturation amplitude (parameter  $V_{max}$ ) is more affected than the half-saturation intensity (k). In fact, it has already been shown that other ERG parameters, such b/a amplitude ratio [37] and b-wave implicit time [38], can be more sensitive than the dark-adapted sensitivity, estimated with the parameter k, to

retinal functional changes due to retinal ischemia or diabetic retinopathy.

The findings after extensive PRP documented in the current study are similar to previous reports [23], in which significant reductions in a- and b-waves amplitudes of dark- and light-adapted responses were observed. This can be explained by the retinal tissue damage due to PDR.

Interestingly, the ERG parameter with the highest reduction after extensive PRP was the dark-adapted b-wave amplitude to the ROD stimulus. It is unclear why a reduction of similar magnitude was not observed in the a-wave amplitudes, since retinal photocoagulation targets the retinal pigment epithelium, affecting the outer retina and, therefore, the photoreceptors.

Based on a previously proposed theory that photocoagulation not only destroys the retinal areas directly illuminated by the laser beam, but also affects the functional integrity of adjacent areas [39], Perlman et al. [24] suggested that PRP leads to larger reductions in the dark-adapted b-wave amplitude than a-wave amplitude due to subnormal signal transmission from the photoreceptors to the proximal retina. We agree that this might be one mechanism to explain the larger reduction in b-wave amplitude compared to the reduction in a-wave amplitude.

Furthermore, it is possible that at least part of the photocoagulated retina was not ischemic and, therefore, had functional inner-retina that may have generated a substantial part of the ERG b-wave amplitudes recorded before PRP. With the destruction of these retinal areas after PRP, a- and b-wave amplitudes decreased, as observed, but the b-wave on a larger scale.

To the authors' knowledge, this is the first study to evaluate retinal function using ERG in eyes treated with PRP and IVR for PDR. The data suggest that the combined treatment strategy is associated with lower Fig. 4 Treatment effects on

100

0

-100

100

0

-100

response (µV)

response (µV)

	light-adapted ERG. On top,
	examples of light-adapted
	ERG responses from one
	patient from PRP ( <i>red</i> ) and
	group (blue) as examples
Doc Or	Dashed lines show the
	responses at baseline and
inner	filled line at week 48 for
ischen	30 Hz and cone responses. In a 30 Hz amplitude:
detecti	<b>b</b> Cone b-wave amplitude;
PRP is	c 30 Hz time-to-peak; and
domin	d Cone b-wave implicit
OP	show results from PRP and
abolist	blue: PRPplus. Circles
PRP a	represent the mean and the
adante	error bars the 95 %
effects	
PRPnl	
but no	
adapte	
PRP a	
the PR	
central	
periph	
Inc	
of IVI	
with le	
compa	
consid	
increa	
treatm	
studies	
investi	
structu	



#### Acknow Amparc

number Robson manusc

Conflic retinal function loss, indicated by lesser b-wave amplitude reduction after combined treatment, compared to treatment with PRP alone. The lower number of laser spots performed in eyes treated with PRP plus IVR compared to eyes treated with PRP alone is likely

```
to be the explanation for the lower functional loss in
the PRP plus IVR group.
```

Tra

2. ETI

fact 🖉 Springer

- study research group. Ophthalmology 98:823-833
- Vander JF, Duker JS, Benson WE, Brown GC, McNamara JA, Rosenstein RB (1991) Long-term stability and visual outcome after favorable initial response of proliferative diabetic retinopathy to panretinal photocoagulation. Ophthalmology 98:1575–1579
- 4. Flynn HW Jr, Chew EY, Simons BD, Barton FB, Remaley

ERG analysis showed that the dark-adapted b-wave amplitude elicited by a weak flash (ROD) seems to be the most sensitive ERG parameter to evaluate retinal function loss in eyes with high-risk PDR and functional changes after PRP. This response is mainly generated by the depolarization of ON bipolar cells from the rod pathway [40], which are located in the

B, Patel M, Schwartz SD, Macugen Diabetic Retinopathy Study G (2005) A phase II randomized double-masked trial of pegaptanib, an anti-vascular endothelial growth factor aptamer, for diabetic macular edema. Ophthalmology 112: 1747–1757

 Jardeleza MS, Miller JW (2009) Review of anti-VEGF therapy in proliferative diabetic retinopathy. Semin Ophthelesel 24:97-02  Jorge R, Costa RA, Calucci D, Cintra LP, Scott IU (2006) Intravitreal bevacizumab (Avastin) for persistent new vessels in diabetic retinopathy (IBEPE study). Retina 26:1006–1013

