

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:
ENDOCRINOLOGIA

PAPEL DO FATOR DE CRESCIMENTO VASCULAR ENDOTELIAL NA
RETINOPATIA DIABÉTICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

FABIANA BORBA VALIATTI

Porto Alegre, julho de 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:
ENDOCRINOLOGIA

PAPEL DO FATOR DE CRESCIMENTO VASCULAR ENDOTELIAL NA
RETINOPATIA DIABÉTICA

FABIANA BORBA VALIATTI

Orientador: Prof. Dr. Luís Henrique Canani

Co-orientadora: Dra. Daisy Crispim

**Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Médicas:
Endocrinologia, da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul
(UFRGS) como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre
em Endocrinologia.**

Porto Alegre, julho de 2010

**Dedico essa dissertação ao meu Pai Enio Valiatti,
Meu amigo, meu guardião,
Meu “gêmolo”, meu professor,
Meu Ser Insubstituível,
Minha saudade e meu amor... Todos os dias! Sempre!**

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luís Henrique Canani, pela orientação, confiança e apoio para a realização deste trabalho. Obrigada por todas as oportunidades que me proporcionou desde a primeira conversa, pelos bons exemplos em tudo e pelas cobranças firmes e justas, mas em voz sempre doce.

À Dra. Daisy Crispim, pela paciência e tranquilidade em transmitir seus conhecimentos em genética e que me proporcionou novos rumos dentro do mestrado.

À incansável mestranda Bianca Marmontel de Souza por dividir comigo um material de pesquisa tão trabalhoso e preparado com tanto empenho.

À Denise A. Sortica que foi imprescindível com seus conhecimentos técnicos no laboratório.

As acadêmicas doutorandas da AD 2010 Bruna Borba Valiatti e Camila Benfica pela agilidade e disponibilidade na revisão dos prontuários dos pacientes deste estudo.

À Dra. Andrea Kiss, médica geneticista da Santa Casa e minha colega de trabalho, pelo esforço em me auxiliar na fase final desta dissertação.

À querida Clara Capp pelo incentivo, alegria e entusiasmo.

À Dra. Lúcia Maria Kliemann, feliz surpresa neste estudo, que me encheu de otimismo na reta final deste mestrado.

À Dra. Claudete Zanatta que atendeu a todas as minhas solicitações por email de forma quase instantânea.

Aos meus Mestres Dr. Humberto Lubisco, Dr. João Borges Fortes e Dra. Zélia Maria Correa que fizeram parte do meu encantamento pela retina e com os quais divido minhas dúvidas e conquistas diárias. Obrigada por acessarem suas caixas de e-mail regularmente e manterem seus celulares ligados.

Ao Dr. Ítalo M. Marcon e Dr. Alexandre S. Marcon, sob orientação dos quais fiz minha especialização em oftalmologia na Santa Casa de Porto Alegre, que abriram as portas do seu Serviço de Oftalmologia para esse estudo tornando-o possível.

Às minhas amigas Dra. Fabiana Buffé, Dra. Gabriela Unchalo Eckert e Dra. Paula Gabriela Batista dos Santos por serem minhas confidentes na paixão pela oftalmologia.

À Dra. Caroline Kramer, colega da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médica de Porto Alegre (hoje Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre), amiga querida, inquieta e grande incentivadora da minha permanência em meio acadêmico.

Aos meus pais Enio e Marivane, meus irmãos Gerson e Bruna e minha pequena Charlotte pelo amor, incentivo, positividade, confiança e por sempre estarem presentes. As lições e princípios mais importantes são aprendidos em família.

SUMÁRIO

Sumário	6
Lista de Abreviaturas	8
Introdução	10

ARTIGO 1: PAPEL DO FATOR DE CRESCIMENTO VASCULAR

ENDOTELIAL NA RETINOPATIA DIABÉTICA	11
Resumo	13
Abstract	14
Introdução	15
Retinopatia Diabética	15
Angiogênese	16
Fatores Envolvidos na Angiogênese	17
Receptores do VEGF	19
Regulação da Expressão Gênica do VEGF	20
VEGF e Doença Ocular no Diabetes Melito	20
Polimorfismos do VEGF na Retinopatia Diabética	22
Intervenção no VEGF como Tratamento da Retinopatia Diabética.....	23
Conclusão	24
Referências Bibliográficas	25
Tabela 1- Classificação Internacional de Severidade da Retinopatia Diabética	32
Tabela 2- Estudos de polimorfismos do VEGF	33

ARTIGO 2: THE CC GENOTYPE OF -634C/G VEGFA POLYMORPHISM

IS ASSOCIATED WITH INCREASED VEGFA GENE EXPRESSION IN 36

RETINAL TISSUE	38
Resumo	38
Introdução	39
Materiais e Métodos	40
• Amostra	40
• Genotipagem do Polimorfismo do VEGFA -634C/G (rs2010963)	41
• Quantificação do VEGFA por PCR <i>Real Time</i>	42
Análise Estatística	43
Resultados	43
Discussão	44
Referências	46
Tabela 1- Características Clínicas de Acordo com o Genótipo	50
Figura 1- Relação entre a expressão de VEGF na retina e o polimorfismo VEGF	
-634C/G	51

..
Considerações Finais 52

LISTA DE ABREVIATURAS

aFGF	fator ácido de crescimento de fibroblastos
AU	<i>arbitrary units</i>
bFGF	fator básico de crescimento de fibroblastos
DM	diabetes melito
DM1	diabetes melito tipo 1
DM2	diabetes melito tipo 2
DME	<i>diabetic macular edema</i>
DR	<i>diabetic retinopathy</i>
EGF	fator de crescimento epidérmico
EMD	edema macular diabético
Flt-1	<i>fms-like</i> da tirosina quinase
HIF-1	fator induzido pela hipóxia
IC	intervalo de confiança
IL-1	interleucina 1
IL-2	interleucina 2
IRMAs	anormalidades microvasculares intrarretinianas
OCT	<i>optical coherence tomograph</i>
OR	<i>odds ratio</i>
PD-ECGF	fator endotelial II derivado das plaquetas
PDGF	fator de crescimento derivado de plaqueta
PIGF	fator de crescimento placentário
RC	razão de chance
RD	retinopatia diabética
RDNP	retinopatia diabética não proliferativa
RDP	RD proliferativa
RNA _m	RNA mensageiro
SF/HGF	fator de cicatrização/fator de crescimento do hepatócito
TGF- α	fator de transformação do crescimento α
TGF- β	fator de transformação do crescimento β
TNF- α	fator de necrose tumoral α
UTR	<i>5' untranslated region</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VPF	<i>vascular permeability factor</i>

INTRODUÇÃO

Em 1989, Ferrara e Henzel descreveram um fator de crescimento para células endoteliais e o denominaram *vascular endothelial growth factor* (VEGF). As características do VEGF eram muito semelhantes a outro fator estudado, o *vascular permeability factor* (VPF), pois ambos exerciam as funções de aumento da permeabilidade vascular e estímulo mitose das células endoteliais. Na realidade, eles eram o mesmo fator e passaram a ser chamados de VEGF.

A partir da identificação desse fator, a atenção dos pesquisadores foi direcionada para o papel do VEGF na angiogênese em tecido normal e em condições patológicas, como crescimento tumoral, e doenças vasculares, como a retinopatia diabética (RD). Esse conhecimento permitiu o desenvolvimento de drogas chamadas anti-angiogênicas, que exercem seu efeito de antagonistas do VEGF e causam regressão dos neovasos.

Atualmente, a ciência está na fase da pesquisa gênica, onde genes candidatos e seus polimorfismos funcionais são investigados na busca de associação com determinadas doenças e conseqüente busca por uma futura terapia gênica.

Esta dissertação reúne um artigo de revisão sobre os aspectos genéticos do VEGF e a relação com RD e um trabalho original desenvolvido no Serviço de Endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, onde se avaliou a possível associação entre o polimorfismo do VEGF -634 C/G e a expressão gênica do VEGF na retina de doadores cadavéricos de córnea sem diabetes melito (DM).

