

# Aumento da imunorreatividade da molécula de adesão intercelular-1 na esclera e coróide em modelo experimental de hipercolesterolemia

## *Increased intercellular adhesion molecule-1 immunoreactivity in the sclera-choroid complex in hypercholesterolemia experimental model*

Rogil José de Almeida Torres<sup>1</sup>, Lucia de Noronha<sup>2</sup>, Regiane do Rocio de Almeida Torres<sup>3</sup>, Seigo Nagashima<sup>4</sup>, Caroline Luzia de Almeida Torres<sup>5</sup>, Andréa Luchini<sup>6</sup>, Robson Antônio de Almeida Torres<sup>5</sup>, Leonardo Brandão Prêcoma<sup>7</sup>, Dalton Bertolim Prêcoma<sup>8</sup>

### RESUMO

**Objetivo:** O objetivo deste trabalho é avaliar a expressão da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) na esclera e coróide de coelhos hipercolesterolêmicos. **Métodos:** Coelhos *New Zealand* foram organizados em dois grupos: GN (grupo dieta normal), composto por 8 coelhos (8 olhos), recebeu ração padrão para coelhos, durante 4 semanas; GH (grupo hipercolesterolêmico), composto por 13 coelhos (13 olhos), recebeu dieta rica em colesterol a 1% por 8 semanas. Foi realizada a dosagem sérica de colesterol total, triglicérides, HDL colesterol, glicemia de jejum no início do experimento e no momento da eutanásia. Ao final da 4ª semana para o GN e 8ª semana para o GH foi realizada a eutanásia dos animais. Os olhos foram corados com hematoxilina-eosina e submetidos à análise histológica, histomorfométrica e imunohistoquímica com o anticorpo ICAM-1. **Resultados:** Observou-se significativo aumento do colesterol total e triglicérides do GH em relação ao GN ( $p < 0,001$ ). A avaliação histológica com hematoxilina eosina revelou grande quantidade de macrófagos no complexo esclero-coroidal do GH. No GH constatou-se significativo aumento da espessura da esclera e coróide em relação ao GN ( $p < 0,001$ ). Houve significativo aumento da expressão da ICAM-1 na esclera e coróide dos animais do GH em relação ao GN ( $p < 0,001$ ). **Conclusão:** Este estudo demonstra que a dieta hipercolesterolêmica induz ao aumento da expressão da ICAM-1 na esclera e coróide de coelhos.

**Descritores:** Colesterol; Moléculas de adesão celular; Macrófagos; Coróide; Esclera; Degeneração macular

### ABSTRACT

**Objective:** The aim of this study is to investigate the expression of the intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in the sclera and choroid of hypercholesterolemic rabbits. **Methods:** New Zealand rabbits were divided into two groups: the normal diet group (NG), with 8 rabbits (8 eyes), was fed a standard rabbit diet for 4 weeks; the hypercholesterolemic group (HG), with 13 rabbits (13 eyes), was fed a 1% cholesterol-enriched diet for 8 weeks. Total serum cholesterol, triglyceride, HDL cholesterol and fasting blood glucose exams were performed at the start of the experiment and at the euthanasia time. HG and NG animals were euthanized after 8th week and 4th week, respectively. Their eyes were stained with hematoxylin-eosin and underwent histological, histomorphometric and immunohistochemical analyses with ICAM-1 antibody. **Results:** The diet has induced a significant increase in total cholesterol and triglyceride levels in HG when compared with NG ( $p < 0.001$ ). The histological analysis with hematoxylin-eosin revealed a large number of macrophages in the HG sclera-choroid complex. Moreover, a significant increase in the HG sclera and choroid thickness was observed in relation to NG ( $p < 0.001$ ). There was a significant increase in the ICAM-1 expression in HG sclera and choroid in relation to NG. **Conclusion:** This study has revealed that the hypercholesterolemic diet induces an increase in the ICAM-1 expression in the rabbits' sclera and choroid.