- Jorge R, Oliveira RS, Messias A, Almeida FP, Strambe ML, Costa RA, Scott IU (2011) Ranibizumab for retinal neovascularization. Ophthalmology 118(1004–1004):e1001
- Diabetic Retinopathy Clinical Research N, Googe J, Brucker AJ, Bressler NM, Qin H, Aiello LP, Antoszyk A, Beck RW, Bressler SB, Ferris FL III, Glassman AR, Marcus D, Stockdale CR (2011) Randomized trial evaluating short-term effects of intravitreal ranibizumab or triamcinolone acetonide on macular edema after focal/grid laser for diabetic macular edema in eyes also receiving panretinal photocoagulation. Retina 31:1009–1027
- 20. Filho JA, Messias A, Almeida FP, Ribeiro JA, Costa RA, Scott IU, Jorge R (2011) Panretinal photocoagulation (PRP) versus PRP plus intravitreal ranibizumab for high-risk proliferative diabetic retinopathy. Acta Ophthalmol 89:e567– e572
- Tzekov R, Arden GB (1999) The electroretinogram in diabetic retinopathy. Surv Ophthalmol 44:53–60
- Matsui Y, Katsumi O, Sakaue H, Hirose T (1994) Electroretinogram b/a wave ratio improvement in central retinal vein obstruction. Br J Ophthalmol 78:191–198
- 23. Capoferri C, Bagini M, Chizzoli A, Pece A, Brancato R (1990) Electroretinographic findings in panretinal photocoagulation for diabetic retinopathy. A randomized study with blue-green argon and red krypton lasers. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 228:232–236
- Perlman I, Gdal-On M, Miller B, Zonis S (1985) Retinal function of the diabetic retina after argon laser photocoagulation assessed electroretinographically. Br J Ophthalmol 69:240–246
- Frank RN (1975) Visual fields and electroretinography following extensive photocoagulation. Arch Ophthalmol 93:591–598
- 26. Shetty R, Pai SA, Vincent A, Shetty N, Narayana KM, Sinha B, Shetty BK (2008) Electrophysiological and structural assessment of the central retina following intravitreal injection of bevacizumab for treatment of macular edema. Doc Ophthalmol 116:129–135
- 27. ETDRSResearchGroup (1979) Four risk factors for severe visual loss in diabetic retinopathy. The third report from the Diabetic Retinopathy Study. The diabetic retinopathy study research group. Arch Ophthalmol 97:654–655
- 28. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jr., Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT Jr., Roccella EJ, National Heart L, Blood Institute Joint National Committee on Prevention DE, Treatment of High Blood P, National High Blood Pressure Education Program Coordinating C (2003) The seventh report of the joint

national committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure: the JNC 7 report. JAMA 289: 2560–2572

- Marmor MF, Fulton AB, Holder GE, Miyake Y, Brigell M, Bach M, International Society for Clinical Electrophysiology of V (2009) ISCEV Standard for full-field clinical electroretinography (2008 update). Doc Ophthalmol 118:69–77
- Naka KI, Rushton WA (1966) S-potentials from luminosity units in the retina of fish (Cyprinidae). J Physiol 185:587–599
- 31. ETDRSResearchGroup (1987) Techniques for scatter and local photocoagulation treatment of diabetic retinopathy: early treatment diabetic retinopathy study report no. 3. the early treatment diabetic retinopathy study research group. Int Ophthalmol Clin 27:254–264
- 32. ETDRSResearchGroup (1985) Photocoagulation for diabetic macular edema. Early treatment diabetic retinopathy study report number 1. early treatment diabetic retinopathy study research group. Arch Ophthalmol 103:1796–1806
- Scholl HP, Zrenner E (2000) Electrophysiology in the investigation of acquired retinal disorders. Surv Ophthalmol 45:29–47
- 34. Luu CD, Szental JA, Lee SY, Lavanya R, Wong TY (2010) Correlation between retinal oscillatory potentials and retinal vascular caliber in type 2 diabetes. Invest Ophthalmol Vis Sci 51:482–486
- 35. Lecleire-Collet A, Audo I, Aout M, Girmens JF, Sofroni R, Erginay A, Le Gargasson JF, Mohand-Said S, Meas T, Guillausseau PJ, Vicaut E, Paques M, Massin P (2011) Evaluation of retinal function and flicker light-induced retinal vascular response in normotensive patients with diabetes without retinopathy. Invest Ophthalmol Vis Sci 52:2861–2867
- Holopigian K, Greenstein VC, Seiple W, Hood DC, Carr RE (1997) Evidence for photoreceptor changes in patients with diabetic retinopathy. Invest Ophthalmol Vis Sci 38:2355–2365
- Breton ME, Quinn GE, Keene SS, Dahmen JC, Brucker AJ (1989) Electroretinogram parameters at presentation as predictors of rubeosis in central retinal vein occlusion patients. Ophthalmology 96:1343–1352
- Chung NH, Kim SH, Kwak MS (1993) The electroretinogram sensitivity in patients with diabetes. Korean J Ophthalmol 7:43–47
- Ogden TE, Callahan F, Riekhof FT (1976) The electroretinogram after peripheral retinal ablation in diabetic retinopathy. Am J Ophthalmol 81:397–402
- Slaughter MM, Miller RF (1981) 2-amino-4-phosphonobutyric acid: a new pharmacological tool for retina research. Science 211:182–185
- Nilsson SE (1971) Human retinal vascular obstructions. A quantitative correlation of angiographic and electroretinographic findings. Acta Ophthalmol (Copenh) 49:111–133

## 236