Artigo de Revisão

**PAPEL DO FATOR DE CRESCIMENTO VASCULAR ENDOTELIAL NA
RETINOPATIA DIABÉTICA**

***THE ROLE OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR IN DIABETIC
RETINOPATHY***

Enviado para publicação no ABEM

**PAPEL DO FATOR DE CRESCIMENTO VASCULAR ENDOTELIAL NA
RETINOPATIA DIABÉTICA**
*THE ROLE OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR IN DIABETIC
RETINOPATHY*

Fabiana Borba Valiatti¹

Daisy Crispim^{2,3}

Camila Benfica⁴

Bruna Borba Valiatti⁴

Caroline K Kramer⁵

Luís Henrique Canani^{6,7}

1 Médica Oftalmologista. Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Endocrinologia.

2 Professora do Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

3 Bióloga contratada do Serviço de Endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

4 Acadêmicas de Medicina da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

5 Médica Endocrinologista, bolsista de Pós Doutorado do Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

6 Médico Endocrinologista do Serviço de Endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

7 Professor adjunto do Departamento de Medicina Interna da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Correspondência: Fabiana Borba Valiatti

Rua Mostardeiro 05/310 – POA – RS – Brasil

Email: drafabianavaliatti@hotmail.com

Telefone: 55 51 33148680

RESUMO

A retinopatia diabética (RD) é uma complicação microvascular do diabetes melito, sendo a principal causa de cegueira adquirida. Fatores angiogênicos como o *vascular endothelial growth factor* (VEGF) estão envolvidos na patogênese da RD. O VEGF-A é uma citocina potente e multifuncional que atua através dos receptores VEGFR-1 e VEGFR-2 expressados no endotélio vascular causando aumento da permeabilidade vascular e estímulo à neovascularização em processos fisiológicos e patológicos. A expressão do VEGFR-1 é acentuada por hipóxia e, apesar da afinidade, apresenta fraca resposta ao VEGF enquanto o VEGFR-2 é o principal mediador mitogênico, angiogênico e do aumento da permeabilidade vascular. Alguns polimorfismos do VEGF têm sido estudados na suscetibilidade e risco de progressão da RD. Importante associação entre o polimorfismo -634C/G e a presença de RD é relatada principalmente em relação ao alelo C. A homozigose CC estaria relacionada à RDP e níveis sérico e vítreo aumentados de VEGF sugerindo que a presença do alelo C seja um fator de risco independente para RD. Os conhecimentos sobre o VEGF levaram ao desenvolvimento de agentes anti-VEGF (pegaptanibe, ranibizumabe e bevacizumabe) com objetivo de inibir a neovascularização patológica. A terapia anti-VEGF é uma realidade cujos resultados são cada vez mais promissores na prática médica do tratamento da RD.

Unitermos: diabetes melito, retinopatia diabética, fator de crescimento de endotélio vascular, polimorfismo

ABSTRACT

Diabetic retinopathy (DR), a DM microvascular complication, is the leading cause of blindness. Angiogenic factors such as vascular endothelial growth factor (VEGF) are involved in the pathogenesis of DR. VEGF-A is a potent, multifunctional cytokine that acts through the receptors VEGFR-1 and VEGFR-2 expressed in the vascular endothelium and causing increased vascular permeability and neovascularization stimulation in both physiological and pathological processes. The expression of VEGFR-1 is upregulated by hypoxia and is less responsive to VEGF compared to VEGFR-2 which is the main mediator mitogenic, angiogenic, and increased vascular permeability. VEGF polymorphisms have been studied in DR susceptibility and progression. Significant association between the polymorphism -634C/G and the presence of DR is reported mainly in relation to allele C. The homozygous CC is associated to proliferative DR and to increased vitreous and serum levels of VEGF suggesting that the presence of the C allele is an independent risk factor for RD. The knowledge of VEGF lead to the development of anti-VEGF drugs (pegaptanib, ranibizumab and bevacizumab) aiming to prevent pathological neovascularization. The anti-VEGF therapy is a reality in practice medical treatment of DR.

Keywords: mellitus diabetes, diabetic retinopathy, vascular endothelial growth factor, polymorphism

INTRODUÇÃO

Estima-se que 7,6% da população brasileira seja portadora de diabetes melito (DM) [1, 2]. As complicações microvasculares são as maiores responsáveis pela morbidade no DM, sendo a retinopatia diabética (RD) a principal causa de cegueira adquirida em adultos [3].

No momento do diagnóstico, cerca de 21% dos pacientes com DM tipo 2 apresenta alguma evidência de RD [3]. Os principais fatores de risco para o desenvolvimento da RD são tempo de doença [3], hiperglicemia [4, 5] e pressão arterial elevada [5]. Entretanto, alguns indivíduos não desenvolvem RD mesmo após exposição prolongada à hiperglicemia e hipertensão arterial [6, 7], sugerindo que os mecanismos dessa doença ainda não estão completamente esclarecidos.

Dentre os fatores potencialmente envolvidos na patogênese da RD, destacam-se sinalizadores angiogênicos como o *vascular endothelial growth factor* (VEGF). Dessa forma, nosso objetivo é revisar o papel da angiogênese e do VEGF em relação à RD.

PAPEL DO FATOR DE CRESCIMENTO VASCULAR ENDOTELIAL NA RETINOPATIA DIABÉTICA

Retinopatia Diabética

A RD é uma desordem da vascularização retiniana caracterizada por anormalidades microvasculares (microaneurismas e microhemorragias), progredindo para alteração da permeabilidade vascular, má perfusão tecidual, edema e isquemia retiniana e anormalidades microvasculares intrarretinianas (IRMAs) [8]. A fase avançada, associada com aumento do risco de cegueira, é chamada RD proliferativa (RDP) e determinada pela presença de neovascularização da retina ou do disco óptico [8] (Tabela 1).

Os neovasos presentes na RDP são frágeis e podem sangrar para cavidade vítrea, o que altera a estrutura vítreo-retiniana acarretando fibrose e tração sobre a retina. As complicações, a partir desse momento, incluem descolamento tracional e rupturas na retina. A evolução desta doença pode resultar em perda importante e irreversível da visão [9, 10].

Em 1948, Michaelson [11] propôs a existência de um fator difusível desconhecido produzido pela retina isquêmica e responsável pela angiogênese que causaria neovascularização da retina e da íris, como ocorre na RDP e outras doenças vasculares da retina [11]. Assim, o entendimento da angiogênese e fatores envolvidos ganham importância no conhecimento da patogênese da RD.

Angiogênese

A angiogênese é um processo fundamental e complexo no qual ocorre formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes [12-17], sendo essencial em condições fisiológicas como ovulação, desenvolvimento do corpo lúteo, embriogênese, crescimento tecidual, desenvolvimento mamário na lactação, resposta imune, inflamação e cicatrização. No adulto saudável, o *turnover* vascular é extremamente baixo e angiogênese raramente ocorre [12, 13, 18].

A etiologia e patogênese de algumas doenças são determinadas pela resposta angiogênica persistente devido a um aumento dos mediadores angiogênicos ou deficiência dos inibidores da angiogênese como, por exemplo, neoplasias, metástases, psoríase e artrite reumatóide, entre outras [12, 13, 15]. Nessas situações, a angiogênese é altamente regulada com períodos de ativação e inibição [12, 15]. Doenças oculares como a RD, o glaucoma neovascular, as oclusões vasculares, a retinopatia da

prematuridade e a degeneração macular relacionada à idade também apresentam alteração da angiogênese [12, 13, 15, 17, 19].

Os vasos alvos dos fatores angiogênicos são os capilares venosos e as vênulas terminais, os quais apresentam pequeno calibre com células endoteliais sobre uma lâmina basal cobertas por uma camada descontínua de pericitos e células musculares lisas [20]. Um dos processos iniciais da resposta angiogênica é a quebra das ligações entre as células dessas camadas [15]. As células endoteliais ativadas geram enzimas proteolíticas que permitem a degradação da matriz extracelular e migração dessas células através da membrana basal, a partir do vaso da qual se originam, expressando moléculas de adesão na superfície celular [21].

Fatores Envolvidos na Angiogênese

Vários peptídeos com papel de fator de crescimento relacionados à angiogênese já foram purificados. Entre eles o fator ácido de crescimento de fibroblastos (aFGF), o fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF), a angiogenina, o fator endotelial II derivado das plaquetas (PD-ECGF), o fator de transformação do crescimento α e β (TGF- α e TGF- β), o fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), o fator de necrose tumoral α (TNF- α), o fator de crescimento epidérmico (EGF), a interleucina 1 (IL-1), a interleucina 2 (IL-2), o fator de cicatrização/fator de crescimento do hepatócito (SF/HGF) e o fator de permeabilidade vascular (VPF), atualmente chamado de fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF)[12, 15, 22-24].

Dentre esses fatores, o VEGF é um dos mais investigados, atualmente. O VEGF pertence a um grupo de glicoproteínas diméricas que inclui o fator de crescimento placentário (PlGF), VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E e VEGF-F [17, 25]. O VEGF-A é uma citocina potente e multifuncional que age no endotélio [16, 26],

sendo o melhor estudado e compreendido. Nesta revisão, sempre que for mencionado o VEGF, estaremos nos referindo ao VEGF-A [25].