**Keywords:** Cholesterol; Cell adhesion molecules; Macrophages; Choroid; Sclera; Macular degeneration

<sup>1</sup> Programa de pós-doutorado, Pontifícia Universidade Católica do Paraná – Curitiba (PR), Brasil;

<sup>2,3,4</sup> Pontifícia Universidade Católica do Paraná – Curitiba (PR), Brasil;

<sup>5</sup> Universidade Positivo – Curitiba (PR), Brasil;

<sup>6</sup> Centro Oftalmológico de Curitiba – Curitiba (PR), Brasil;

<sup>7</sup> Hospital Angelina Caron – Campina Grande do Sul (PR), Brasil;

<sup>8</sup> Pontifícia Universidade Católica do Paraná – Curitiba (PR), Brasil;

Trabalho realizado no setor de pós-graduação da Pontifícia Universidade Católica do Paraná e Hospital Angelina Caron (Campina Grande do Sul (PR))

Os autores declaram não haver conflitos de interesse

Recebido para publicação em 17/12/2013 - Aceito para publicação em 26/02/2014.

## INTRODUÇÃO

Neovascularização intraocular patológica é uma complicação que usualmente cursa com cegueira. Entre as patologias que apresentam esta evolução destacam-se a retinopatia da prematuridade, retinopatia diabética, glaucoma neovascular e degeneração macular relacionada à idade (DMRI). A DMRI é uma doença multifatorial. Alterações genéticas, ambientais, demográficas, dietéticas, clínicas, oculares e de estilo de vida são responsáveis pelo desencadeamento desta doença<sup>(1,2)</sup>.

Há décadas, a origem da DMRI vem sendo atribuída ao acúmulo excessivo e patológico de lipídeos na membrana de Bruch, proveniente da disfunção das células do epitélio pigmentário (EPR)<sup>(3)</sup>. Recentemente, a descoberta do papel do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) na formação de neovasos subretinianos foi importantíssima para o melhor entendimento da fisiopatogenia da DMRI. A partir deste fato, importantes estudos foram realizados com o intuito de detectar os mecanismos e as principais células responsáveis pela liberação do VEGF. O suporte de estudos experimentais e clínicos realizados anteriormente para detectar a origem e cura de outras doenças orgânicas, demonstrando que a hipóxia é o principal estímulo para liberação do VEGF<sup>(4)</sup>, facilitou o entendimento da formação da rede neovascular subretiniana na DMRI exsudativa<sup>(1)</sup>. Entretanto, angiogênese é um processo complexo e que compreende várias etapas na qual, além dos fatores de crescimento, as moléculas de adesão e citocinas inflamatórias estão envolvidas e têm papel essencial<sup>(5,6)</sup>.

A molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) ou CD-54 é uma glicoproteína da superfamília das imunoglobulinas. Como outras moléculas de adesão, ICAM-1 está distribuído nas células endoteliais e leucócitos, participando no recrutamento leucocitário para o tecido lesado ou inflamado<sup>(7)</sup>. Estudo realizado em olhos de doadores humanos, que visou avaliar a distribuição da ICAM-1 na coriocapilar, demonstrou maior concentração desta imunoglobulina na região macular em relação à região periférica<sup>(8)</sup>. Este achado sugere maior suscetibilidade da mácula para o trânsito de células imunes, incluindo os macrófagos, o que ajuda a explicar a maior ocorrência de membrana neovascular subretiniana nesta região. Sabe-se que os macrófagos, além de produzirem VEGF<sup>(9)</sup>, são também fonte de citocinas inflamatórias e pró-angiogênicas, tais como interleucina-6 e fator de necrose tumoral (TNF)<sup>(10,11)</sup>, que mediam a resposta inflamatória e contribuem de forma significativa para a formação da membrana neovascular subretiniana<sup>(6,12-13)</sup>.

Tratamentos com drogas antiangiogênicas têm obtido melhor desempenho que as terapias anteriores, porém o prognóstico visual ainda é limitado<sup>(14)</sup>. Sendo assim, um modelo experimental que induza a expressão de moléculas de adesão no complexo coroide-escleral tem potencial de simular as alterações observadas na DMRI. Consequentemente, os conhecimentos fisiopatogênicos adquiridos possibilitarão intervenções terapêuticas que poderão culminar com tratamentos mais eficazes para esta doença.

O objetivo deste trabalho é avaliar a expressão da ICAM-1 na esclera e coroide de coelhos hipercolesterolêmicos.

## MÉTODOS

Para a realização deste estudo, o protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, seguindo os princípios da Declaração de Helsinque (1964) e da *Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO)*.