O gene humano do VEGF-A está organizado em oito éxons, separados por sete íntrons e localizado no cromossomo 6p21.3 [27]. O *splicing* alternativo resulta em quatro isoformas principais, contendo 121, 165, 189 e 206 aminoácidos, respectivamente, VEGF121, VEGF165, VEGF189, VEGF206 [16, 22, 23, 28]. Embora com menor frequência, outras variantes também têm sido relatadas, incluindo VEGF145, VEGF183, VEGF162 e VEGF165b. Paradoxalmente, esta última variante teria um efeito inibitório na mitogênese induzida pelo VEGF [29].

O VEGF165, a principal isoforma VEGF-A [16, 17], é uma glicoproteína homodimérica de 45 kDa que se liga à heparina. Após ser secretada, uma fração significativa permanece vinculada à superfície celular e matriz extracelular [17].

O VEGF atua direta e seletivamente através dos receptores VEGFR-1 e VEGFR-2, expressados predominantemente, e talvez exclusivamente, no endotélio vascular [16]. A ligação do VEGF a esses receptores causa influxo de cálcio citoplasmático, aumentando sua concentração em até quatro vezes, mudança da forma, divisão e migração celular [16, 17, 30-32]. Esse aumento da permeabilidade das vênulas às macromoléculas permite que proteínas plasmáticas extravasem para o espaço extravascular, levando a coagulação do fibrinogênio e deposição de gel de fibrina que serve como matriz provisória para o crescimento de novos vasos sanguíneos [14, 16, 17, 22]. O aumento da permeabilidade microvascular parece, invariavelmente, preceder e/ou acompanhar a angiogênese numa variedade de processos fisiológicos e patológicos [16, 23]. Isso faz com que o VEGF seja considerado um importante mediador de angiogênese.

In vitro o VEGF é capaz para promover o crescimento de células endoteliais vasculares a partir de artérias, veias e vasos linfáticos e impede a apoptose endotelial induzida por privação de nutrientes. Além disso, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, o VEGF também é um fator de sobrevivência para o endotélio [26]. Em modelo experimental, a inibição do VEGF resulta em grandes alterações de apoptose na vasculatura neonatal, mas não em adultos [33]. Parece haver maior dependência do VEGF nas células endoteliais recém-formadas, mas não nos vasos já estabelecidos dentro dos tumores [33]. A cobertura dos vasos por pericitos foi proposta como um dos principais eventos para a perda da suscetibilidade ao VEGF [20].

Receptores do VEGF

Três receptores do VEGF são descritos: VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3. As proteínas transmembrana VEGFR-1 (Flt-1) e VEGFR-2 (Flk-1/KDR) são receptores VEGF de alta afinidade com domínio de tirosina quinase [16, 17, 30]. O VEGFR-3 (Flt-4) é membro da mesma família de receptores tirosina quinase, mas tem afinidade pelo VEGF-C e pelo VEGF-D, não sendo um receptor de VEGF-A [17].

A expressão do VEGFR-1 (Flt-1: fms-like da tirosina quinase) é acentuada por hipóxia através de mecanismo dependente do fator induzido pela hipóxia (HIF-1). O VEGFR-1 tem afinidade pelo VEGF-A, mas também PlGF e VEGF-B, no entanto, o VEGFR-1 apresenta fraca resposta ao VEGF [17]. Park *et al* [34], inicialmente propuseram que o VEGFR-1 não seria essencialmente um receptor de transmissão de um sinal mitogênico, mas um receptor modulador capaz de regular de forma negativa a atividade do VEGF no endotélio vascular, seqüestrando-o e tornando esse fator menos disponível para o VEGFR-2. Assim, a potencialização da ação do VEGF por PlGF poderia ser explicada, pelo menos em parte, pelo deslocamento do VEGF do VEGFR-1

ligado [34]. Ativação do VEGFR-1 por PlGF resultaria em transfosforilação de VEGFR-2, assim amplificaria angiogênese causada pelo VEGF através VEGFR-2 [17].

Podemos considerar que o VEGFR-1 tenha dupla função na angiogênese, uma positiva e outra negativa, em circunstâncias diferentes [35].

O VEGF se liga ao VEGFR-2 (KDR, humanos; Flk-1, camundongo), embora com menor afinidade do que ao VEGFR-1, tendo papel no desenvolvimento da angiogênese e hematopoiese [35]. Existe consenso de que o VEGFR-2 é o principal mediador mitogênico, angiogênico e do aumento da permeabilidade vascular devido ao VEGF [17, 22, 32, 35].

Regulação da Expressão Gênica do VEGF

A expressão do RNA mensageiro (RNAm) VEGF é induzida pela exposição a baixa tensão de oxigênio em uma variedade de circunstâncias patológicas [16, 17]. O VEGF tem sua expressão aumentada quando medido através do RNAm ou da proteína em vários tumores malignos em animais e humanos [16]. A hipóxia tecidual tem sido associada com a angiogênese e há evidências de que a concentração de oxigênio local regula a expressão do VEGF [16], podendo ela ser o principal indutor da transcrição do gene do VEGF [17].

VEGF e Doença Ocular no Diabetes Melito

Todos os conceitos expostos anteriormente se aplicam amplamente à RD e têm sido motivo de inúmeros estudos que objetivam encontrar marcadores que possam prever a evolução desta doença e assim ser alvo de tratamento.

Em 1948, Michaelson [11] postulou a existência de um fator angiogênico difusível, liberado pela retina isquêmica. Por ser induzido por hipóxia, VEGF tornou-se um candidato atraente como mediador de neovascularização intra-ocular patológica.

O VEGF tem sido investigado como um fator de crescimento com níveis aumentados no humor aquoso e vítreo de pacientes com RD, principalmente naqueles com RDP [36-38]. Pacientes com DM e RDP apresentam níveis de VEGF no humor aquoso e vítreo maiores que no plasma, o que possivelmente está relacionado à atividade da RD. O mesmo se observa quanto ao edema macular em pacientes diabéticos [36-38].

Vários estudos acerca da presença de edema macular e sua relação com os níveis de VEGF também têm sido realizados. Patel *et al* [39] observaram correlação positiva entre o maior nível de VEGF e a ocorrência de edema macular quando a mácula foi analisada com tomografia de coerência óptica (*Optical Coherence Tomography* - OCT). Funatsu *et al* [40], em estudo prospectivo de pacientes com RD não proliferativa submetidos à facoemulsificação do cristalino, verificaram que níveis elevados de VEGF no humor aquoso medidos mediante coleta de amostra no início do procedimento estavam associados com piora do edema macular no pós-operatório. Assim, o nível do VEGF poderia ser tomado como fator de risco para exacerbação do edema macular em pacientes com DM submetidos à cirurgia de catarata.

As concentrações intraoculares de VEGF diminuem em pacientes com RDP submetidos à fotocoagulação com laser da retina, provavelmente pela diminuição do estímulo isquêmico e, conseqüentemente, diminuição do estímulo à angiogênese [41].

Polimorfismos do VEGF na Retinopatia Diabética

Alguns polimorfismos do VEGF têm sido estudados para avaliar sua relação com a suscetibilidade e risco de progressão da RD (Tabela 2). Errera *et al* [42] não observaram associação entre do polimorfismo -634G/C (rs2010963) do VEGF e a presença de RD ou de DM tipo 2. Entretanto, a homozigose CC no polimorfismo -634G/C foi mais freqüente nos pacientes com RDP quando comparado ao grupo controle (pacientes diabéticos tipo 2 sem RDP), sugerindo que a presença de homozigose do alelo -634C do VEGF seja um fator de risco independente para RDP em pacientes com DM tipo 2 [42].

Diante das evidências de que o VEGF tenha importante papel na patogênese da RD, um estudo avaliou quatro polimorfismos do VEGF já previamente descritos -7C/T (rs25648) e -634C/G na 5' *untranslated region* (UTR) e -1498T/C e -1190G/A na região promotora do VEGF e sua possível relação com RD em população indiana com DM tipo 2. A freqüência dos polimorfismos -7C/T, -1498T/C e -634C/G tiveram diferenças significativas entre os pacientes com RDP e sem sinais de RD ou RD leve. Isto sugere que estes polimorfismos podem estar associados ao maior risco de RD [8].

Awata *et al* [43] identificaram seis polimorfismos do VEGF em japoneses com DM tipo 2 sendo que os -1877G/A, -1498T/C, -1190G/A e -1154G/A (rs1570360) estão localizados na região promotora e -634C/G e -7C/T na 5' UTR. O polimorfismo -1877G/A demonstrou-se raro e sua avaliação não foi continuada. A distribuição do polimorfismo -634C/G foi relacionada à RD, sugerindo a presença do alelo C que seja um fator de risco independente pra RD. O genótipo CC teve razão de chance de 3,2 quando comparado ao genótipo GG. Inicialmente, Awata *et al* [43] acreditaram que alguns polimorfismos do VEGF poderiam estar associados aos estágios mais avançados de RD como a forma proliferativa, já que o VEGF é um forte fator angiogênico. No

entanto, o polimorfismo 634 C/G não esteve especificamente associado com RDP, pelo contrário, a associação foi mais evidente na RD não proliferativa.

Petrovic *et al* [44] não observaram associação entre RDP e o polimorfismo -634C/G do VEGF em pacientes com DM tipo 2. No entanto, a média dos níveis séricos e vítreos de VEGF foi significativamente maior nos pacientes com RDP quando comparados ao grupo controle (diabéticos sem RD). Esses níveis foram significativamente maiores em diabéticos com o genótipo CC, quando comparados aos outros genótipos (CG e GG).

Estudos populacionais mostram que não há diferença importante entre as etnias na distribuição dos alelos C e G do polimorfismo -634C/G, sendo o alelo G mais freqüente em todas as populações estudadas [45] Ao avaliar três polimorfismos na região promotora do gene VEGF, -2578C/A (rs699947), -1154 G/A e -634C/G, pesquisadores de Campinas/SP observaram que embora as variantes -2578A e -1154A sejam mais comuns em brancos que em negros, não houve diferenças significativas interétnicas em relação ao polimorfismo -634C/G [46].

Intervenção no VEGF como Tratamento da Retinopatia Diabética

Os primeiros estudos sobre VEGF e RD são da década de 80 e ainda é de grande interesse médico devido à mudança do caráter meramente investigativo para propósitos terapêuticos focados nesse fator.

O conhecimento dos conceitos acima abriu um importante campo de investigação tendo como alvo o VEGF na busca de uma terapia que anulasse seus efeitos patológicos. Recentemente, agentes anti-VEGF foram desenvolvidos com objetivo de inibir a neovascularização patológica. Esse interesse, obviamente, envolveu a DM e suas complicações como a RD.

O pegaptanibe (Macugen®), o ranibizumabe (Lucentis®) e o bevacizumabe (Avastin®) são as medicações anti-VEGF disponíveis atualmente. O ranibizumabe e o bevacizumabe bloqueiam todas as isoformas circulantes de VEGF inibindo a neovascularização em condições fisiológicas e patológicas. O pegaptanibe age seletivamente no VEGF165. No tratamento da RD, essas medicações são aplicadas dentro da cavidade vítrea. Devido a curta duração do seu efeito, os anti-VEGFs necessitariam de injeções intra-vítreas repetidas o que aumentaria o risco de endoftalmite e a ocorrência de efeitos adversos dessas drogas como hipertensão, proteinúria, aumento dos eventos cardiovasculares e prejuízo da cicatrização [47-49].

A terapia com anti-VEGF, apesar de ainda necessitar de estudos clínicos, transformou a abordagem das doenças vítreoretinianas, e o benefício de seu uso é uma realidade na prática médica do tratamento da RD [48, 49].

CONCLUSÃO

Os conhecimentos alcançados até hoje apontam o VEGF como o “fator X” vislumbrado por Michaelson em 1948. É fundamental pensarmos na angiogênese ocular, tendo como maior exemplo a RD, como um processo multifatorial. O desenvolvimento de estudos genéticos e as drogas anti-VEGF são uma realidade cada vez mais palpável, mas não respondem tudo e levantam novos desafios.

Agradecimentos: Ao Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE HCPA) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/idb2008/d10.htm>.
2. Malerbi, D.A. and L.J. Franco, *Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 yr. The Brazilian Cooperative Group on the Study of Diabetes Prevalence.* Diabetes Care, 1992. **15**(11): p. 1509-16.
3. Fong, D.S., et al., *Diabetic retinopathy.* Diabetes Care, 2003. **26 Suppl 1**: p. S99-S102.
4. *Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33).* UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Lancet, 1998. **352**(9131): p. 837-53.
5. Stratton, I.M., et al., *UKPDS 50: risk factors for incidence and progression of retinopathy in Type II diabetes over 6 years from diagnosis.* Diabetologia, 2001. **44**(2): p. 156-63.
6. Esteves J, L.A., Roggia MF, Dalpizol M, Scocco C, Kramer CK, Azevedo MJ, Canani LH, *Fatores de Risco para Retinopatia Diabética.* Arq Bras Endocrinol Metab, 2008. **52**(3): p. 431-441.
7. 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, 1984. **102**(4): p. 527-32.
8. Suganthalakshmi, B., et al., *Association of VEGF and eNOS gene polymorphisms in type 2 diabetic retinopathy.* Mol Vis, 2006. **12**: p. 336-41.
9. Ciulla, T.A., A.G. Amador, and B. Zinman, *Diabetic retinopathy and diabetic macular edema: pathophysiology, screening, and novel therapies.* Diabetes Care, 2003. **26**(9): p. 2653-64.

10. Aiello, L.P., et al., *Diabetic retinopathy*. Diabetes Care, 1998. **21**(1): p. 143-56.
11. Michaelson, I., *The mode of development of the vascular system of the retina with some observations on its significance for certain retinal disorders*. Trans Ophthalmol Soc UK, 1948. **68**: p. 137-180.
12. Folkman, J. and Y. Shing, *Angiogenesis*. J Biol Chem, 1992. **267**(16): p. 10931-4.
13. Zetter, B.R., *Angiogenesis. State of the art*. Chest, 1988. **93**(3 Suppl): p. 159S-166S.
14. Folkman, J., *How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? G.H.A. Clowes memorial Award lecture*. Cancer Res, 1986. **46**(2): p. 467-73.
15. Polverini, P.J., *The pathophysiology of angiogenesis*. Crit Rev Oral Biol Med, 1995. **6**(3): p. 230-47.
16. Dvorak, H.F., et al., *Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis*. Am J Pathol, 1995. **146**(5): p. 1029-39.
17. Ferrara, N., *Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress*. Endocr Rev, 2004. **25**(4): p. 581-611.
18. Benjamin, L.E., et al., *Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal*. J Clin Invest, 1999. **103**(2): p. 159-65.
19. Miller, J.W., *Vascular endothelial growth factor and ocular neovascularization*. Am J Pathol, 1997. **151**(1): p. 13-23.

20. Hellstrom, M., et al., *Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis*. J Cell Biol, 2001. **153**(3): p. 543-53.
21. Park, J.E., G.A. Keller, and N. Ferrara, *The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF*. Mol Biol Cell, 1993. **4**(12): p. 1317-26.
22. Paques, M., P. Massin, and A. Gaudric, *Growth factors and diabetic retinopathy*. Diabetes Metab, 1997. **23**(2): p. 125-30.
23. Nagy, J.A., et al., *Vascular permeability, vascular hyperpermeability and angiogenesis*. Angiogenesis, 2008. **11**(2): p. 109-19.
24. Grant, D.S., et al., *Scatter factor induces blood vessel formation in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(5): p. 1937-41.
25. Capp C, Z.N., Wajner S, Maia AL, *Papel do fator de crescimento endotelial vascular nos carcinomas de tireóide*. Revista HCPA, 2009. **29**(1): p. 51-59.
26. Ferrara, N. and T. Davis-Smyth, *The biology of vascular endothelial growth factor*. Endocr Rev, 1997. **18**(1): p. 4-25.
27. Vincenti, V., et al., *Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3*. Circulation, 1996. **93**(8): p. 1493-5.
28. Tischer, E., et al., *The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing*. J Biol Chem, 1991. **266**(18): p. 11947-54.
29. Woolard, J., et al., *VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression*. Cancer Res, 2004. **64**(21): p. 7822-35.