### Ambiente de experimentação

Os procedimentos deste estudo foram realizados nas dependências do laboratório de Técnica Operatória da PUC-PR e do Centro de Estudos do Hospital Angelina Caron (HAC). Os animais foram mantidos no biotério em macroambiente com ciclos de iluminação 12/12 horas, com trocas de ar e temperatura controlada de 19 a 23°C e receberam durante o experimento água e ração específica para a espécie *Nuvital*<sup>®</sup> (Nuvital, Colombo, Brasil) de forma *ad libitum*.

### Animais utilizados e delineamento experimental

Foram utilizados 21 coelhos machos albinos (*Oryctolagus cuniculus*), da linhagem *New Zealand*, procedentes do Biotério Central da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, com idade média aproximada de 110 dias e peso médio de 2.770 gramas. Os animais foram divididos em 02 grupos: grupo 1 (GN), composto por 08 coelhos, e grupo 2 (GH) composto por 13 coelhos. O GN (grupo de dieta normal) recebeu ração padrão para coelhos de laboratório *Nuvital*<sup>®</sup> (Nuvital, Colombo, Brasil) e foi submetido à eutanásia em 04 semanas. O GH (grupo hipercolesterolêmico) recebeu ração padrão para coelhos de laboratório *Nuvital*<sup>®</sup> (Nuvital, Colombo, Brasil), acrescida de colesterol a 1%, em todo o período do estudo (ração suplementar). Este grupo foi submetido à eutanásia ao final de 8 semanas.

Cada coelho foi submetido à dosagem sérica de colesterol total, triglicerídeos, colesterol HDL, glicemia de jejum no início do experimento e no momento da eutanásia. As coletas das amostras sanguíneas foram realizadas através de punção da veia marginal auricular magna sob anestesia geral com injeção intramuscular de ketamina 5mg/kg e xylazina 35mg/kg. As dosagens plasmáticas de glicemia, colesterol total, colesterol HDL e triglicerídeos foram realizadas pelo método enzimático colorimétrico automatizado (Architec<sup>®</sup> - Abbott). Uma soroteca com 500 microlitros de cada animal foi congelada para análises futuras. O peso dos coelhos foi aferido em rotina semanal.

Os animais foram sacrificados com injeção endovenosa de 5mL de pentobarbital e os olhos imediatamente fixados em paraformaldeído a 4% (Merck, Darmstadt, Germany), em 0,1M fosfato/pH 7,4 por 4 horas, para análise histomorfométrica e imunohistoquímica.

### Preparo da ração suplementar

Para fazer a ração hipercolesterolêmica a 1%, utilizada nas oito semanas do experimento, utilizou-se 200 gramas de colesterol (Sigma-Aldrich a 95%<sup>®</sup>) dissolvido em 800 mililitros de clorofórmio (Biotec<sup>®</sup>), que foi distribuído homogeneamente em 20 quilogramas de ração *Nuvital*<sup>®</sup> (Nuvital, Colombo, Brasil). Antes de administrar a ração aos coelhos, esperou-se um período mínimo de 24 horas para adequada evaporação do clorofórmio. A quantidade diária ofertada para cada animal foi de 600g ao dia<sup>(15)</sup>.

### Análise histomorfométrica (quantitativa)

Os dois olhos de cada animal foram removidos e submetidos à fixação, porém somente um foi escolhido, de forma aleatória, para o estudo. Depois da fixação, os espécimes foram avaliados macroscopicamente. Procedeu-se então uma secção axial ao nível do nervo óptico, dividindo os globos oculares em duas metades iguais (superior e inferior). A metade inferior foi estocada para estudos posteriores. Já a metade superior foi submetida à desidratação, diafanização e impregnação em parafina, com histotécnico da marca Leica® (Leica, Wetzlar, Germany), modelo TP 1020. Para a confecção dos blocos de parafina utilizou-se o inclusor Leica®, modelo EG1160. Estes blocos foram cortados com micrótomo, marca Leica® modelo RM2145 (Leica, Wetzlar, Germany), a 5µ para obtenção dos cortes histológicos. Estes cortes foram pescados em lâmina de vidro com albumina, corados com hematoxilina-eosina e montados com lamínula de vidro de 24x90mm Entellan, Merck® (Merck, Darmstadt, Germany).

Para a análise quantitativa, os cortes corados em hematoxilina-eosina previamente selecionados foram analisados microscopicamente com objetiva de 4x. Com uma caneta de retroprojeção azul, a porção posterior da hemiseção do globo ocular foi dividida, manualmente, em 10 segmentos iguais (de pars plana a pars plana contralateral). Foi então feita a captura de uma imagem por segmento através de microscópio *Olympus BX50* acoplado a câmera *Sony* e *software ImageProPlus®*. Em cada imagem capturada foram realizadas 4 medidas morfométricas lineares utilizando-se o *software Image-Pro Plus®* para avaliar a espessura da esclera e coroide nos 10 segmentos. Finalmente foram realizadas as médias das 4 medidas de cada um dos 10 segmentos em cada um dos espécimes analisados. A espessura foi expressa em micrômetros.

### Preparação do tecido e análise imunohistoquímica

Os cortes histológicos foram desparafinizados e reidratados, sendo feito posteriormente o bloqueio da peroxidase endógena. Posteriormente foram lavados em água deionizada e incubados em câmara úmida a 95°C por 20 minutos para recuperação antigênica. Após esta fase, foi realizado novo bloqueio da peroxidase endógena. Os cortes foram cobertos pelo anticorpo primário monoclonal produzido em camundongo ICAM-1 da marca novocastra® (Newcastle upon Tyne, England) (diluição 1:100). Posteriormente, foi recoberto com anticorpo secundário, polímero marcado-HRP anticamundongo advance® System (DakoCytomation, Inc., Carpinteria, CA) e incubados, à temperatura ambiente por 30 minutos. A seguir foram submetidos ao gotejamento de substrato misto DAB (DakoCytomation, Inc., CA, USA). Novamente foram incubados por 3 até 5 minutos. Os cortes foram contracorados com hematoxilina de Mayer e depois montados.

Controles positivos e negativos foram usados em todas as marcações e as lâminas foram primeiramente analisadas por um observador, sem conhecimento prévio do grupo de identificação (análise mascarada). Nesta análise, foi anotada a presença ou não de positividade para o marcador ICAM-1. As áreas positivas adquiriram coloração acastanhada e foram analisadas pelo método da morfometria de cores. Para tanto, foram capturadas imagens de cinco campos consecutivos, de pars plana a pars plana contralateral, em objetiva de 40x, utilizando a câmera *Olympus BX50*, modelo DXC-107A e o *software Image Pro Plus*.

Tal *software* permitiu que as áreas positivas fossem selecionadas e coloridas por um observador. A área imunorreativa foi automaticamente calculada pelo *software* e expressa em micrômetros<sup>2</sup>. Estes dados foram registrados no programa *Microsoft Excel* (Redmond, WA) em forma de planilhas para análise estatística. A variável *área imunorreativa* refere-se à somatória de todas as áreas positivas em cada um dos cinco campos analisados.

### Análise estatística

Para a comparação dos grupos definidos pelo tratamento em relação às variáveis quantitativas, foi considerado o teste *t* de Student para amostras independentes ou o teste não-paramétrico de Mann-Whitney, quando apropriado. A condição de normalidade foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilks. Valores de  $p < 0,05$  indicaram significância estatística. Os dados foram analisados com o programa computacional *Statistica v.8.0*.

## RESULTADOS

### Comparação dos grupos em relação às variáveis: glicose, colesterol total, HDL e triglicerídeos

O grupo dieta normal (GN) manteve as variáveis laboratoriais estáveis e normais do início ao fim do experimento. Por outro lado, os animais do GH (grupo dieta hipercolesterolêmica) manifestaram expressivo aumento do colesterol total na eutanásia. No momento basal, a média do colesterol total dos grupos era de aproximadamente 41,3mg/dL e ao final observou-se significativa elevação para 2146,8mg/dL ( $p < 0,001$ ) no GH. Outra variável laboratorial que demonstrou importante variação no GH foram os triglicerídeos. No momento basal, a média dos triglicerídeos dos grupos foi de aproximadamente 46,5mg/dL, enquanto que na eutanásia chegou a 168,5mg/dL ( $p = 0,001$ ) no GH. A glicemia e o HDL colesterol não manifestaram variações significativas ao final do experimento neste grupo.

### Análise da esclera e coroide com hematoxilina eosina

O grupo normal apresentou raros histiócitos na esclera e coroide (figura 1), enquanto que os animais do grupo hipercolesterolêmicos exibiram grande quantidade de macrófagos nestas estruturas, culminado com aumento de suas espessuras (figura 2).

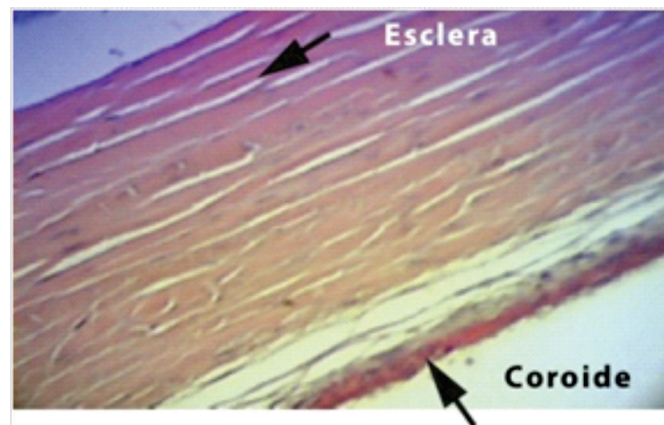


Figura 1: Esclera e coroide de animal do GN

Observam-se raros histiócitos na esclera e coroide.



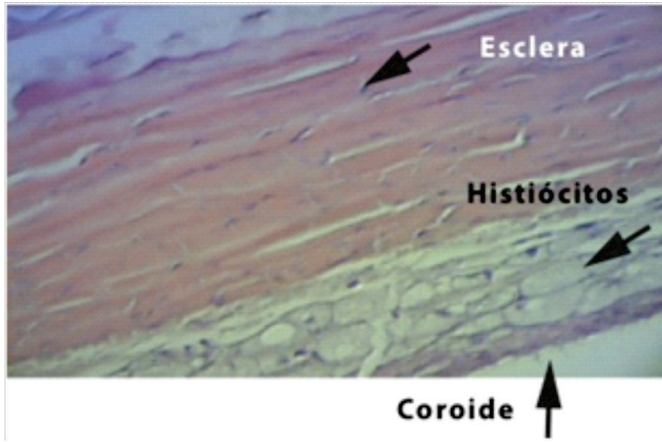


Figura 2: Esclera e coroide de animal do GH

Observa-se espessura aumentada da esclera e coroide provocada pelo elevado número de histiócitos.

**Comparação dos grupos em relação espessura da esclera e coroide (morfometria)**

O GH apresentou significativo aumento da espessura da esclera e coroide em relação ao GN ( $p < 0,001$ ) (tabela 1).

**Comparação dos grupos em relação à área total imunorreativa ao ICAM-1**

Os animais do grupo hipercolesterolêmico apresentaram aumento significativo da expressão do ICAM-1 na esclera e coroide em relação ao GN ( $p < 0,001$ ) (tabela 2), caracterizado pelo predomínio da coloração acastanhada destas estruturas (figura 3-B). Por outro lado, a esclera e coroide do GN apresentaram-se mais delgadas que o GH e com predomínio da coloração azulada, indicando a baixa imunorreatividade ao anticorpo ICAM-1 (figura 3-A).

**Tabela 1**

**Valores da espessura da esclera e coroide (em micrômetros)**

Variável	Grupo	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
Morfometria da coroide e esclera	GN	8	232,9	221,4	192,9	307,7	35,8	<0,001
	GH	13	382,5	387,9	254,0	475,0	60,5	

(\*) Teste t de Student para amostras independentes,  $p < 0,05$ ; GN: Grupo dieta normal; GH: Grupo dieta rica em colesterol

**Tabela 2**

**Área total imunorreativa da esclera e coroide ao anticorpo ICAM-1 obtida com a técnica de morfometria de cores; Os resultados foram expressos em micrômetros**

Variável	Grupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
Área imunorreativa	GN	8	607,0	218,5	50,2	2200,4	858,7	<0,001
	GH	13	3600,2	3288,7	1867,7	6368,8	1377,3	

(\*) Teste não-paramétrico de Mann-Whitney,  $p < 0,05$ ; GN: Grupo dieta normal; GH: Grupo dieta rica em colesterol

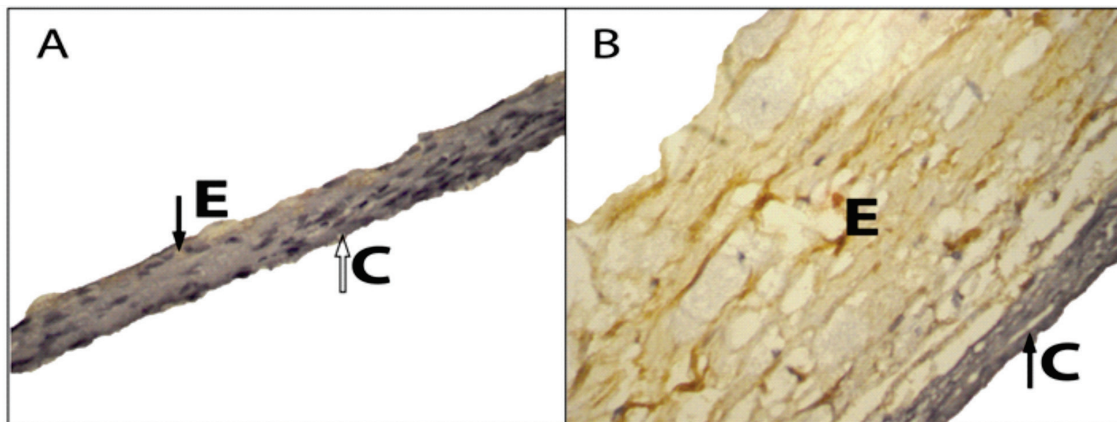


Figura 3: Imunoreatividade da esclera e coroide ao anticorpo ICAM-1: A. Complexo esclero-coroideal de coelho do GN; predomínio da coloração azul que indica a baixa imunorreatividade à ICAM-1; esclera e coroide delgadas; B. Esclera e coroide de coelho do GH; predomínio da coloração acastanhada que indica a alta imunorreatividade à ICAM-1; grande quantidade de macrófagos na esclera (E); coroide e esclera espessadas; E: esclera; C: coroide

## DISCUSSÃO

Em recente estudo experimental, nosso grupo demonstrou que a dieta hipercolesterolêmica provoca aumento da expressão da MCP-1 na coroide e esclera levando-nos a crer que as alterações que ocorrem nos grandes vasos, que conduzem a formação da placa aterosclerótica, acontecem também, de forma análoga, no complexo coróide-escleral<sup>(16)</sup>. Uma vez constatado o aumento das moléculas quimiotáticas como a MCP-1, fazia-se necessária avaliar as moléculas de adesão com o intuito de fortalecer a hipótese sugerida de que a aterosclerose e a DMRI apresentam mecanismos fisiopatológicos similares<sup>(17-19)</sup>.

Sabe-se que no olho normal, a imunoglobulina ICAM-1 apresenta baixa expressão no endotélio vascular da coroide e retina, assim como no EPR, membrana de Bruch e membrana limitante externa<sup>(20-22)</sup>. Porém, em condições patológicas, como na DMRI exsudativa, ocorre significativo aumento da expressão da ICAM-1 nos vasos da coroide e células do EPR. Este aumento da imunorreatividade foi observado principalmente na periferia da MNSR, onde existe grande número de vasos<sup>(23)</sup>. O aumento da expressão da ICAM-1 no EPR e na coroide, durante a formação da MNSR, também foi observado em estudos experimentais, sugerindo que esta imunoglobulina está envolvida na gênese da DMRI<sup>(24-25)</sup>. Fortalecendo esta hipótese, outro experimento demonstrou que camundongos deficientes geneticamente para ICAM-1, ou seu contrarceptor CD18, desenvolveram MNSR com menor volume quando comparados com os camundongos normais<sup>(5)</sup>.

No presente estudo, a dieta rica em colesterol induz a significativo aumento da expressão da ICAM-1 na esclera e coroide. Por estar envolvido no recrutamento leucocitário no tecido inflamado<sup>(26)</sup>, o aumento da expressão desta imunoglobulina pode justificar o significativo aumento de macrófagos e o conseqüente aumento da espessura do complexo esclero-coróide observado neste e em outros estudos.

Sabe-se que as células inflamatórias e o sistema complemento têm significativa participação na gênese da DMRI<sup>(27)</sup>. Já foi demonstrado que os macrófagos produzem citocinas inflamatórias, fator tecidual, VEGF e outros fatores angiogênicos<sup>(9,28-29)</sup>. Experimentalmente observou-se que a depleção generalizada dos macrófagos provoca diminuição da atividade da MNSR<sup>(30)</sup>. Sendo assim, há uma concordância a respeito do importante papel dos macrófagos na gênese da DMRI. Neste contexto, é importante frisar que o LDL oxidado é o grande estímulo para o aumento de moléculas quimiotáticas, moléculas de adesão que irão atrair os macrófagos para o sítio inflamatório, tanto na aterosclerose como na DMRI<sup>(31)</sup>. Porém, sabe-se que não somente o LDL oxidado induz o aumento da expressão da ICAM-1, mas também o LDL nativo tem esta condição<sup>(32)</sup>. Desta forma, o LDL que se deposita na membrana de Bruch, originado da degradação das extremidades dos fotorreceptores pelas células do EPR<sup>(2,31)</sup>, tem potencial de aumentar a expressão destas moléculas de adesão. Este fato pode ser determinante no aumento do número de macrófagos e desencadeamento da DMRI. Sendo assim, modelos experimentais que induzam a formação de macrófagos na coroide, através do aumento de moléculas quimiotáticas ou aumento de moléculas de adesão, podem simular a doença macular degenerativa, propiciando no futuro testes terapêuticos contra esta doença.

## CONCLUSÃO

Este trabalho demonstrou que o aumento de colesterol sérico em modelo experimental provoca aumento da expressão da ICAM-1, podendo explicar o acúmulo de macrófagos na esclera e coroide. Futuras pesquisas, utilizando drogas que interfiram nesta molécula de adesão poderão esclarecer eventual utilidade no tratamento da DMRI.

### Agradecimentos

À professora Dra. Márcia Olandoski pelo suporte na análise estatística dos dados coletados.

## REFERÊNCIAS

1. Ambati J, Ambati BK, Yoo SH, Ianchulev S, Adamis AP. Age-related macular degeneration: etiology, pathogenesis, and therapeutic strategies. *Surv Ophthalmol*. 2003;48(3):257-93. Review.
2. Veloso CE, Almeida LN, Marco LA, Vianna RN, Nehemy MB. [Importance of genetic polymorphisms in the response to age-related macular degeneration treatment]. *Rev Bras Oftalmol*. 2012;71(3):194-8. Portuguese.
3. Pauleikhoff D, Harper CA, Marshall J, Bird AC. Aging changes in Bruch's membrane. A histochemical and morphologic study. *Ophthalmology*. 1990;97(2):171-8.
4. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*. 1992;359(6398):843-5.
5. Sakurai E, Taguchi H, Anand A, Ambati BK, Gragoudas ES, Miller JW, et al. Targeted disruption of the CD18 or ICAM-1 gene inhibits choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44(6):2743-9.
6. Cohen T, Nahari D, Cerem LW, Neufeld G, Levi BZ. Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*. 1996;271(2):736-41.
7. van de Stolpe A, van der Saag PT. Intercellular adhesion molecule-1. *J Mol Med (Berl)*. 1996;74(1):13-33. Review.
8. Mullins RF, Skeie JM, Malone EA, Kuehn MH. Macular and peripheral distribution of ICAM-1 in the human choriocapillaris and retina. *Mol Vis*. 2006;12:224-35.
9. Grossniklaus HE, Ling JX, Wallace TM, Dithmar S, Lawson DH, Cohen C, et al. Macrophage and retinal pigment epithelium expression of angiogenic cytokines in choroidal neovascularization. *Mol Vis*. 2002;8:119-26.
10. May LT, Ghrayeb J, Santhanam U, Tatter SB, Sthoeger Z, Helfgott DC, et al. Synthesis and secretion of multiple forms of beta 2-interferon/B-cell differentiation factor 2/hepatocyte-stimulating factor by human fibroblasts and monocytes. *J Biol Chem*. 1988;263(16):7760-6.
11. Oh H, Takagi H, Takagi C, Suzuma K, Otani A, Ishida K, et al. The potential angiogenic role of macrophages in the formation of choroidal neovascular membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999;40(9):1891-8.
12. Markomichelakis NN, Theodossiadis PG, Sfikakis PP. Regression of neovascular age-related macular degeneration following infliximab therapy. *Am J Ophthalmol*. 2005;139(3):537-40.
13. Shi X, Semkova I, Mütter PS, Dell S, Kociok N, Jousen AM. Inhibition of TNF-alpha reduces laser-induced choroidal neovascularization. *Exp Eye Res*. 2006;83(6):1325-34.
14. Garcia Filho CA, Penha FM, Garcia CA. [Wet-amd treatment: a review in the anti-vegf drugs]. *Rev Bras Oftalmol*. 2012;71(1):63-9. Portuguese.
15. Sun YP, Lu NC, Parmley WW, Hollenbeck CB. Effects of cholesterol diets on vascular function and atherogenesis in rabbits. *Proc Soc Exp Biol Med*. 2000;224(3):166-71.
16. Torres RJ, Noronha Ld, Casella AM, Lumikoski TI, Prêcoma LB, Torres CL, et al. [Increase of choroidal and scleral MCP-1 expression in hypercholesterolemia experimental model]. *Arq Bras Oftalmol*. 2012;75(1):48-52. Portuguese.

17. Friedman E. A hemodynamic model of the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol.* 1997;124(5):677-82.
18. Friedman E. The role of the atherosclerotic process in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol.* 2000;130(5):658-63. Review.
19. Jonas JB, Tao Y, Neumaier M, Findeisen P. [Monocyte chemoattractant protein 1, intercellular adhesion molecule 1, and vascular cell adhesion molecule 1 in exudative age-related macular degeneration]. *Arch Ophthalmol.* 2010;128(10):1281-6. Portuguese.
20. Duguid IG, Boyd AW, Mandel TE. Adhesion molecules are expressed in the human retina and choroid. *Curr Eye Res.* 1992;11 Suppl:153-9.
21. Elnér SG, Elnér VM, Pavlack MA, Todd RF 3rd, Mayo-Bond L, Franklin WA, et al. Modulation and function of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) on human retinal pigment epithelial cells. *Lab Invest.* 1992;66(2):200-11.
22. McLeod S, Lefer DJ, Merges C, Luttly GA. Enhanced expression of intracellular adhesion molecule-1 and P-selectin in the diabetic human retina and choroid. *Am J Pathol.* 1995;147(3):642-53.
23. Yeh DC, Bula DV, Miller JW, Gragoudas ES, Arroyo JG. Expression of leukocyte adhesion molecules in human subfoveal choroidal neovascular membranes treated with and without photodynamic therapy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45(7):2368-73.
24. Nagai N, Oike Y, Izumi-Nagai K, Urano T, Kubota Y, Noda K, et al. Angiotensin II type 1 receptor-mediated inflammation is required for choroidal neovascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(10):2252-9.
25. Shen WY, Yu MJ, Barry CJ, Constable IJ, Rakoczy PE. Expression of cell adhesion molecules and vascular endothelial growth factor in experimental choroidal neovascularisation in the rat. *Br J Ophthalmol.* 1998;82(9):1063-71.
26. van de Stolpe A, van der Saag PT. Intercellular adhesion molecule-1. *J Mol Med (Berl).* 1996;74(1):13-33. Review.
27. Penfold PL, Provis JM, Billson FA. Age-related macular degeneration: ultrastructural studies of the relationship of leucocytes to angiogenesis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1987;225(1):70-6.
28. Tsutsumi C, Sonoda KH, Egashira K, Qiao H, Hisatomi T, Nakao S, et al. The critical role of ocular-infiltrating macrophages in the development of choroidal neovascularization. *J Leukoc Biol.* 2003;74(1):25-32.
29. Zhou J, Pham L, Zhang N, He S, Gamulescu MA, Spee C, et al. Neutrophils promote experimental choroidal neovascularization. *Mol Vis.* 2005;11:414-24.
30. Sakurai E, Anand A, Ambati BK, van Rooijen N, Ambati J. Macrophage depletion inhibits experimental choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44(8):3578-85.
31. Ruberti JW, Curcio CA, Millican CL, Menco BP, Huang JD, Johnson M. Quick-freeze/deep-etch visualization of age-related lipid accumulation in Bruch's membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44(4):1753-9.
32. Smalley DM, Lin JH, Curtis ML, Kobari Y, Stemerman MB, Pritchard KA Jr. Native LDL increases endothelial cell adhesiveness by inducing intercellular adhesion molecule-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16(4):585-90.

---

**Autor correspondente:**

Rogil José de Almeida Torres  
Rua Emiliano Perneta, nº 390 – conj. 1407  
E-mail: rjat@terra.com.br