30. Quinn, T.P., et al., *Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(16): p. 7533-7.
31. Pocock, T.M., et al., *VEGF and ATP act by different mechanisms to increase microvascular permeability and endothelial [Ca(2+)](i)*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000. **279**(4): p. H1625-34.
32. Dawson, N.S., et al., *Signaling pathways mediating VEGF165-induced calcium transients and membrane depolarization in human endothelial cells*. Faseb J, 2006. **20**(7): p. 991-3.
33. Gerber, H.P., et al., *VEGF is required for growth and survival in neonatal mice*. Development, 1999. **126**(6): p. 1149-59.
34. Park, J.E., et al., *Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR*. J Biol Chem, 1994. **269**(41): p. 25646-54.
35. Waltenberger, J., et al., *Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor*. J Biol Chem, 1994. **269**(43): p. 26988-95.
36. Funatsu, H., et al., *Increased levels of vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in the aqueous humor of diabetics with macular edema*. Am J Ophthalmol, 2002. **133**(1): p. 70-7.
37. Funatsu, H., et al., *Relationship between vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in diabetic retinopathy*. Retina, 2001. **21**(5): p. 469-77.
38. Noma, H., et al., *Regulation of angiogenesis in diabetic retinopathy: possible balance between vascular endothelial growth factor and endostatin*. Arch Ophthalmol, 2002. **120**(8): p. 1075-80.

39. Patel, J.I., et al., *Vitreous and aqueous concentrations of proangiogenic, antiangiogenic factors and other cytokines in diabetic retinopathy patients with macular edema: Implications for structural differences in macular profiles*. *Exp Eye Res*, 2006. **82**(5): p. 798-806.
40. Funatsu, H., et al., *Prediction of macular edema exacerbation after phacoemulsification in patients with nonproliferative diabetic retinopathy*. *J Cataract Refract Surg*, 2002. **28**(8): p. 1355.
41. Chiarelli, F., F. Santilli, and A. Mohn, *Role of growth factors in the development of diabetic complications*. *Horm Res*, 2000. **53**(2): p. 53-67.
42. Errera, F.I., et al., *Functional vascular endothelial growth factor -634G>C SNP is associated with proliferative diabetic retinopathy: a case-control study in a Brazilian population of European ancestry*. *Diabetes Care*, 2007. **30**(2): p. 275-9.
43. Awata, T., et al., *A common polymorphism in the 5'-untranslated region of the VEGF gene is associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetes*. *Diabetes*, 2002. **51**(5): p. 1635-9.
44. Petrovic, M.G., et al., *Local and genetic determinants of vascular endothelial growth factor expression in advanced proliferative diabetic retinopathy*. *Mol Vis*, 2008. **14**: p. 1382-7.
45. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=2010963.
46. Muniz, J.J., et al., *Interethnic differences in the distribution of clinically relevant vascular endothelial growth factor genetic polymorphisms*. *DNA Cell Biol*, 2009. **28**(11): p. 567-72.
47. Bhisitkul, R.B., *Vascular endothelial growth factor biology: clinical implications for ocular treatments*. *Br J Ophthalmol*, 2006. **90**(12): p. 1542-7.

48. Simo, R. and C. Hernandez, *Intravitreal anti-VEGF for diabetic retinopathy: hopes and fears for a new therapeutic strategy*. Diabetologia, 2008. **51**(9): p. 1574-80.
49. Mohamed, Q., M.C. Gillies, and T.Y. Wong, *Management of diabetic retinopathy: a systematic review*. Jama, 2007. **298**(8): p. 902-16.
50. Wilkinson, C.P., et al., *Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic macular edema disease severity scales*. Ophthalmology, 2003. **110**(9): p. 1677-82.
51. Kim, H.W., et al., *Role of the VEGF 936 C/T polymorphism in diabetic microvascular complications in type 2 diabetic patients*. Nephrology (Carlton), 2009. **14**(7): p. 681-8.
52. Kangas-Kontio T, V.S., Kakko SJ, Penna J, Savolainen ER, Savolainen MJ, Liinamaa MJ, *Polymorphism of the manganese superoxide dismutase gene but not of vascular endothelial growth factor gene is a risk factor for diabetic retinopathy*. Br J Ophthalmol, 2009. **93**(10): p. 1401-6.
53. Nakanishi, K. and C. Watanabe, *Single nucleotide polymorphisms of vascular endothelial growth factor gene intron 2 are markers for early progression of diabetic retinopathy in Japanese with type 1 diabetes*. Clin Chim Acta, 2009. **402**(1-2): p. 171-5.
54. Nakamura, S., et al., *Impact of variants in the VEGF gene on progression of proliferative diabetic retinopathy*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2009. **247**(1): p. 21-6.
55. Churchill, A.J., et al., *VEGF polymorphisms are associated with severity of diabetic retinopathy*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008. **49**(8): p. 3611-6.

56. Uthra, S., et al., *Association of VEGF gene polymorphisms with diabetic retinopathy in a south Indian cohort*. *Ophthalmic Genet*, 2008. **29**(1): p. 11-5.
57. Szaflik, J.P., et al., *An association between vascular endothelial growth factor gene promoter polymorphisms and diabetic retinopathy*. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2008. **246**(1): p. 39-43.
58. Awata, T., et al., *Functional VEGF C-634G polymorphism is associated with development of diabetic macular edema and correlated with macular retinal thickness in type 2 diabetes*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **333**(3): p. 679-85.
59. Ray, D., et al., *Association of the VEGF gene with proliferative diabetic retinopathy but not proteinuria in diabetes*. *Diabetes*, 2004. **53**(3): p. 861-4.

Tabela 1 - Classificação Internacional de Severidade da Retinopatia Diabética

Severidade da Doença	Achados oftalmoscópicos sob midríase
Ausência de retinopatia aparente	Ausência anormalidades
RD leve não proliferativa	Apenas microaneurismas
RD moderada não proliferativa	Mais que apenas microaneurismas, mas menos que RD severa não proliferativa
RD severa não proliferativa	Sem sinais de RD proliferativa, com qualquer dos achados abaixo: <ul style="list-style-type: none">● Mais de 20 hemorragias intra-retinianas em cada um dos 4 quadrantes● Veias em rosário em pelo menos 2 quadrantes● Anormalidades microvasculares intra-retinianas em pelos menos 1 quadrante
RD proliferativa	Qualquer dos achados abaixo: <ul style="list-style-type: none">● Neovascularização● Hemorragia vítrea ou pré-retiniana

RD = retinopatia diabética.

Adaptado de Wilkinson, C.P., et al., *Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic macular edema disease severity scales*. [50]

Tabela 2. Estudos de polimorfismos do VEGF

População	Amostra	Polimorfismo	Observação	Ref
Coreana	398 com DM2, 526 sem DM	+ 936 C/T (rs3025039)	alelo T mais freqüente em DM2 com RD ($P=0,042$) alelo T associado com níveis mais altos VEGF plasmático ($P<0,05$)	[51]
Finlandesa	131 DM 1 e 2 com RD, 98 DM 1 e 2 sem RD, 526 sem DM	- 2578C/A (rs699947)	não houve associação com RD	[52]
		- 634C/G (rs2010963)	não houve associação com RD	[52]
		rs2146232	não houve associação com RD	[52]
		rs3025033	não houve associação com RD	[52]
		+ 936 C/T (rs3025039)	não houve associação com RD	[52]
Japonesa	175 DM1	rs833070	genótipo TT associado a progressão precoce para RDNP severa RC: 1,67 (IC 95%: 1,01-2,54) ($P= 0,047$)	[53]
		rs2146323	genótipo AA associado à progressão precoce para RDNP severa RC: 1,68 (IC 95%: 1,02-2,57) ($P= 0,043$)	[53]
Japonesa	469 DM2	- 634C/G (rs2010963)	não houve associação com RD	[54]
		- 2578C/A (rs699947)	Maior freqüência do alelo A no grupo RDP quando comparado ao controle ($P=0,036$) Genótipo AA RC:7,7 (IC 95%: 1,8-30,9)	[54]
Britânica	DM 1 e 2: 45 com RDP, 61 sem RD	- 160C/T	associação significativa e independente com RDP CC teve RC 10,5 (2,3-47,7) para RDP	[55]

			$P = 0,0003$	
		- 152 A/G (rs13207351)	associação significativa e independente com RDP AA teve RC 3,5 (1,5-7,7) para RDP $P = 0,0022$	[55]
		- 116 A	associação significativa e independente com RDP AA teve RC 7,9 (3,1-19,9) para RDP $P = 3,23 \times 10^{-6}$	[55]
Eslovênic a	206 DM 2 com RDP e 143 DM2 > 10 anos sem RD	- 634C/G (rs2010963)	RDP não esteve associada com o polimorfismo Níveis sérico e vítreo de VEGF foram maiores no genótipo CC $P < 0,001$	[44]
Indiana	DM2 com e sem RD	- 634C/G (rs2010963)	não houve associação com presença ou severidade de RD, no entanto este polimorfismo foi associado com aumento do risco de RD em pacientes com microalbuminúria (RC: 8,9, IC 95%: 1,4-58,3)	[56]
		+ 936 C/T (rs3025039)	não houve associação com RD	[56]
Polonesa	DM2: 82 RDP, 72 RDNP, 61 sem RD (controle)	- 460C/T (rs833061)	não houve associação com RD	[57]
		- 634C/G (rs2010963)	alelo C foi mais frequente em RDNP quando comparado ao controle (RC=1,69, IC 95% 1,03-2,79)	[57]
Brasileira	DM2: 167 RDP, 334 sem RDP	- 634C/G (rs2010963)	alelo C em homozigose foi mais frequente em RDP quando comparada ao controle (RC:1,9, IC 95%: 1,01-3,79) ($P=0,04$)	[42]
Indiana	DM2: 120 com	- 7C/T	genótipo CT associado à RD	[8]

	RDP e 90 > 15 anos sem RD ou RD leve	(rs25648)	(RC: 4,17, IC 95%: 1,90-9,18) (<i>P</i> =0,0001)	
- 634C/G (rs2010963)		genótipo CG associado à RD (RC: 4,37, IC 95%: 2,44-7,84) (<i>P</i> =0,0001)	[8]	
- 1498 T/C		genótipo TC associado à RD (RC: 2,33, IC 95%: 1,24-4,36) (<i>P</i> =0,0008)	[8]	
Japonesa	DM2: 203 sem RD, 93 RDNP, 82 RDP	- 2578C/A (rs699947)	não houve associação com RD	[58]
		- 1154G/A (rs1570360)	não houve associação com RD	[58]
		- 634C/G (rs2010963)	alelo C considerado fator de risco para EMD, independente da presença de RD (<i>P</i> =0,047), e para RD (<i>P</i> =0,02)	[58]

Britânica	DM1 e 2: 69 RDP, 198 outros graus de RD	- 460C/T (rs833061)	alelo C esteve associado a RDP (RC: 2,5, IC 95%:1,20-5,23)	[59]
Japonesa	DM2: 150 com RD, 118 sem RD	- 634C/G (rs2010963)	alelo C foi mais freqüente em RD quando comparado aos sem RD ($P=0,0037$). A RC entre o genótipo CC e o GG foi 3,2 (IC 95%: 1,45-7,05) ($P=0,0046$) alelo C foi mais freqüente em RDNP ($P=0,0026$) do que em RDP ($P=0,081$)	[43]

DM = diabetes melito; DM1 = diabetes melito tipo 1; DM2 = diabetes melito tipo 2; RDP = retinopatia diabética proliferativa; VEGF = *vascular endothelial growth factor*; RD = retinopatia diabética; RDNP = retinopatia diabética não proliferativa; EMD = edema macular diabético; RC= razão de chance; IC = intervalo de confiança.

Artigo Original

The CC genotype of -634C/G VEGFA polymorphism is associated with increased VEGFA gene expression in retinal tissue.

The CC genotype of -634C/G VEGFA polymorphism is associated with increased VEGFA gene expression in retinal tissue.

Fabiana Borba Valiatti¹, Daisy Crispim¹, Bianca Marmontel de Souza¹, Caroline Kaercher Kramer¹, Lúcia Maria Kliemann², Luís Henrique Canani¹

1. Endocrinology Division. Hospital de Clinicas de Porto Alegre/Brazil and Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

2. Pathology Division. Hospital de Clinicas de Porto Alegre/Brazil and Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Correspondence: Fabiana Borba Valiatti

Rua Mostardeiro 05/310 – POA – RS – Brasil
Email: drafabianavaliatti@hotmail.com Phone: 55 51 33148680

ABSTRACT

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a cytokine that acts on the endothelium. It plays a major role in the development of diabetic retinopathy (DR). The -634C/G VEGFA polymorphism is associated with the presence and severity of DR. The purpose of this study was to evaluate the VEGFA gene expression in the retina of human cornea donors without diabetes mellitus (DM), according to the genotypes of -634C/G polymorphism. The eyes and a sample of peripheral blood from 190 cadaver donors from were collected for analysis. Sixty-one donors were excluded due to the presence of DM and/or eye/retinal disease. The total DNA was extracted from the leukocytes of peripheral blood of the remaining 129 donors and was used to genotype the polymorphism. In 36 homozygotes (CC=18 or GG=18) gene expression for VEGFA was measured from the mRNA obtained from retinal tissue and quantified by real time PCR technique. The gene expression was presented in arbitrary units (AU) and the means of the two groups were compared using the Student t test after logarithmic transformation. The individuals with genotype CC presented higher VEGFA expression than those with genotype GG (5.15 +/- 4.47 vs. 2.62 +/- 2.56 AU, $P = 0.023$). Concluding, non-diabetic individuals with the CC genotype of -634C/G polymorphism presented increased VEGFA retinal gene expression compared with GG individuals.

Keywords: mellitus diabetes, diabetic retinopathy, vascular endothelial growth factor, polymorphism, retina

INTRODUCTION

Angiogenesis is a complex, fundamental process in which new blood vessels are formed from pre-existing vessels (1-6), and it is essential in physiological conditions such as ovulation, corpus luteum development, embryogenesis, tissue growth, breast development during lactation, immune response, inflammation, and healing. However, vascular turnover is extremely low and angiogenesis rarely occurs in healthy adult individuals (1,2,7). The etiology and pathogenesis of some diseases are determined by the persistent angiogenic response, such as in diabetic retinopathy (DR) (8, 9).

The *vascular endothelial growth factor* (VEGF) belongs to a group of dimeric glycoproteins which include the placental growth factor (PlGF), VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E and VEGF-F (6, 10). VEGF-A is a potent, multifunctional cytokine that acts on the endothelium (5,11).

The gene that encodes VEGFA in humans is organized into eight exons separated by seven introns located in chromosome 6p21.3 (12). The alternative splicing results in four main isoforms containing 121, 165, 189 and 206 aminoacids, respectively, VEGFA 121, VEGFA 165, VEGFA 189, VEGFA 206 (5, 13-15). VEGF165, the main VEGFA isoform (5, 6), is a 45 kDa homodimeric glycoprotein which acts directly and selectively through receptors VEGFR-1 and VEGFR-2 expressed in the vascular endothelium (5). It causes increased vascular permeability, promotes angiogenesis and stimulates endothelial cell proliferation and migration in a variety of physiological and pathological processes (5, 14).

VEGFA can promote the growth of vascular endothelial cells from arteries, veins and lymphatic vessels, and prevents endothelial apoptosis induced by nutrient deprivation, and it is considered an endothelial survival factor (11, 16). Although it is a

major mediator of ischemia-mediated ocular neovascularization, VEGFA is expressed in normal retinas and has an endogenous role in retinal preservation in adults (17, 18).

In a previous study, the -634C/G VEGFA polymorphism (rs2010963) in homozygosis (CC) was associated with proliferative DR (PDR) in type 2 DM patients (19). Allele C was observed more often in patients with DR (20-23) and with diabetic macular edema (DME) (21) in some studies, but not in others (24, 25). Further, serum and vitreous levels of VEGFA were elevated in CC genotype, independently of the presence of DR (26).

Our working hypothesis is that this polymorphism is associated with PDR due to the increased expression of the gene that encodes VEGFA. Therefore the purpose of this study was to evaluate the effect of -634 C/G polymorphism in gene expression of the angiogenic factor VEGFA in human cornea donors without DM and without ischemic retinal disease or neovascularization.

MATERIALS and METHODS

Samples

One hundred ninety cadaveric donors were identified through the Central de Transplantes do Rio Grande do Sul (a Brazilian organization that regulates cadaveric organs donation) between May 2009 and May 2010. Data were collected by reviewing the patient charts that included included age, sex, presence of systemic arterial hypertension, smoking, and diabetes mellitus. A 10 ml sample of peripheral blood was collected from each patient to extract DNA in order to genotype the VEGFA -634 C/G polymorphism. Sixty one of these individuals were excluded due to the presence of DM and/or ocular/retinal disease. The -634 C/G polymorphism was genotyped in the 129 remaining individuals. Thirty six cases were selected because they were homozygous

(CC or GG). VEGFA gene expression-in retinal tissue was measured as described bellow.

After the corneas were removed for donation, the retina was separated from the remaining intraocular structures, kept in liquid nitrogen for 30 minutes and then conserved at -80°C until the gene expression analyses were performed. The relatives of the donors signed a Letter of Informed Consent authorizing the use of the material that would otherwise have been discarded. The project was approved by the Committee of Ethics in Research at Hospital de Clinicas de Porto Alegre.

Genotyping of *VEGFA* -634C/G Polymorphism (rs2010963)

Total DNA was extracted from peripheral blood leukocytes using a standard extraction method with salt described by Lahiri & Nurnberger (1991). The genotyping of -634 C/G polymorphism located in the promoter region of the *VEGFA* gene was performed using primers and probes contained in the *Human Custom TaqMan Genotyping Assay 40x* (Applied Biosystems - ABI, Foster City, CA; USA). The following sequences of primers and probes were used: *VEGFA*-5'- GAG AGA AGT CGA GGA AGA GAG AGA-3' (direct primer), *VEGFA*-5'- CCC AAA AGC AGG TCA CTC ACT T-3' (reverse primer), *VEGFA*-FAM-5'- CCT GTC CCT TTC GC-3', *VEGFA*-VIC-5'- CCT GTC GCT TTC GC-3'. The real time PCR reaction (RT-PCR) was performed on 96-well plates, with a total volume of 5 µl containing 2ng of genomic DNA, *TaqMan Genotyping Master Mix* buffer 1x (ABI, Foster City, CA; USA) and the primers and probes contained in the *Custom TaqMan Genotyping Assay* 1x. The plates were placed in a thermocycler for RT-PCR (7500 Fast Real Time PCR System; ABI, Foster City, CA; USA) and warmed for 10 minutes at 95°C, followed by 45 cycles at 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute. The fluorescence data of each plate were

analyzed by the *System Sequence Detection* v.2.1 program (ABI, Foster City, CA; USA). All amplification reactions were performed in duplicate, with an error rate based on the results of the duplicates of 0.01%.

Quantification of *VEGFA* by real time PCR

The total mRNA of retinal cells was extracted using reagent TRIzol® (Invitrogen Inc., Los Angeles, CA, USA), according to the manufacturers' instructions. The amount of total mRNA obtained was quantified using the NANODROP 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific Inc., Wilmington, DE, USA). The *SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR* kit (Invitrogen Inc., Los Angeles, CA, USA) was used for cDNA synthesis beginning with 1 µg of total RNA using Oligo (dT). The quantification of cDNA of *VEGFA* of the retina of 18 individuals with genotype CC and 18 individuals with genotype GG was performed using the RT-PCR technique and the relative standard curve method. The human β -actin gene was used as an internal control. The RT-PCR reaction was done in a final volume of 20 µl, containing the *FAST SYBR Green* reagent 1x (ABI, Foster City, CA; USA), ¼ of the synthesized cDNA and specific primers for all isoforms of *VEGFA* or for β -actin. The thermocycling conditions were as follows: an initial cycle of 95 °C for 20 s, followed by 50 cycles of 95 °C for 3 s and 60 °C for 30 s. The specificity of the PCR was determined using the dissociation curves (*melting*), which showed a single peak at a temperature of approximately 76 °C for the *VEGFA* gene and 78 °C for the β -actin gene.

The following primer sequences were used: *VEGFA*-5'- GGC GAG GCA GCT TGA GTT AA-3' (direct primer), *VEGFA*-5'-CAC CGC CTC GGC TTG TC-3' (reverse primer), β -actin-5'-GCG CGG CTA CAG CTT CA-3' (direct primer), β -actin-5'-CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC C-3' (reverse primer).

STATISTICAL ANALYSIS

The data were described as mean \pm standard deviation or total and percentage numbers. VEGFA expression was compared by genotypes (GG vs. CC) using the Student t test after log transformation, since this variable did not present a normal distribution. The clinical characteristics of the two genotypes were compared using the Student t test or the chi-square test as appropriate. The correlation between expression and age was evaluated using the Pearson correlation coefficient. Since a priori it was defined that individuals with genotype CC should have greater VEGFA expression in the retina, a unicaudal alpha of 5% was used for this analysis. Bicaudal tests were used for the other analyses. Statistical analysis was performed using statistical software, *SPSS 16.0 (Statistical Package for Social Sciences)*.

RESULTS

Thirty-six cornea donors were studied. Age varied from 13 to 79 years (mean 56.7 ± 15.5 years). Among the 36 patients, 21 (58.3%) were male, and 18 (50%) were homozygous for allele C. The clinical characteristics of the two groups (CC vs. GG) were similar regarding age range, sex, proportion of hypertensives and smokers (Table 1).

The patients with CC genotype presented an increased gene expression (5.15 ± 4.47 AU) as compared to those with GG genotype (2.62 ± 2.56 AU, $P = 0.023$) (Figure 1). No differences were observed when gene expression was analyzed by gender (men: 3.38 ± 3.44 vs. women: 4.25 ± 4.02 AU, $P = 0.50$), hypertensive status (hypertensives: 3.09 ± 3.94 vs. normotensives: 4.64 ± 4.47 AU, $P = 0.437$), or smoke status (smokers: 4.33 ± 4.98 vs. non-smokers: 4.05 ± 3.88 AU, $P = 0.881$). The retinal VEGFA expression did not correlated with the age ($r = 0.28$, $P = 0.86$).

DISCUSSION

In this study we observed that in non-diabetic individuals without retinal disease the CC genotype of -634 C/G polymorphism is associated with increased retinal expression of the gene that encodes VEGFA. That finding was not associated with gender, smoke or hypertension status.

Functional polymorphisms can influence gene expression regulating the final quantity of protein related to a given disease. The growing interest in researching the VEGFA – 634C/G polymorphism is justified by its association with DR (27). Previous studies suggested that allele C of VEGFA-634C/G polymorphism as a risk factor for DR (20, 22, 23), for DME, independently of the presence of RD (21), and it is associated to elevated serum and vitreous levels of VEGFA (26) in patients with DM2. These reports parallels the results of our study.

Although much is known about changes involving VEGFA in eye diseases, and the inhibition of this protein through the therapeutic use of intravitreal anti-VEGFA drugs, little is known about the normal human retina. In experimental studies of rats and monkeys, VEGFA was constitutively expressed in vascularized tissues of normal eyes (17, 29). In rats, the retinal VEGFA expression is associated with age, and is found to be increased in older animals (29). This suggests greater susceptibility to neovascularization, and may be related to the etiology, for instance, of the choroidal neovascular membrane and worse DR in older patients. However, in the present study, no association was seen between VEGFA expression and donor age.

The increased VEGFA gene expression in retina of donors with CC genotype is compatible with the role of this protein in DME and DR, because it is an important factor in increased vascular permeability, stimulus of mitosis of endothelial cells and, consequently, angiogenesis (5, 28). Our findings suggest that this polymorphism should

be investigated as a risk factor for greater VEGFA production in the retina of diabetic patients and consequent predisposition to neovascularisation and increased vascular permeability from exposure to low oxygen tension (5, 6).

Although the present study had a small sample size, our findings suggest the importance of the studied polymorphism in encode the VEGFA in retina even in patients without DM. This polymorphism should be investigated in others diseases involving the increased VEGFA production and it would be the target of gene therapy in the future.

In conclusion, the CC genotype of -634 C/G polymorphism is associated with the increased VEGFA gene expression in the retinas of donors without DM, **which could explain the increased risk of DR in individuals who have DM.**

REFERENCES

1. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem.* 1992 Jun 5;267(16):10931-4.
2. Zetter BR. Angiogenesis. State of the art. *Chest.* 1988 Mar;93(3 Suppl):159S-66S.
3. Folkman J. How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? G.H.A. Clowes memorial Award lecture. *Cancer Res.* 1986 Feb;46(2):467-73.
4. Polverini PJ. The pathophysiology of angiogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1995;6(3):230-47.
5. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol.* 1995 May;146(5):1029-39.
6. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev.* 2004 Aug;25(4):581-611.
7. Benjamin LE, Golijanin D, Itin A, Pode D, Keshet E. Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J Clin Invest.* 1999 Jan;103(2):159-65.
8. Crawford TN, Alfaro DV, 3rd, Kerrison JB, Jablon EP. Diabetic retinopathy and angiogenesis. *Curr Diabetes Rev.* 2009 Feb;5(1):8-13.
9. Virgintino D, Ozerdem U, Girolamo F, Roncali L, Stallcup WB, Perris R. Reversal of cellular roles in angiogenesis: implications for anti-angiogenic therapy. *J Vasc Res.* 2008;45(2):129-31.
10. Capp C ZN, Wajner S, Maia AL. Papel do fator de crescimento endotelial vascular nos carcinomas de tireóide. *Revista HCPA.* 2009;29(1):51-9.

11. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev.* 1997 Feb;18(1):4-25.
12. Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico G. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation.* 1996 Apr 15;93(8):1493-5.
13. Paques M, Massin P, Gaudric A. Growth factors and diabetic retinopathy. *Diabetes Metab.* 1997 Apr;23(2):125-30.
14. Nagy JA, Benjamin L, Zeng H, Dvorak AM, Dvorak HF. Vascular permeability, vascular hyperpermeability and angiogenesis. *Angiogenesis.* 2008;11(2):109-19.
15. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, et al. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem.* 1991 Jun 25;266(18):11947-54.
16. Gerber HP, Hillan KJ, Ryan AM, Kowalski J, Keller GA, Rangell L, et al. VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development.* 1999 Mar;126(6):1149-59.
17. Kim I, Ryan AM, Rohan R, Amano S, Agular S, Miller JW, et al. Constitutive expression of VEGF, VEGFR-1, and VEGFR-2 in normal eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999 Aug;40(9):2115-21.
18. Saint-Geniez M, Maharaj AS, Walshe TE, Tucker BA, Sekiyama E, Kurihara T, et al. Endogenous VEGF is required for visual function: evidence for a survival role on muller cells and photoreceptors. *PLoS One.* 2008;3(11):e3554.
19. Errera FI, Canani LH, Silva ME, Yeh E, Takahashi W, Santos KG, et al. Functional vascular endothelial growth factor -634G>C SNP is associated with

proliferative diabetic retinopathy: a case-control study in a Brazilian population of European ancestry. *Diabetes Care*. 2007 Feb;30(2):275-9.

20. Awata T, Inoue K, Kurihara S, Ohkubo T, Watanabe M, Inukai K, et al. A common polymorphism in the 5'-untranslated region of the VEGF gene is associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2002 May;51(5):1635-9.

21. Awata T, Kurihara S, Takata N, Neda T, Iizuka H, Ohkubo T, et al. Functional VEGF C-634G polymorphism is associated with development of diabetic macular edema and correlated with macular retinal thickness in type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Aug 5;333(3):679-85.

22. Szaflik JP, Wysocki T, Kowalski M, Majsterek I, Borucka AI, Blasiak J, et al. An association between vascular endothelial growth factor gene promoter polymorphisms and diabetic retinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2008 Jan;246(1):39-43.

23. Suganthalakshmi B, Anand R, Kim R, Mahalakshmi R, Karthikprakash S, Namperumalsamy P, et al. Association of VEGF and eNOS gene polymorphisms in type 2 diabetic retinopathy. *Mol Vis*. 2006;12:336-41.

24. Kangas-Kontio T VS, Kakko SJ, Penna J, Savolainen ER, Savolainen MJ, Liinamaa MJ. Polymorphism of the manganese superoxide dismutase gene but not of vascular endothelial growth factor gene is a risk factor for diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol*. 2009;93(10):1401-6.

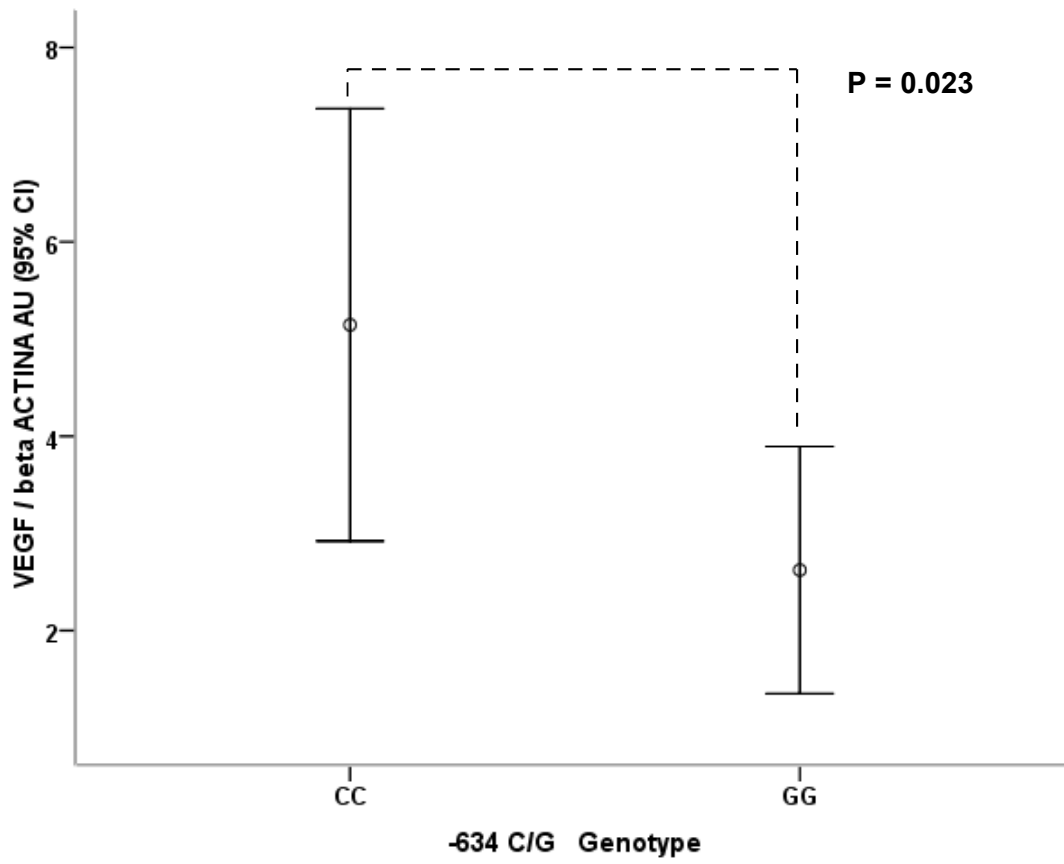
25. Nakamura S, Iwasaki N, Funatsu H, Kitano S, Iwamoto Y. Impact of variants in the VEGF gene on progression of proliferative diabetic retinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2009 Jan;247(1):21-6.

26. Petrovic MG, Korosec P, Kosnik M, Osredkar J, Hawlina M, Peterlin B, et al. Local and genetic determinants of vascular endothelial growth factor expression in advanced proliferative diabetic retinopathy. *Mol Vis*. 2008;14:1382-7.
27. Shastry BS. SNPs and haplotypes: genetic markers for disease and drug response (review). *Int J Mol Med*. 2003 Mar;11(3):379-82.
28. Ferrara N, Keyt B. Vascular endothelial growth factor: basic biology and clinical implications. *Exs*. 1997;79:209-32.
29. Smith CP, Steinle JJ. Changes in growth factor expression in normal aging of the rat retina. *Exp Eye Res*. 2007 Dec;85(6):817-24.

Table 1. Clinical Characteristics According to Genotype

	Genotype		P
	CC	GG	
	(n=18)	(n=18)	
Age (years)	60.1 ± 10.2	53.4 ± 19.1	0.1
Male sex (%)	66.7	50.0	0.3
Arterial hypertension (%)	16.7	45.5	0.1
Smoking (%)	58.3	27.3	0.1
			3
Data expressed in mean ± standard deviation or number (%)			

Figure 1: Relationship of VEGF quantification in retina and VEGF -634C/G polymorphism



CONSIDERAÇÕES FINAIS

A busca por conhecimento sobre a patogênese e os fatores de risco associados à RD levaram à identificação do VEGF como fator importante nas doenças oculares que envolvem neovascularização. A associação de maiores níveis de VEGF com a piora da RD e o uso de medicações anti-angiogênicas, tendo como alvo esta citocina e seus receptores, estimulam a pesquisa em torno dos polimorfismos do VEGF.

Neste estudo, demonstramos que o polimorfismo do VEGF -634C/G na apresentação de homozigose para o alelo C está associada à maior expressão do VEGF na retina de indivíduos sem DM.

A compreensão da suscetibilidade genética à RD propiciará a identificação de pacientes com maior risco de desenvolver esta doença, que é uma das principais causas de cegueira no mundo, possibilitando um acompanhamento e intervenção mais eficazes e conseqüente manutenção da capacidade visual e qualidade de vida nos pacientes com DM.

V172p Valiatti, Fabiana Borba

Papel do fator de crescimento vascular endotelial na retinopatia diabética / Fabiana Borba Valiatti ; orient. Luis Henrique Canani ; co-orient. Daisy Crispim. – 2010.
53 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia. Porto Alegre, BR-RS, 2010.

1. Retinopatia diabética 2. Diabetes mellitus 3. Retina 4. Fator A de crescimento do endotélio vascular 5. Polimorfismo genético I. Canani, Luis Henrique II. Crispim, Daisy III.
Título.

NLM: WK 835

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA