



**FLAVIO MAC CORD MEDINA**

**ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO Y402H DO GENE  
*CFH* COM O TRATAMENTO DA DEGENERAÇÃO  
MACULAR RELACIONADA À IDADE COM  
ANTIANGIOGÊNICOS**

**CAMPINAS  
2013**





---

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Ciências Médicas

**FLAVIO MAC CORD MEDINA**

**ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO Y402H DO GENE  
CFH COM O TRATAMENTO DA DEGENERAÇÃO  
MACULAR RELACIONADA À IDADE COM  
ANTIANGIOGÊNICOS**

**Orientador:** Prof. Dr. José Paulo Cabral de Vasconcellos

Tese de doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Médicas, área de concentração em Oftalmologia.

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado defendida pelo aluno FLAVIO MAC CORD MEDINA orientado pelo Prof. Dr. José Paulo Cabral de Vasconcellos.

---

Assinatura do Orientador

**CAMPINAS  
2013**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

M468a Medina, Flavio Mac Cord, 1978-  
Associação do polimorfismo Y402H do gene CFH com o tratamento da degeneração macular relacionada à idade com antiangiogênicos / Flavio Mac Cord Medina. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: José Paulo Cabral de Vasconcellos.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Fator H do complemento. 2. Degeneração macular . 3. Neovascularização de corioide. 4. Farmacogenética. 5. Bevacizumabe. I. Vasconcellos, José Paulo Cabral de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Association of the Y402H polymorphism of CFH gene with the treatment of age-related macular degeneration with antiangiogenics

**Palavras-chave em inglês:**

Complement factor H

Macular degeneration

Choroidal neovascularization

Pharmacogenetics

Bevacizumab

**Área de concentração:** Oftalmologia

**Titulação:** Doutor em Ciências Médicas

**Banca examinadora:**

José Paulo Cabral de Vasconcellos [Orientador]

Keila Miriam Monteiro de Carvalho

Edi Lúcia Sartorato

Mário Martins dos Santos Motta

Pedro Carlos Carricondo

**Data de defesa:** 27-11-2013

**Programa de Pós-Graduação:** Ciências Médicas

# BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

FLAVIO MAC CORD MEDINA

Orientador (a) PROF(A). DR(A). JOSÉ PAULO CABRAL DE VASCONCELLOS

## MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). JOSÉ PAULO CABRAL DE VASCONCELLOS 

2. PROF(A). DR(A). MÁRIO MARTINS DOS SANTOS MOTTA 

3. PROF(A). DR(A). PEDRO CARLOS CARRICONDO 

4. PROF(A).DR(A). KEILA MIRIAM MONTEIRO DE CARVALHO 

5. PROF(A).DR(A). EDI LUCIA SARTORATO 

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas  
da Universidade Estadual de Campinas

Data: 27 de novembro de 2013



## ***DEDICATÓRIA***

*À Tia Etelvina,  
que viveu corajosamente a luta contra as limitações impostas pela  
DMRI.*



## AGRADECIMENTOS

---

*Ao Prof. Dr. José Paulo Cabral de Vasconcellos, modelo na minha formação como pesquisador, pela amizade e pela constante orientação em minha vida profissional,*

*Ao Prof. Dr. Newton Kara-José e a todos os demais professores e médicos assistentes da Disciplina de Oftalmologia da UNICAMP, pelo aprendizado da Oftalmologia,*

*Ao Prof. Dr. Vital Paulino Costa, pela oportunidade de introdução à pesquisa em Oftalmologia,*

*À Prof. Dra. Keila Miriam Monteiro de Carvalho, pelo exemplo ético e pelo trabalho frente à Pós-Graduação da Disciplina de Oftalmologia da UNICAMP,*

*À Prof. Dra. Mônica Barbosa de Melo, pelo aprendizado da Genética, pelo dedicado trabalho à frente do CBMEG e pela orientação na condução das avaliações genéticas de nossos pacientes,*

*Ao Prof. Dr. Mário Martins dos Santos Motta, pelo constante estímulo, valiosos conselhos e ampla contribuição nesta pesquisa,*

*Ao Prof. Dr. Walter Yukihiro Takahashi, pelos ensinamentos na retinologia e pela colaboração no desenho e condução deste trabalho,*

*Aos colegas Drs. Augusto Motta, Juliana Rocha, Gabrielle Oliveira e André Barros, pela contribuição no acompanhamento dos pacientes e coleta dos dados,*

*Aos biólogos Gislene Gil e Bruno Batista de Souza, pelo dedicado trabalho nas bancadas de laboratório do CBMEG,*

*Aos estatísticos Helymar Machado e Cleide Silva, pela minuciosa análise estatística dos nossos resultados,*

*Aos Drs. Dácio Carvalho Costa e Pedro Carlos Carricondo, pela amizade e orientações fornecidas na finalização desta tese,*

*Ao Dr. Orlando Abdo e colegas da Clínica São Vicente, modelos da minha formação médica, pelo apoio na condução desse trabalho,*

*Ao Dr. Gilberto dos Passos e colegas do Hospital Federal dos Servidores do Estado do Rio de Janeiro, pelo incentivo ao desenvolvimento profissional e apoio às atividades científicas,*

*Ao Prof. Dr. Ricardo Lima de Almeida Neves e colegas do Hospital Universitário Pedro Ernesto, pela oportunidade de continuidade da vida acadêmica,*

*Ao Sr. Valtuir C. Nunes, Sra. Eliane Pinheiro e Sra. Márcia Aguiar dos Santos, pelos constantes auxílios no decorrer desta jornada,*

*Aos meus pais, que carinhosamente me educaram na ética e no trabalho,*

*À minha noiva Giselle, por estar ao meu lado, trazendo tranquilidade para condução das minhas atividades,*

*Aos pacientes e seus familiares, pela generosa participação nesta pesquisa.*

**Introdução:** O fator de complemento H (CFH) é um componente do sistema imunológico que possui ação imunomoduladora sobre a resposta inflamatória. A gravidade da degeneração macular relacionada à idade (DMRI) é determinada em parte por um estado inflamatório sustentado por atividade aberrante da via alternativa do complemento. As evidências na literatura da relação entre o polimorfismo Y402H do gene *CFH* e a resposta ao tratamento da DMRI exsudativa permanecem controversas. **Objetivo:** Avaliar a associação entre as variantes do polimorfismo Y402H do gene *CFH* e os efeitos funcional e morfológico a curto prazo, assim como a evolução a longo prazo, dos antiangiogênicos em pacientes com DMRI exsudativa. **Métodos:** Vinte e cinco pacientes recém diagnosticados com DMRI exsudativa foram avaliados em um estudo de curto prazo com acuidade visual medida pela tabela do ETDRS e espessura retiniana central por tomografia de coerência óptica (OCT) de alta resolução, submetidos a injeção intravítrea de bevacizumabe e prospectivamente reexaminados em 7 e 28 dias. Quarenta e seis pacientes previamente submetidos ao tratamento com antiangiogênicos tiveram seus prontuários e exames retrospectivamente avaliados em um estudo de longo prazo quanto às evoluções funcional e morfológica ao longo de um ano. Esses parâmetros foram comparados com o genótipo do *CFH*, cuja análise molecular do polimorfismo Y402H foi realizada por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento direto. **Resultados:** No estudo de curto prazo, houve melhora da acuidade visual no dia 28 em relação ao valor inicial (D0 vs. D28) em todos os genótipos. Entretanto, no grupo homozigoto para o alelo de risco (CC), ocorreu diferença apenas no dia 28 em relação ao dia 7 (D7 vs. D28), enquanto nos grupos CT e TT, a acuidade visual melhorou mais precocemente, no dia 7 em relação ao valor inicial (D0 vs. D7). A espessura retiniana central apresentou redução nos grupos CT (D0 vs. D7 e D0 vs. D28) e TT (D0 vs. D28), enquanto não houve mudança significativa no grupo CC. No estudo de longo prazo, foi evidenciada melhora da acuidade visual ao longo de um

ano de acompanhamento apenas no grupo de pacientes sem o alelo C, sem diferença significativa no grupo de pacientes com o alelo de risco. A espessura retiniana central apresentou redução nos genótipos CT e TT, enquanto que no grupo CC não houve significância. Número de injeções, persistência de atividade neovascular e percepção subjetiva de melhora não diferiram entre os genótipos.

**Conclusão:** O perfil de genótipo do *CFH* parece influenciar o efeito funcional e morfológico da injeção intravítrea de bevacizumabe com uma ação mais precoce em pacientes sem o genótipo de risco. A presença do alelo de risco parece estar relacionada à ausência de melhora visual ao longo de um ano de tratamento com inibidores do VEGF. Esses resultados sugerem que o perfil do genótipo do *CFH* possa exercer efeito farmacogenético nesse grupo de pacientes brasileiros, influenciando negativamente a resposta ao tratamento da DMRI exsudativa com antiangiogênicos.

**Palavras-chave:** Fator de complemento H, degeneração macular relacionada à idade, neovascularização de coroide, farmacogenética, ranibizumabe, bevacizumabe.

**Introduction:** The complement factor H (CFH) is a component of the immune system that has immunomodulatory action on the inflammatory response. The severity of age-related macular degeneration (AMD) is determined in part by an inflammatory state sustained by aberrant activity of the alternative complement pathway. Evidences in the literature of the relationship between the Y402H polymorphism of *CFH* gene and response to treatment of wet AMD remain controversial. **Purpose:** To evaluate the association between variants of the Y402H polymorphism of *CFH* gene polymorphism and the short-term functional and morphological effects, as well as long-term evolution, of antiangiogenic drugs in patients with exudative AMD. **Methods:** Twenty-five patients with newly diagnosed exudative AMD were evaluated in a short-term study with visual acuity on ETDRS chart and central retinal thickness measured with high resolution optical coherence tomography (OCT), underwent intravitreal injection of bevacizumab and were prospectively reviewed in 7 and 28 days. Forty-six patients previously submitted to treatment with VEGF inhibitors had their medical charts retrospectively evaluated in a long-term study about the functional and morphological evolutions over one year. These parameters were compared with the *CFH* genotype, whose molecular analysis of Y402H polymorphism was performed by polymerase chain reaction (PCR) and direct sequencing. **Results:** In the short-term study, there was improvement in visual acuity at day 28 compared to baseline (D0 vs. D28) in all genotypes. However, in the group homozygous for the risk allele (CC), differences occurred only on day 28 compared to day 7 (D7 vs. D28), while the CT and TT groups, visual acuity improved earlier in the day 7 compared the initial value (D0 vs. D7). The central retinal thickness decreased in groups CT (D0 vs. D7, D0 vs. D28) and TT (D0 vs. D28), while there was no significant change in group CC. In the long-term study, it was noticed improvement in visual acuity over one year of follow-up in the group of patients without the C allele and no significant difference in the group of patients with the risk allele. The

central retinal thickness decreased in the CT and TT genotypes, whereas in the CC group the difference was not significant. Number of injections, persistent neovascular activity and subjective perception of improvement did not differ between genotypes. **Conclusion:** The profile of the *CFH* genotype seems to influence the functional and morphological effect of intravitreal injection of bevacizumab with an earlier action in patients without the risk genotype. The presence of the risk allele seems to be related to the lack of visual improvement over one year of treatment with inhibitors of VEGF. These results suggest that the profile of the *CFH* genotype may present pharmacogenetic effect in this group of Brazilian patients, negatively influencing the response to treatment of exudative AMD with antiangiogenic drugs.

**Key Words:** Complement factor H, age-related macular degeneration, choroidal neovascularization, pharmacogenetics, ranibizumab, bevacizumab.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

---

<b>AMD</b>	- <i>Age-related macular degeneration</i>
<b>ANCHOR</b>	- <i>Anti-VEGF Antibody for the Treatment of Predominantly Classic Choroidal Neovascularization in AMD</i>
<b>ANOVA</b>	- Análise de variância - <i>Analysis of Variance</i>
<b>ARMS2</b>	- Gene <i>Age related macular susceptibility 2</i>
<b>AV</b>	- Acuidade Visual
<b>C</b>	- Citosina
<b>C2</b>	- Proteína do complemento 2
<b>C3</b>	- Proteína do complemento 3
<b>CATT</b>	- <i>Comparison of AMD Treatments Trials</i>
<b>CBMEG</b>	- Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética
<b>CEP</b>	- Comitê de Ética em Pesquisa
<b>CFB</b>	- Fator do complemento B
<b>CFH</b>	- Fator do complemento H
<b>CRP</b>	- Proteína C reativa
<b>D0</b>	- Dia zero
<b>D7</b>	- Dia sete
<b>D28</b>	- Dia vinte e oito
<b>DMRI</b>	- Degeneração macular relacionada à idade
<b>DNA</b>	- Ácido desoxirribonucleico - <i>Deoxyribonucleic acid</i>
<b>dNTP</b>	- Desoxirribonucleotideo trifosfatado
<b>DP</b>	- Desvio padrão
<b>EDTA</b>	- Ácido etilendiaminotetraacético - <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
<b>EPR</b>	- Epitélio pigmentado da retina

<b>ERC</b>	- Espessura retiniana central
<b>ETDRS</b>	- <i>Early Treatment Diabetic Retinopathy Study</i>
<b>FB</b>	- Protease sérica fator B
<b>FD</b>	- Protease sérica fator D
<b>H</b>	- Histidina
<b>IBGE</b>	- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
<b>IVAN</b>	- <i>A randomised controlled trial of alternative treatments to Inhibit VEGF in age related choroidal Neovascularisation</i>
<b>logMAR</b>	- Logaritmo do mínimo ângulo de resolução
<b>MARINA</b>	- <i>Minimally Classic/Occult Trial of the Anti-VEGF Antibody Ranibizumab in the Treatment of Neovascular AMD</i>
<b>µg</b>	- Micrograma
<b>µL</b>	- Microlitro
<b>µmol</b>	- Micromol
<b>mg</b>	- Miligrama
<b>mL</b>	- Mililitro
<b>mm</b>	- Milímetros
<b>mmHg</b>	- Milímetros de mercúrio
<b>MNVS</b>	- Membrana neovascular sub-retiniana
<b>MPS</b>	- <i>Macular Photocoagulation Study</i>
<b>OCT</b>	- Tomografia de coerência óptica – <i>Optical coherence tomography</i>
<b>p</b>	- Probabilidade estatística
<b>PCR</b>	- Reação em cadeia da polimerase - <i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>PDT</b>	- Terapia fotodinâmica - <i>Photodynamic therapy</i>
<b>PIO</b>	- Pressão intraocular
<b>Pmol</b>	- Picomol

- PRN** - *Pro re nata*
- PrONTO** - *Prospective OCT Imaging of Patients with Neovascular AMD Treated with Intra-Ocular Lucentis*
- Rpm** - Rotações por minuto
- SNP** - Polimorfismo de nucleotídeo único - *Single nucleotide polymorphism*
- T** - Timina
- TAP** - *Treatment of Age-related Macular Degeneration with Photodynamic Therapy Study*
- UNICAMP** - Universidade Estadual de Campinas
- VEGF** - Fator de crescimento endotelial vascular - *Vascular endothelial growth factor*
- VIP** - *Verteporfin in Photodynamic Therapy Study*
- Y** - Tirosina



## LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1. Dados demográficos e fenótipos da DMRI da população estudada no ensaio de curto prazo .....	73
Tabela 2. Dados demográficos e fenótipos dos pacientes com DMRI exsudativa de acordo com o genótipo do gene <i>CFH</i> no ensaio de curto prazo ....	75
Tabela 3. Níveis descritivos do teste de perfil por contrastes da acuidade visual entre os tempos em cada genótipo .....	77
Tabela 4. Níveis descritivos do teste de perfil por contrastes da espessura retiniana central entre os tempos em cada genótipo .....	79
Tabela 5. Dados demográficos e fenótipos da DMRI da população estudada no ensaio de longo prazo .....	80
Tabela 6. Dados demográficos e fenótipos dos pacientes com DMRI exsudativa de acordo com o genótipo do gene <i>CFH</i> no ensaio de longo prazo ...	82
Tabela 7. Níveis descritivos do teste de perfil por contrastes da acuidade visual entre os tempos de acordo com a presença do alelo de risco .....	84
Tabela 8. Níveis descritivos do teste de perfil por contrastes da espessura retiniana central entre os tempos em cada genótipo .....	86



## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1. Projeção do contingente populacional, segundo a faixa etária, em anos, no Brasil, 2010 – 2050. Fonte: IBGE, 2008 .....	30
Figura 2. Eletroferograma do gene CFH demonstrando a troca da base nitrogenada T por C na posição 1277 .....	36
Figura 3. Impresso dos parâmetros obtido por meio do OCT Cirrus®. Os mapas apresentam as medidas de espessura retiniana, usando um código de cor e valores numéricos das medidas de espessura macular média (em micra) de cada setor.....	62
Figura 4. Técnica da injeção intravítrea de antiangiogênicos.....	63
Figura 5. Paciente portador de DMRI exsudativa submetido à injeção intravítrea de bevacizumabe, demonstrando redução da espessura retiniana progressivamente no sétimo e vigésimo oitavo dias de acompanhamento.....	78



## LISTA DE GRÁFICOS

---

Gráfico 1. Frequência dos genótipos do <i>CFH</i> na população do ensaio de curto prazo .....	74
Gráfico 2. Comparação da acuidade visual em logMAR de acordo com o genótipo do <i>CFH</i> e momento do seguimento em relação a injeção intravítrea de bevacizumabe. AV=acuidade visual.....	76
Gráfico 3. Comparação da medida de espessura retiniana central de acordo com o genótipo do <i>CFH</i> e momento do seguimento em relação à injeção intravítrea de bevacizumabe. ERC=espessura retiniana central.....	78
Gráfico 4. Frequência dos genótipos do <i>CFH</i> na população do ensaio de longo prazo.....	81
Gráfico 5. Comparação da acuidade visual em logMAR de acordo com o genótipo do <i>CFH</i> antes e ao final de um ano de acompanhamento. AV=acuidade visual.....	84
Gráfico 6. Comparação da medida de espessura retiniana central de acordo com o genótipo do <i>CFH</i> antes e ao final de um ano de acompanhamento. ERC=espessura retiniana central.....	85
Gráfico 7. Número de injeções intravítreas de acordo com o genótipo .....	86



RESUMO.....	xi
ABSTRACT .....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	xv
LISTA DE TABELAS .....	xix
LISTA DE FIGURAS .....	xxi
LISTA DE GRÁFICOS.....	xxiii
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>27</b>
1.1 Epidemiologia da degeneração macular relacionada à idade (DMRI) .....	29
1.2 Classificação da DMRI.....	31
1.3 Fisiopatologia da DMRI.....	32
1.4 Genética e DMRI .....	35
1.5 Tratamento da DMRI exsudativa .....	39
1.6 Farmacogenética da DMRI .....	44
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>49</b>
2.1 Objetivo geral.....	51
2.2 Objetivos específicos .....	51
<b>3. MÉTODOS .....</b>	<b>53</b>
3.1 Tipo de estudo .....	55
3.1.1 Pacientes .....	55
3.1.1.1 Critérios de inclusão .....	56
3.1.1.2 Critérios de exclusão .....	57
3.1.2 Aspectos éticos.....	58
3.2 Métodos .....	60
3.2.1 Métodos diagnósticos e terapêuticos.....	60
3.2.1.1 Ensaio de curto prazo .....	60
3.2.1.2 Ensaio de longo prazo.....	64
3.2.2 Avaliação genética.....	65
3.2.2.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR) .....	65
3.2.2.2 Reação de sequenciamento.....	66
3.2.2.3 Purificação da reação de sequenciamento .....	67
3.2.3 Análise estatística .....	68

<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>71</b>
4.1 Ensaio de curto prazo .....	73
4.1.1 Dados demográficos e clínicos dos indivíduos do estudo:.....	73
4.1.2 Avaliação da acuidade visual.....	75
4.1.3 Avaliação da espessura retiniana .....	77
4.2 Ensaio de longo prazo .....	79
4.2.1 Dados demográficos e clínicos dos indivíduos do estudo:.....	79
4.2.2 Avaliação da acuidade visual.....	83
4.2.3 Avaliação da espessura retiniana .....	85
4.2.4 Avaliação do número de injeções intravítreas.....	86
4.2.5 Avaliação da persistência de atividade de doença .....	87
4.2.6 Avaliação da percepção subjetiva de melhora de visão .....	87
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>89</b>
5.1 Genética e DMRI .....	91
5.2 Características gerais das amostras.....	92
5.3 Genética e efeitos funcional e morfológico precoce da injeção intravítrea de bevacizumabe .....	95
5.4 Genética e evolução a longo prazo da DMRI exsudativa em tratamento com antiangiogênicos .....	97
5.5 Considerações finais.....	100
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>103</b>
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>107</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>129</b>

# 1. INTRODUÇÃO



## 1.1 Epidemiologia da degeneração macular relacionada à idade (DMRI)

A DMRI é uma doença ocular degenerativa que afeta a região central da retina, denominada mácula, responsável pela visão de cores e detalhes. É caracterizada nas fases iniciais por alterações pigmentares da mácula e presença de drusas, sem comprometimento clinicamente significativo da função visual. Pode evoluir para formas extensas de atrofia geográfica ou formação de neovascularização coroidiana, exsudação sub-retiniana e cicatriz fibrótica macular com redução acentuada da visão central.<sup>1</sup> Os sintomas são descritos geralmente como distorção ou mancha escura na visão e se manifestam principalmente em atividades como leitura, direção de veículos, trabalhos manuais e identificação de rostos.<sup>2</sup>

A DMRI é a principal causa de cegueira legal em pacientes com mais de 50 anos de idade nos países desenvolvidos<sup>3,4</sup> e afeta cerca de 7,2 milhões de pessoas nos Estados Unidos.<sup>5</sup> Na população asiática, a prevalência de DMRI em indivíduos entre 40 e 79 anos foi estimada em 6,8%.<sup>6</sup> Na europeia, foi avaliada em 2,4% entre todas as idades, e em 4,8% nos maiores de 65 anos.<sup>7</sup> A incidência das fases iniciais de DMRI na população com mais de 50 anos é de 14,3% e das fases avançadas é de 3,1%, ao longo de 15 anos de acompanhamento.<sup>8</sup>

Os dados epidemiológicos sobre a DMRI no Brasil são escassos na literatura. Estudo transversal envolvendo 200 indivíduos acima de 55 anos no estado de Pernambuco encontrou uma frequência de DMRI de 23% a 30% das pessoas examinadas<sup>9</sup> e outro que incluiu 478 descendentes de japoneses acima de 60 anos no Paraná evidenciou sinais de DMRI em 15,1% dos indivíduos.<sup>10</sup>

A idade é o principal fator de risco para o desenvolvimento de DMRI, tendo sido demonstrado aumento da prevalência, partindo de 0% em pacientes com menos de 55 anos para 18,5% em maiores de 85 anos em uma população australiana<sup>11</sup> e uma razão de chances de 4,2 por década de vida em uma população europeia.<sup>12</sup> O crescente aumento da longevidade verificado nas últimas décadas contribuiu para o grande impacto desta doença no âmbito da saúde pública. No Brasil, o alargamento do topo da pirâmide etária pode ser observado pelo crescimento da participação relativa da população com 65 anos ou mais, que representava 4,8% em 1991, passando a 5,9% em 2000 e chegando a 7,4% em 2010.<sup>13</sup> A perspectiva de envelhecimento no Brasil nos próximos anos é maior do que em outros países, resultado da rápida mudança tanto da taxa de fecundidade quanto da expectativa de vida. (Figura 1).<sup>14</sup>

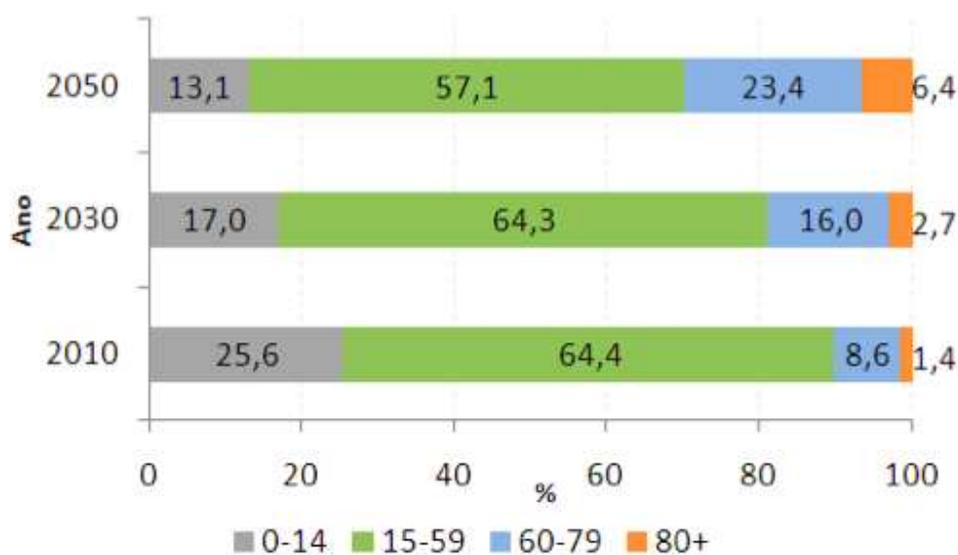


Figura 1. Projeção do contingente populacional, segundo a faixa etária, em anos, no Brasil, 2010 – 2050. Fonte: IBGE, 2008

O tabagismo foi demonstrado como fator de risco para desenvolvimento de DMRI em várias populações.<sup>15,16,17</sup> A chance de ocorrência de DMRI ao longo de 5

anos de acompanhamento é aumentada em 3,21 vezes em homens e em 2,2 vezes em mulheres tabagistas. A história progressiva de tabagismo também apresenta relação, embora menos significativa, com o desenvolvimento da doença.<sup>18</sup>

A DMRI manifesta-se com mais frequência em indivíduos brancos do que em indivíduos negros, numa razão de chances de 4,4, ajustando-se para os outros fatores de risco, como idade e tabagismo.<sup>19,20</sup> O sexo não parece ter influência sobre o surgimento da DMRI, embora alguma evidência sugira que mulheres tenham maior risco de apresentar a forma neovascular quando comparadas aos homens.<sup>12</sup>

## **1.2 Classificação da DMRI**

A DMRI é classificada em precoce, intermediária e avançada, e a última é dividida em atrofia geográfica e forma neovascular.<sup>21</sup> A forma neovascular ou DMRI exsudativa representa 10 a 20% dos casos de DMRI, mas é responsável por cerca de 80% dos casos de perda visual grave.<sup>22</sup>

A DMRI precoce é caracterizada pela presença de múltiplas drusas pequenas (menores que 63 micra) ou poucas médias (entre 63 e 124 micra) ou alterações pigmentares da mácula. A DMRI intermediária compreende os casos de múltiplas drusas médias ou pelo menos uma drusa grande (maior que 124 micra) ou atrofia geográfica poupando a região foveal. A DMRI avançada compreende a forma neovascular (DMRI exsudativa ou úmida) e a atrofia geográfica (DMRI não exsudativa ou seca).<sup>23</sup>

A forma neovascular é definida pela presença de pelo menos uma das seguintes características: descolamento do epitélio pigmentado da retina (EPR); hemorragias sub-retinianas ou sub-EPR; tecido glial ou cicatriz epirretiniana, intrarretiniana, sub-retiniana ou sub-EPR; exsudatos lipídicos duros relacionados aos achados anteriores e cicatrizes de fotocoagulação por DMRI. A forma de atrofia geográfica é definida por área de hipopigmentação e despigmentação ou aparente falta do EPR, envolvendo a região foveal, onde os vasos coroidianos são visíveis à fundoscopia numa área maior que 175 micra.<sup>24</sup>

A forma neovascular é classificada, de acordo com o aspecto à angiografia fluoresceínica, em clássica ou oculta.<sup>25</sup> A forma clássica se manifesta como uma área bem demarcada e uniforme de hiperfluorescência nas fases iniciais do exame que, durante as fases tardias, se expande além de seus limites iniciais, e é classificada como predominantemente clássica ou minimamente clássica quando, respectivamente, mais ou menos de 50% da lesão apresentam esse aspecto. A forma oculta se manifesta como um descolamento fibrovascular do EPR, representado por hiperfluorescência que aumenta progressivamente em intensidade, mantendo seus limites bem definidos, ou como um vazamento tardio de origem indeterminada, representado por uma hiperfluorescência de limites mal definidos nas fases tardias do exame.<sup>26</sup> As formas clássica e predominantemente clássica representam cerca de 30% dos casos recém-diagnosticados<sup>27</sup> e as formas minimamente clássica e oculta cerca de 70% dos casos.<sup>28</sup>

### **1.3 Fisiopatologia da DMRI**

A DMRI ocorre quando idade, predisposição genética e insulto do ambiente interagem para disparar uma sucessão de alterações degenerativas na mácula,

que se manifestam inicialmente pelo acúmulo de drusas e podem evoluir para atrofia geográfica ou neovascularização de coroide.<sup>29</sup>

As fases iniciais de DMRI são caracterizadas pelo depósito de lipídios na membrana de Bruch, possivelmente pela falha do EPR em processar os restos celulares associados com a degradação dos segmentos externos dos fotorreceptores. Esses depósitos levam ao surgimento das drusas, que são o sinal clínico mais precoce da instalação da DMRI.<sup>30</sup>

Em seguida, ocorre espessamento das camadas de colágeno da membrana de Bruch acompanhados de sua calcificação, degeneração de elastina e acúmulo de lipídios e proteínas exógenas, que podem causar fraturas na membrana.<sup>31</sup> Forma-se então uma barreira hidrofóbica que dificulta a passagem de fluido e nutrientes entre a coroide e a retina externa resultando em má nutrição relativa. Crescimento subsequente de neovascularização da coriocapilar pode então ocorrer entre fraturas da membrana de Bruch.<sup>32</sup>

O desenvolvimento da DMRI neovascular é dependente de estímulo angiogênico, representado principalmente pelo fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF),<sup>33</sup> produzido em resposta à má-nutrição e inflamação tecidual.<sup>34</sup> O VEGF, nas suas isoformas 121, 165 e 189, desempenha papel fundamental na formação de vasos anormais e no aumento da permeabilidade vascular em diversas condições patológicas.<sup>35</sup> Evidências clínicas recentes sugerem que os vasos da coroide são especialmente sensíveis a esses efeitos do VEGF.<sup>34</sup>

A progressão da DMRI é devida em parte a um estado inflamatório sustentado por atividade aberrante da via alternativa do complemento, sendo regulada por fatores pró-inflamatórios como a proteína do complemento 3 (C3) e

as proteases séricas fator B (FB) e fator D (FD), bem como anti-inflamatórios como o fator de complemento H (CFH), que é o principal inibidor da via alternativa do complemento, agindo como um regulador negativo desse complexo enzimático.<sup>36</sup>

Foram demonstrados níveis plasmáticos aumentados de C3, FB e FD e níveis reduzidos de CFH em pacientes com DMRI, quando comparados a casos controles.<sup>37</sup> Recentemente, demonstrou-se que a ativação aumentada da via alternativa do complemento no vítreo está relacionada a variações genéticas do gene que codifica o CFH.<sup>38</sup> Entretanto, não foi encontrada correlação entre os níveis plasmáticos de proteínas da via alternativa do complemento com os genótipos do CFH em pacientes com DMRI.<sup>39</sup>

O CFH é um componente do sistema imunológico que possui uma ação imunomoduladora sobre a resposta inflamatória. Tal ação ocorre através da regulação do sistema de complemento, que atua na proteção contra infecções atacando células displásicas e doentes e poupando as células saudáveis. A ativação do complemento ocorre por diferentes vias, as quais determinam a formação da enzima convertase C3 e subsequente ativação da resposta imune. O resultado final da ativação destas vias é a lise celular através da formação de complexo de ataque à membrana celular (C5b-9). O CFH presente nas células e no sistema circulatório regula a atividade do complemento, inibindo a ativação de C3 em C3a e C3b e inativando o C3b existente. Depósitos de componentes do sistema complemento, como o complexo C5b-9, e outros marcadores inflamatórios foram identificados em drusas e na coroide de pacientes com DMRI.<sup>40</sup>

#### 1.4 Genética e DMRI

Polimorfismos genéticos são variações das sequências de bases nitrogenadas do ácido desoxirribonucleico (DNA) que estão presentes em mais de 1% da população.<sup>41</sup> O polimorfismo mais comum relacionado à DMRI é a substituição de uma base na posição 1277 do gene *CFH*, na região 32 do braço longo do cromossomo 1 (1q32). Esse polimorfismo de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphism*, SNP) consiste na troca de timina (T) por citosina (C) neste nucleotídeo (Figura 2). Tal mudança leva à produção de uma sequência diferente de polipeptídeos, acarretando a troca do aminoácido histidina (H) no lugar de uma tirosina (Y) no códon 402. Esta mudança da base nitrogenada é expressa como 1277 T > C ou T1277C e a alteração do aminoácido como Y402H.

**GATGCAGTACAGCCA**

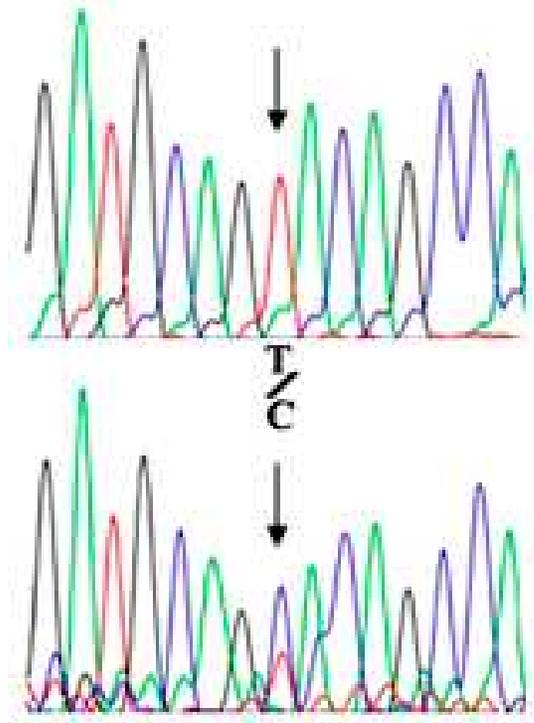


Figura 2. Eletroferograma do gene *CFH* demonstrando a troca da base nitrogenada T por C na posição 1277

O polimorfismo Y402H situa-se no domínio SCR7 da proteína CFH, uma região implicada como um local de ligação para a heparina e a proteína C-reativa (CRP).<sup>42</sup> A ligação da CRP e heparina altera a capacidade do CFH de regular negativamente o efeito do complemento, e foi proposto que a substituição de aminoácido na posição 402 pode afetar estas propriedades de ligação, com implicações funcionais. Por exemplo, o polimorfismo Y402H pode alterar a capacidade do CFH em suprimir o excesso de ativação do complemento, ocasionando lesão vascular.<sup>43</sup>

A contribuição da hereditariedade para a susceptibilidade à DMRI foi descrita há décadas, através da ocorrência maior da doença entre gêmeos monozigóticos comparada a gêmeos dizigóticos.<sup>44</sup> Diversos polimorfismos foram relacionados à incidência aumentada da DMRI,<sup>45</sup> sendo que um dos mais importantes até o momento ocorre no gene *CFH*, demonstrado em diversas populações.<sup>46</sup>

Na população americana, a razão de chance para DMRI foi de 4,6 para a presença de apenas um alelo C (heterozigoto) e de 7,4 para a presença de dois alelos C (homozigoto) no gene *CFH* para a variante (SNP) T1277C.<sup>40</sup> Em uma amostra de população russa, a razão de chance foi 2,7 para homozigotos,<sup>47</sup> em outro com população italiana foi de 4,6,<sup>48</sup> enquanto entre franceses, este fator foi de 3,0 para um alelo e 6,9 para dois alelos.<sup>49</sup> Na população chinesa, foi de 4,4 para homozigotos,<sup>50</sup> enquanto na Índia foi de 11,5,<sup>51</sup> e em Israel, 1,9 para um alelo e 3,4 para dois alelos.<sup>52</sup>

No Brasil, estudo semelhante demonstrou que homozigose para o alelo de risco do gene *CFH* foi encontrado em 33,3% dos pacientes com DMRI e 10,1% dos controles e conferia uma razão de chance de 7,9 para desenvolvimento de DMRI, enquanto heterozigose conferia uma razão de chance de 2,7.<sup>53</sup>

Além da variante T1277C, foram descritos SNPs no exon 2 do gene *CFH*, caracterizados pela substituição de isoleucina por valina na posição 62 (I62V) e pela variante D936E. Essas mudanças podem contribuir para o desenvolvimento de DMRI, afetando a função do CFH através de variabilidades nos níveis de expressão, eficiência de ligação e outras propriedades, e influenciar na ativação da via alternativa do complemento.<sup>54</sup>

Um segundo gene de susceptibilidade identificado é o LOC387715, localizado no cromossomo 10q26, também conhecido como *age related macular susceptibility 2* (ARMS2). A variante de risco para desenvolvimento da DMRI neste gene consiste na substituição do aminoácido alanina da posição 69 por serina (A69S).<sup>55</sup> Evidenciou-se que a associação de uma ou duas cópias do alelo de risco aumenta em cinco vezes a chance de desenvolvimento de DMRI na população americana.<sup>56</sup> Em uma avaliação da população brasileira, a homozigose para o alelo de risco do LOC387715 foi identificada em 23,6% dos pacientes com DMRI e 7,2% dos controles e conferia razão de chances de 5,6 para desenvolvimento de DMRI.<sup>53</sup>

O gene do VEGF, localizado na região 21 do braço curto do cromossomo 6 (6p21), codifica a principal proteína no controle da angiogênese e também foi relacionado com o desenvolvimento de DMRI. Um estudo europeu evidenciou que o genótipo TT na posição 674 do gene do VEGF conferia risco de 2,4 para desenvolvimento de DMRI.<sup>57</sup> Entre brasileiros, foi observada prevalência de 18,1% de homozigose para o alelo T do gene do VEGF nos pacientes com DMRI e de 5,8% entre controles e uma razão de chances de 3,6 para indivíduos homozigotos e 1,5 para heterozigotos de desenvolvimento de DMRI.<sup>58</sup>

Outros genes que também tiveram associação com a susceptibilidade para DMRI identificada foram o gene do fator de complemento B (CFB),<sup>59</sup> do componente do complemento 2 (C2),<sup>60</sup> e do receptor de quimioquina CX3C (CX3CR1).<sup>61</sup>

## 1.5 Tratamento da DMRI exsudativa

A descrição do envolvimento de fatores angiogênicos no surgimento de neovasos retinianos<sup>62</sup> e da coróide<sup>63</sup> em estudos experimentais, estimulou a pesquisa e a utilização de drogas antiangiogênicas no tratamento da forma neovascular da DMRI. A partir de 2006, novas terapias concentraram-se em interferir na atuação do VEGF em olhos com DMRI exsudativa.<sup>64</sup>

No passado, a fotocoagulação retiniana e a terapia fotodinâmica (PDT) foram amplamente utilizadas no tratamento da DMRI exsudativa.<sup>65</sup> Como demonstrado no *Macular Photocoagulation Study* (MPS), a fotocoagulação retiniana com laser térmico de membranas neovasculares sub-retinianas (MNVSR) subfoveais causava perda visual imediata associada com benefício moderado demonstrado com o acompanhamento a longo prazo.<sup>66</sup> O PDT envolve o uso de fototrombose orientada seletivamente a destruir a MNVSR, sem lesar concomitantemente a estrutura da retina, através da ativação de verteporfina, que causa oclusão da neovascularização sub-retiniana por trombose dos capilares neoformados. Como foi demonstrado no *Treatment of Age-related Macular Degeneration with Photodynamic Therapy Study* (TAP), pacientes com MNVSR predominantemente clássicas apresentavam menor perda visual após um ano de tratamento com PDT, com 67%, versus 39% do grupo controle, apresentando perda visual menor que 15 letras de acuidade visual medida conforme o proposto pelo *Early Treatment Diabetic Retinopathy Study* (ETDRS).<sup>67</sup> Essa tendência se manteve no acompanhamento de dois anos.<sup>68</sup> Entretanto não houve ganho de acuidade visual, apenas redução da extensão de sua perda.<sup>69</sup> Pacientes com MNVSR ocultas tiveram a eficácia do PDT avaliada através do *Verteporfin in Photodynamic Therapy Study* (VIP). Neste estudo, após um ano de

acompanhamento, os pacientes tratados não evoluíram melhor que os controles mas, após dois anos, foi detectado que 55% dos tratados apresentaram perda visual maior ou igual a 15 letras de ETDRS, versus 68% do grupo controle, uma diferença estatisticamente significativa em favor do grupo tratado.<sup>68</sup>

Os antiangiogênicos inibidores do VEGF trouxeram avanços na estratégia terapêutica de tratamento da MNVSR da DMRI.<sup>70</sup> O bevacizumabe (Avastin, Genentech Inc., South San Francisco, CA, EUA) é um anticorpo monoclonal humanizado que se liga a todas as isoformas do VEGF-A, e foi aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos da América em 2004 para o tratamento intravenoso de câncer colorretal metastatizado.<sup>71</sup>

Foi observado que pacientes tratados sistemicamente com administração endovenosa na dose de 5mg/kg, com intervalos bissemanais, e que tinham DMRI exsudativa, apresentavam melhora da acuidade visual. Entretanto, apresentavam risco pequeno, mas significativo, de eventos tromboembólicos (acidente vascular cerebral e infarto do miocárdio).<sup>72</sup>

O uso intravítreo de bevacizumabe foi descrito pela primeira vez em 2005.<sup>73</sup> Esta via de administração permite que a dose seja 1/300 a 1/400 da dose empregada sistemicamente, minimizando efeitos colaterais sistêmicos.<sup>74</sup> Embora não seja aprovado pelo FDA para uso intraocular, muitos estudos demonstraram sua eficácia na estabilização, melhora da acuidade visual<sup>75</sup> e redução do espessamento da retina em pacientes com a forma neovascular da DMRI.<sup>76</sup>

O ranibizumabe (Lucentis, Novartis, South San Francisco, CA, EUA) é um fragmento do anticorpo monoclonal humanizado bevacizumabe. Este fragmento recombinante consiste em duas partes: uma sequência humana não ligante que

confere ao anticorpo menor antigenicidade e um epitopo ligante de alta afinidade derivado de camundongo que serve para ligação ao antígeno. O ranibizumabe liga-se a todas as isoformas de VEGF-A e inibe a interação entre o peptídeo VEGF e seus receptores.<sup>77</sup>

Sua eficácia no tratamento da forma neovascular da DMRI, nas formas minimamente clássica e oculta, foi demonstrada no estudo MARINA (*Minimally Classic/Occult Trial of the Anti-VEGF Antibody Ranibizumab in the Treatment of Neovascular AMD*). Nesse estudo multicêntrico de fase III, injeções intravítreas mensais de ranibizumabe resultaram em melhora da acuidade visual média durante o primeiro ano. Aproximadamente 95% dos pacientes recebendo ranibizumabe evitaram perda visual de 15 letras de ETDRS, comparados a 62,2% do grupo controle em um ano.<sup>78</sup> Em 2 anos, esses valores foram respectivamente 90% e 52,9%. Além disso, o grupo tratado teve um ganho visual médio em torno de 5 letras, enquanto o grupo controle teve um perda em média de 15 letras.<sup>79</sup>

Sua eficácia no tratamento da forma neovascular da DMRI, na forma predominantemente clássica, foi demonstrada no estudo ANCHOR (*Anti-VEGF Antibody for the Treatment of Predominantly Classic Choroidal Neovascularization in AMD*), no qual pacientes recebendo injeções intravítreas mensais de ranibizumabe foram comparados a um grupo controle recebendo PDT. Em 1 ano, 96,4% do grupo ranibizumabe versus 64,3% do grupo controle tiveram perda visual menor que 15 letras. Além disso, 40,3% do grupo ranibizumabe versus 5,6% do grupo controle tiveram um ganho visual maior que 15 letras e o grupo ranibizumabe teve um ganho visual médio de 11,3 letras, enquanto o grupo controle teve uma perda visual média de 9,5 letras.<sup>80</sup> Em 2 anos, 90% do grupo ranibizumabe evitou a perda visual maior que 15 letras versus 65,7% do grupo

controle. Além disso, 34% do grupo ranibizumabe versus 6,3% do grupo controle tiveram um ganho visual maior que 15 letras e o grupo ranibizumabe teve um ganho visual médio de 8,1 letras, enquanto o grupo controle teve uma perda em média de 9,8 letras.<sup>81</sup>

Outro angiogênico disponibilizado recentemente para o tratamento da DMRI exsudativa é o aflibercept, que apresentou nos estudos eficácia não inferior e clinicamente equivalente ao ranibizumabe, quanto à alteração média na acuidade visual e também produziu melhorias semelhantes nas medidas anatômicas. Eventos adversos oculares e sistêmicos também foram semelhantes entre os grupos de tratamento.<sup>82</sup>

A utilização de antiangiogênicos em regime mensal mostrou-se difícil na prática clínica, o que motivou estudos que avaliaram a eficácia de regimes com menor número de doses. O estudo PrONTO (*Prospective OCT Imaging of Patients with Neovascular AMD Treated with Intra-Ocular Lucentis*) avaliou pacientes submetidos a três injeções mensais de ranibizumabe seguidos de retratamento *pro re nata* (PRN), ou seja, de acordo a necessidade definida pela presença de sinais de atividade de doença, como aumento da espessura retiniana, presença de líquido sub ou intrarretiniano e perda visual. Os resultados obtidos com esse regime de dose variável guiado por tomografia de coerência óptica (OCT) são semelhantes aos dos estudos com regime mensal e menos injeções são necessárias.<sup>83</sup>

O regime de tratamento PRN também foi avaliado no estudo SUSTAIN (*Safety and efficacy of a flexible dosing regimen of ranibizumab in neovascular age-related macular degeneration*) que evidenciou uma melhora de 3,6 letras ao

longo de um ano de acompanhamento de indivíduos com DMRI exsudativa que receberam em média 5,7 injeções de ranibizumabe.<sup>84</sup>

Vários estudos avaliaram a eficácia do tratamento da DMRI exsudativa com bevacizumabe e compararam com os resultados obtidos com ranibizumabe. No estudo IVAN (*A randomised controlled trial of alternative treatments to Inhibit VEGF in Age-related choroidal Neovascularisation*), os pacientes foram randomizados para receber tratamento com ranibizumabe ou bevacizumabe, em regime mensal ou de acordo com a necessidade. A avaliação de não-inferioridade de alguma das duas drogas foi inconclusiva e a comparação entre os dois regimes de tratamento evidenciou uma equivalência entre ambos.<sup>85</sup>

O estudo CATT (*Comparison of AMD Treatments Trials*) evidenciou que, ao final de um ano de acompanhamento, o bevacizumabe administrado mensalmente é equivalente ao ranibizumabe administrado da mesma forma, com 8 e 8,5 letras de ganho visual respectivamente, que o ranibizumabe conforme a necessidade é equivalente ao regime mensal, mas que a comparação entre o bevacizumabe mensal e conforme a necessidade é inconclusiva.<sup>86</sup> Ao final de dois anos de acompanhamento, o ganho médio de acuidade visual foi similar entre as duas medicações, mas o ganho foi maior no regime mensal do que no de acordo com a necessidade.<sup>87</sup>

A melhora da acuidade visual no tratamento da DMRI exsudativa com inibidores do VEGF se correlaciona com a recuperação da acuidade visual de leitura e velocidade de leitura.<sup>88</sup> Além disso, também corresponde à percepção subjetiva de melhora, tendo sido evidenciado em estudo prospectivo que 68% dos pacientes haviam percebido melhora de visão, 21% referiam ausência de

mudança, e 11% piora ao longo de quatro meses de tratamento em regime PRN com ranibizumabe.<sup>89</sup>

## 1.6 Farmacogenética da DMRI

Uma variação genética pode influenciar a eficácia de determinada droga através de variabilidade farmacocinética ou farmacodinâmica. Na primeira, a variabilidade da disposição da droga nas moléculas alvo sofre influência da absorção, distribuição, metabolismo, eliminação, além do tráfego intracelular e regulação da expressão gênica, como, por exemplo, na eliminação de drogas por N-acetilação regulada por variações genéticas.<sup>90</sup> Na segunda, indivíduos com a mesma concentração tecidual da droga apresentam respostas distintas por variabilidades do receptor molecular da droga ou por interações com moléculas após a ação no receptor, como, por exemplo, na eficácia dos betabloqueadores para insuficiência cardíaca em indivíduos homocigotos para uma deleção do gene da enzima conversora de angiotensina.<sup>91</sup>

Além disso, as variações genéticas podem prever a gravidade ou persistência de uma doença e seu comportamento durante o tratamento. Uma análise prospectiva demonstrou que os polimorfismos do gene *CFH* e *ARMS2* são independentemente relacionados à progressão dos estágios precoces para os avançados de DMRI, com razão de chances de 2,6 para o *CFH* e 4,1 para o *ARMS2*.<sup>92</sup> Na avaliação farmacogenética dos efeitos do tratamento com suplementação vitamínica em pacientes com DMRI seca foi notada uma progressão de doença maior em indivíduos homocigotos para o alelo de risco e foi presumido que indivíduos com alelos de risco do *CFH* tem uma doença mais

grave que está menos sujeita à influência do efeito benéfico discreto da suplementação vitamínica.<sup>93</sup>

Uma resposta inflamatória inadequada que inclui uma ativação inapropriada do sistema de complemento tem sido implicada na patogenia da DMRI e pode contribuir para a evolução da doença durante o tratamento. O polimorfismo tirosina-histidina está localizado na região do *CFH* que se liga à heparina e à proteína C reativa (CRP) e foi demonstrado que níveis séricos elevados da CRP estão associados com a doença.<sup>94</sup>

Os estudos que previamente avaliaram a relação dos genótipos do *CFH* e a resposta ao tratamento da DMRI exsudativa com PDT,<sup>95,96</sup> bevacizumabe<sup>97</sup> e ranibizumabe<sup>98,99</sup> apresentaram resultados conflitantes.

Foi demonstrado em população americana de origem caucasiana que pacientes com DMRI exsudativa homozigotos para o alelo de risco representado pela mudança tirosina por histidina na posição 402 do *CFH* (genótipo CC) apresentam uma resposta significativamente melhor ao tratamento com PDT que aqueles com genótipos TC ou TT. Essa diferença foi mais significativa no grupo de pacientes com lesões neovasculares sub-retinianas predominantemente clássicas, do que no grupo com lesões ocultas.<sup>95</sup> Já um estudo envolvendo outra população caucasiana, de origem inglesa, sugeriu uma associação dos genótipos CC e CT com uma maior perda visual após PDT.<sup>96</sup> Em estudo realizado em Israel, a mesma variação genotípica confirmou seu papel como fator de risco para DMRI, mas não apresentou correlação com a resposta ao tratamento com PDT.<sup>52</sup> Na população finlandesa, o genótipo do *CFH* também não foi capaz de prever a resposta ao PDT na DMRI exsudativa.<sup>100</sup>

Diferenças na resposta ao tratamento com bevacizumabe também foram demonstradas. Na população americana, foram avaliados pacientes com DMRI exsudativa submetidos a injeções intravítreas de bevacizumabe, e evidenciado que indivíduos homozigotos para o alelo de risco apresentaram uma resposta significativamente pior que aqueles com genótipos TC ou TT. Com o tratamento, a AV média melhorou de 20/248 para 20/166 para o grupo TT e de 20/206 para 20/170 para o grupo TC, mas caiu de 20/206 para 20/341 no grupo CC.<sup>97</sup> Essa diferença de resultados quanto à AV final também ocorreu em um estudo envolvendo a população austríaca<sup>101</sup> e a população chinesa,<sup>102</sup> apesar de não ter havido diferença quanto à redução da espessura retiniana central com o tratamento.

Um estudo realizado na Suíça, com pacientes tratados com ranibizumabe, ratificou os resultados encontrados com bevacizumabe, com uma pior resposta em indivíduos com os dois alelos mutantes, sugerindo um efeito de pior prognóstico para o genótipo CC.<sup>103</sup> Estudo em população americana mostrou que os três genótipos responderam de forma semelhante ao tratamento, quanto à acuidade visual final, mas pacientes com genótipo CC receberam em média uma injeção a mais ao longo do tratamento e apresentaram um risco 37% maior de necessitarem de injeções adicionais de ranibizumabe.<sup>98</sup>

Um outro estudo demonstrou um efeito inverso, sugerindo um efeito protetor do genótipo CC. Uma população inglesa, também submetida a três injeções iniciais de ranibizumabe seguidas de outras de acordo com a necessidade, apresentou uma melhora de AV em letras de ETDRS em 6 meses de acompanhamento de 1,6 para o grupo TT, 5,9 e 7,2 para os grupos TC e CC, respectivamente.<sup>99</sup>

Um estudo prospectivo randomizado confirmou a influência dos genótipos do *CFH* quanto a um maior número de injeções de ranibizumabe durante o tratamento, assim como demonstrou que a acuidade visual final foi menor no grupo de pacientes apresentando alelos de risco<sup>104</sup> e uma meta-análise envolvendo dez estudos num total de 1510 indivíduos evidenciou que indivíduos homocigotos CC estavam associados a uma resposta reduzida ao tratamento da DMRI exsudativa numa razão de chances de 1,68.<sup>105</sup>

Entretanto, essa associação não foi confirmada por outro estudo envolvendo pacientes submetidos ao tratamento com ranibizumabe e/ou bevacizumabe, três injeções mensais seguidas de reinjeções de acordo com a necessidade. Entre os diferentes genótipos, a parcela de pacientes que apresentou manutenção ou melhora da AV não diferiu da que manifestou piora ao longo do tratamento.<sup>106</sup>

Além disso, a correlação entre genótipos e os resultados do tratamento dos indivíduos incluídos no estudo CATT não encontrou valor preditivo da resposta no gene *CFH*.<sup>107</sup>

Apesar dos progressos alcançados, um melhor entendimento do impacto dos diferentes fatores no sucesso do tratamento ainda não está claro, em parte devido ao fato das hipóteses serem testadas em diferentes populações. Estas diferenças podem ser secundárias a uma relação farmacogenética com as drogas avaliadas ou a condições intrínsecas da DMRI associadas às variantes genéticas do gene *CFH*.

A população brasileira apresenta um padrão genético próprio, como já observado em outras afecções oculares.<sup>108,109</sup> Ainda não foram publicados

estudos avaliando a associação desses genótipos com a resposta ao tratamento da DMRI em nossa população. Estabelecer esta associação na população brasileira poderá contribuir para as decisões terapêuticas e de seguimento de pacientes com DMRI em nosso meio.

O estudo da associação dos genótipos do *CFH* com a resposta ao tratamento da DMRI com bevacizumabe e ranibizumabe poderá resultar em achados farmacogenéticos que permitirão orientar os critérios de elegibilidade para tratamento de maneira individualizada, otimizando os resultados e minimizando a carga socioeconômica do tratamento da DMRI.

## **2. OBJETIVOS**



Baseando-se na fisiopatologia da DMRI exsudativa, nos efeitos das variantes do polimorfismo Y402H do gene *CFH* e nos mecanismos de ação dos antiangiogênicos intravítreos, os presentes estudos têm como objetivos:

## **2.1 Objetivo geral**

Avaliar a relação entre as variantes do polimorfismo Y402H do gene *CFH* com a resposta ao tratamento da DMRI com antiangiogênicos.

## **2.2 Objetivos específicos**

Comparar os efeitos sobre acuidade visual e espessura retiniana central a curto prazo do bevacizumabe intravítreo em pacientes recém diagnosticados com DMRI exsudativa com as variantes do polimorfismo Y402H.

Comparar a evolução a longo prazo de pacientes com DMRI exsudativa previamente submetidos ao tratamento com antiangiogênicos com as variantes do polimorfismo Y402H, quanto à acuidade visual, espessura retiniana central, número de injeções intravítreas, persistência de atividade neovascular e percepção subjetiva de melhora.



## 3. MÉTODOS



### **3.1 Tipo de estudo**

Foram realizados dois estudos: um ensaio prospectivo de curto prazo e um ensaio retrospectivo de longo prazo, ambos intervencionais abertos não controlados, envolvendo portadores de DMRI exsudativa, que preencheram os critérios de inclusão e exclusão do estudo e se dispuseram a participar da pesquisa, constituindo-se em amostragens não probabilísticas.

#### **3.1.1 Pacientes**

Para o estudo de curto prazo, foram selecionados pacientes atendidos nos ambulatórios de Oftalmologia do Hospital Federal dos Servidores do Estado e da Clínica São Vicente, do Rio de Janeiro, consecutivamente recém-diagnosticados com DMRI exsudativa, no período de janeiro de 2010 a dezembro de 2012. Esses indivíduos foram submetidos a injeção intravítrea de 1,25 mg de bevacizumabe e avaliados prospectivamente em uma e quatro semanas após o procedimento, quanto à correlação entre a resposta ao procedimento e a genotipagem do *CFH*.

No estudo de longo prazo, foram incluídos pacientes acompanhados nos ambulatórios de Oftalmologia do Hospital Federal dos Servidores do Estado e da Clínica São Vicente, do Rio de Janeiro, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, e do Hospital Monte Sinai, de Juiz de Fora, Minas Gerais, no período de janeiro de 2008 a dezembro de 2012, que haviam sido previamente submetidos a tratamento para DMRI exsudativa com bevacizumabe ou ranibizumabe no regime PRN. Eles tiveram seus prontuários e

exames retrospectivamente avaliados, quanto à correlação entre a evolução ao longo de um ano de acompanhamento e o genótipo do *CFH*.

### **3.1.1.1 Critérios de inclusão**

Os pacientes foram elegíveis para participar de algum dos estudos se todos os critérios abaixo estivessem presentes no olho do estudo no momento imediatamente antes do início do tratamento.

1. Indivíduos com 50 anos ou mais;
2. Apresentar MNVSR secundária a DMRI de qualquer subtipo angiográfico (clássico, predominantemente clássico, minimamente clássico, ou oculto);
3. Apresentar MNVSR ativa (incluindo tanto o componente clássico quanto o oculto) no olho do estudo que englobe, pelo menos, 50% da área total da lesão (incluindo sangue, atrofia e cicatriz);
4. Apresentar OCT evidenciando líquido sub-retiniano ou sub-EPR, espessamento retiniano ou descolamento do EPR em região macular;
5. Apresentar um tamanho total da lesão no olho do estudo que seja menor que 12 áreas de disco;
6. Apresentar a melhor acuidade visual corrigida entre 20/40 e 20/800 (equivalente Snellen) no olho do estudo;
7. Fornecer o consentimento livre e esclarecido por escrito;
8. Ser capaz de aderir a todos os procedimentos do estudo.

### 3.1.1.2 Critérios de exclusão

O paciente não foi selecionado se qualquer dos seguintes itens estivesse presente no olho do estudo ou em nível sistêmico:

1. Fibrose ou atrofia da fóvea;
2. Hemorragia sub-retiniana que envolva a fóvea ou maior que 50% ou mais da área total da lesão;
3. Ruptura de EPR envolvendo a mácula;
4. Retinopatia diabética ou hemorragia vítrea;
5. Pressão intraocular maior que 30 mmHg apesar de tratamento com medicações hipotensoras oculares;
6. Presença de anormalidades oftalmológicas significativas que impeçam a avaliação retiniana, incluindo opacidades dos meios (por ex.: catarata) e dilatação pupilar inadequada;
7. Presença de glaucoma de ângulo estreito, oclusão vascular retiniana, membrana epirretiniana, inflamação intraocular ou infecção periocular ou outras condições com probabilidade de afetar significativamente a acuidade visual durante o período do estudo;
8. Presença de proliferação angiomasosa retiniana, vasculopatia polipoidal de coróide ou MNVSR de outras etiologias, incluindo miopia patológica (equivalente esférico de oito dioptrias ou mais, ou extensão axial maior que 25 mm), síndrome de histoplasiose ocular presumível, trauma, estrias angioides, ruptura coroidal, ou coroidite multifocal;

9. Histórico de qualquer cirurgia intraocular (incluindo cirurgia de catarata) no período de 3 meses antes da entrada no estudo;

10. Histórico de tratamentos seguintes para DMRI no período de seis meses antes do início do seguimento incluindo laser térmico, terapia anti-VEGF, corticosteroides intraocular ou intravítreo, PDT com verteporfina, radioterapia com feixe externo (na região do olho do estudo), termoterapia transpupilar, ou quaisquer terapias experimentais;

11. Histórico de alergia à fluoresceína, não sensível ao tratamento com difenidramina;

12. Histórico de doença renal ou hepática clinicamente significativa ou qualquer outra condição médica concomitante que pudesse afetar de maneira adversa a capacidade do paciente para completar o estudo, ou que poderia afetar a interpretação dos resultados do estudo, incluindo, mas não se limitando a: malignidade (exceto carcinoma de célula basal), condições neurodegenerativas crônicas, tais como Mal de Alzheimer, doença cardiovascular ativa ou instável (p.ex.: hipertensão não controlada, angina instável, infarto do miocárdio, ataque isquêmico transitório ou acidente vascular cerebral dentro de quatro meses da inclusão no estudo), ou doença autoimune crônica;

17. Qualquer tratamento com um agente sob investigação nas últimas 12 semanas para qualquer condição.

### **3.1.2 Aspectos éticos**

Este estudo foi submetido à apreciação da Comissão de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP e aprovado, sob o Protocolo de Pesquisa no

310/05 (Anexo A). Todos os pacientes preencheram os critérios de inclusão e de exclusão e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo B).

Os pacientes selecionados para o estudo receberam explicação completa, pormenorizada e em linguagem acessível sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos e benefícios previstos, podendo ou não aceitar participar da mesma, sem constrangimento ou modificação em sua assistência médica.

Após a informação, através da qual os pacientes souberam que seriam realizados procedimentos que não fazem parte da rotina atual do serviço, aqueles que aceitaram participar do estudo assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, autorizando sua participação voluntária na pesquisa. Todos os sujeitos da pesquisa puderam retirar seu consentimento, em qualquer fase do estudo, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu atendimento médico.

Nas coletas de sangue, foi retirada quantidade (5 a 10 ml) não prejudicial à saúde do paciente. O material biológico (sangue) coletado foi armazenado no Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) – UNICAMP e utilizado exclusivamente para a finalidade prevista nesta pesquisa.

Não houve necessidade de mudança da rotina dos pacientes, nem ônus para os mesmos. A identidade de todos os pacientes foi mantida em sigilo. Foram respeitados os princípios enunciados no Código de Ética Médica e na Declaração de Helsinque.

## **3.2 Métodos**

### **3.2.1 Métodos diagnósticos e terapêuticos**

Todos os pacientes foram entrevistados por meio de questionário estruturado para obtenção de informações sobre idade, sexo, etnia, tempo do início dos sintomas, olho acometido, histórico ocular e sistêmico pregresso, história familiar de DMRI e história pessoal, incluindo tabagismo e uso de suplementação vitamínica. (Anexo C)

Todas as variáveis coletadas foram comparadas ao genótipo do *CFH* (CC, CT ou TT). Houve mascaramento dos investigadores em relação aos genótipos durante a coleta dos dados e análise estatística.

#### **3.2.1.1 Ensaio de curto prazo**

Todos os participantes do ensaio prospectivo foram submetidos à medida da acuidade visual após refração a quatro metros utilizando-se a tabela do ETDRS, biomicroscopia e fundoscopia. A fundoscopia foi realizada com lâmpada de fenda e lente positiva de 78 ou 90 dioptrias.

Os pacientes foram submetidos a exames de retinografia e angiografia fluoresceínica, sendo realizados após dilatação pupilar com instilação de 3 gotas de tropicamida 1%, num intervalo de 5 minutos entre as instilações. Realizou-se a injeção de 5 ml de fluoresceína sódica endovenosa a 10%. Nos casos de MNVSR ocultas, o exame foi complementado com angiografia com indocianina verde, com injeção de 25 mg de indocianina verde diluídos em 2 ml de solvente aquoso e as imagens foram obtidas até 30 minutos após a administração do corante.

O acesso venoso (veia cubital) era mantido com cateter hidrolisado até o término do exame, para tratar possíveis reações adversas, sendo verificada alguma sintomatologia do paciente antes de retirar o acesso venoso.

Os indivíduos incluídos no estudo foram submetidos ao exame de OCT de alta resolução com o aparelho Cirrus® (Carl Zeiss Meditec, Dublin, CA, USA), ou Spectralis® (Heidelberg Engineering, Heidelberg, Germany), respeitando o mesmo aparelho nos exames subsequentes. Inicialmente, os pacientes tiveram as pupilas dilatadas de forma similar para realização das imagens fotográficas, sendo posicionados confortavelmente sentados em frente ao aparelho, com mento e região frontal bem encostados. O módulo foi alinhado de forma que a lente ficasse no eixo óptico do olho a ser examinado. Cada paciente foi orientado a fixar o alvo interno do aparelho no centro da tela. A fixação do paciente e a localização da varredura do tomógrafo foram monitoradas por imagem na tela do computador, mostrada durante o exame.

As aquisições das imagens foram obtidas por meio do protocolo de medidas de espessura retiniana, no centro da fóvea, quando a depressão foveal era visível e foram submetidas a correção manual de segmentação e centralização. O cálculo das medidas de espessura retiniana foi obtido automaticamente pelo aparelho, o qual considera a distância entre a relação interface vítreo-retiniana e a superfície anterior do EPR e a estratégia para análise quantitativa foi o mapa de espessura macular que analisa os mapas circulares de cada olho centralizado na mácula e apresenta como resultados a espessura e volume retiniano (Figura 3).

Name:



ID: CZM1606819405

Exam Date: 5/10/2012

DOB: 3/11/1933

Exam Time: 9:26 AM

Gender: Unknown

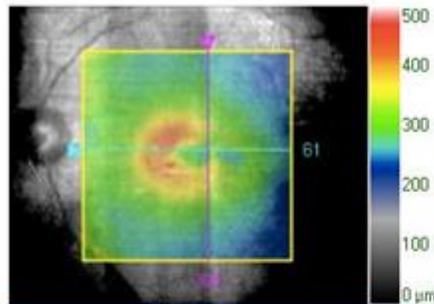
Technician: Operator, Cirrus

Doctor:

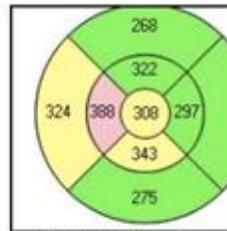
Signal Strength: 3/10

### Macula Thickness : Macular Cube 512x128

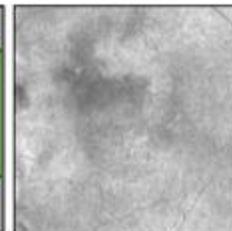
OD  OS



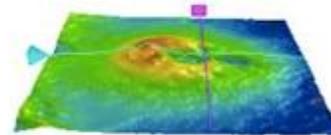
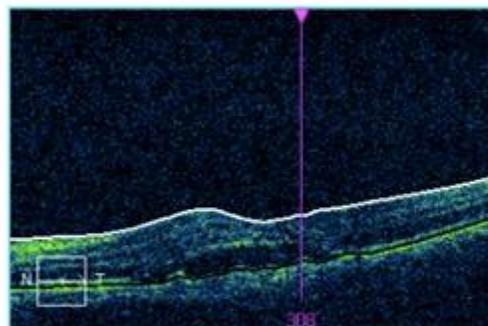
Overlay: ILM - RPE Transparency: 50 %



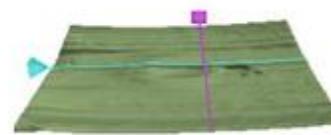
ILM-RPE Thickness ( $\mu\text{m}$ )



Fovea: 308, 61



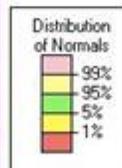
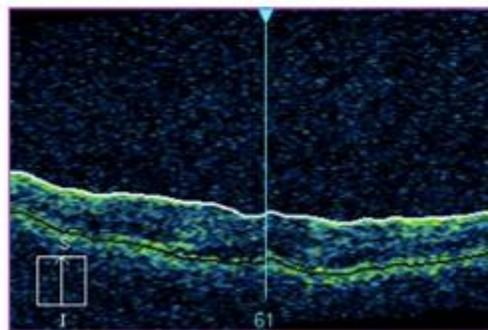
ILM - RPE



ILM



RPE



	Central Subfield Thickness ( $\mu\text{m}$ )	Cube Volume ( $\text{mm}^3$ )	Cube Average Thickness ( $\mu\text{m}$ )
ILM - RPE	308	10.5	292

Comments

Doctor's Signature

SW Ver: 5.1.1.6  
Copyright 2010  
Carl Zeiss Medtec, Inc  
All Rights Reserved  
Page 1 of 1

Figura 3. Impresso dos parâmetros obtido por meio do OCT Cirrus®. Os mapas apresentam as medidas de espessura retiniana, usando um código de cor e valores numéricos das medidas de espessura macular média (em micra) de cada setor.

A injeção intravítrea de bevacizumabe ou ranibizumabe foi realizada nas instalações das instituições envolvidas na pesquisa. Após anestesia tópica com colírio de tetracaína, realizou-se antissepsia da pele com solução de iodo povidona e colocou-se o blefarostato, seguidos de instilação de iodo povidona a 5% no saco conjuntival por três minutos antes da injeção.<sup>110</sup>

O bevacizumabe (Avastin, Genentech Inc., South San Francisco, CA, EUA), na concentração de 25 mg/ml, foi injetado no volume de 0,05 ml, que corresponde a 1,25 µg da droga, por meio de seringa de insulina com agulha 27 gauge, na região temporal ou nasal inferior à distância medida com compasso de 3,5 mm do limbo em pseudofácicos e a 4 mm em fácicos, perpendicular à parede do bulbo ocular e direcionada ao centro da cavidade vítrea, com o bisel voltado para o cristalino (Figura 4).

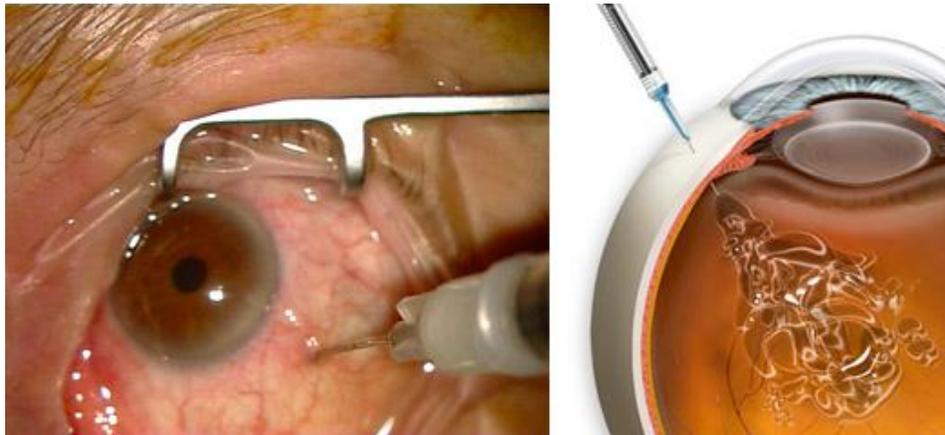


Figura 4. Técnica da injeção intravítrea de antiangiogênicos

Logo após a injeção, a artéria central da retina era avaliada por meio da biomicroscopia com lente esférica de 78 dioptrias e, se diagnosticada oclusão vascular, a pressão intraocular era mensurada e verificada necessidade de

paracentese na câmara anterior. Por outro lado, não havendo esta oclusão, uma gota de colírio de moxifloxacino 0,5% ou gatifloxacino 0,3%, 4 vezes ao dia, era prescrita por 5 dias e o paciente recebia orientações quanto ao retorno ao ambulatório para seguimento.

Os pacientes retornavam para a primeira visita após sete dias e, para a segunda, vinte e oito dias após o procedimento e eram submetidos a reavaliações incluindo acuidade visual após refração a quatro metros utilizando-se a tabela do ETDRS e OCT de alta resolução respeitando o mesmo aparelho dos exames anteriores.

### **3.2.1.2 Ensaio de longo prazo**

Todos os pacientes incluídos no ensaio retrospectivo de longo prazo haviam sido previamente submetidos a tratamento com antiangiogênicos. Foram utilizados, a critério da instituição envolvida na pesquisa, bevacizumabe 1,25 µg ou ranibizumabe (Lucentis, Novartis, South San Francisco, CA, EUA), injetado pela mesma técnica, no mesmo volume, o que corresponde a 1 µg da droga. Os pacientes foram tratados no regime PRN, de acordo com a presença de sinais de doença neovascular em atividade. O acompanhamento desses indivíduos incluiu visitas mensais e avaliação de acuidade visual com tela de Snellen, biomicroscopia de fundo e OCT nos aparelhos Cirrus<sup>®</sup>, Spectralis<sup>®</sup>, Stratus<sup>®</sup> (Carl Zeiss Meditec, Dublin, CA, USA), ou RTVue<sup>®</sup> (Optovue, Inc, Fremont, CA, USA), respeitando-se sempre o mesmo aparelho nos exames subsequentes de cada paciente.

Foram submetidos a revisão de prontuário e colhidos dados nos momentos do início do tratamento e de um ano de acompanhamento, tendo sido incluídas as informações de acuidade visual com melhor correção, espessura retiniana central por OCT, número de injeções intravítreas realizadas e atividade persistente de doença.

No caso de doença bilateral, foi incluído no estudo somente o primeiro olho tratado. Os pacientes do estudo de longo prazo foram questionados também quanto à percepção subjetiva de evolução da dificuldade visual ao longo do acompanhamento. Foi solicitado que classificassem a evolução quanto à melhora, manutenção ou piora da dificuldade visual.<sup>89</sup>

### **3.2.2 Avaliação genética**

Ao final da entrevista por questionário padronizado, foram colhidos de 5 a 10 ml de sangue periférico de todos os indivíduos incluídos nos estudos, em frasco estéril com EDTA 10% como anticoagulante, para posterior extração de DNA, a qual ocorreu através da técnica de fenol-clorofórmio.

A análise molecular dos polimorfismos foi realizada por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento direto.

#### **3.2.2.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

Para a reação de PCR foram desenhados pares de iniciadores ou *primers* para a amplificação das regiões que contêm os polimorfismos a serem analisados. Às amostras de DNA foram adicionados 20 pmol dos *primers* sense e anti-sense,

em conjunto com 200  $\mu\text{mol}$  de cada desoxirribonucleotídeo trifosfatado (dNTP), tampão da enzima 1X, 0,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), completando-se o volume final da reação para 25  $\mu\text{L}$  com água deionizada estéril. As amostras foram amplificadas em aparelho ciclador de temperatura MasterCycler EP Gradient S (Eppendorf, Hamburg, Germany). As temperaturas e duração dos ciclos foram: desnaturação inicial a 95°C durante 5 minutos; 35 ciclos de desnaturação a 95°C durante um minuto, anelamento a 67°C durante um minuto e alongamento a 72°C durante um minuto; extensão final de 72°C durante 7 minutos e conservação a 4°C.

Ao final da reação, 5  $\mu\text{L}$  do produto da PCR foram misturados a 1  $\mu\text{L}$  do tampão de corrida 10X Blue Juice-Gel Loading Buffer (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo e observados sob iluminação ultravioleta. Os fragmentos amplificados foram comparados ao marcador de peso molecular 100bp DNA Ladder (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e, para a realização da reação de sequenciamento, a concentração do DNA da amostra purificada foi estimada a partir da comparação com a intensidade da banda do marcador de peso e massa molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

### **3.2.2.2 Reação de sequenciamento**

Após confirmação da amplificação, o produto da PCR foi purificado utilizando-se os seguintes reagentes: 5,0  $\mu\text{l}$  do produto da PCR e 2,0  $\mu\text{l}$  da mistura de enzimas exonuclease I e fosfatase alcalina de camarão ExoSAP-IT (Amersham

Life Sciences, Uppsala, Sweden). As amostras foram levadas ao aparelho ciclador de temperatura por 15 minutos a 37°C e 15 minutos a 80°C para inativação da enzima.

Para a reação de sequenciamento foram utilizados de 10 a 40 ng (2,0 µL) do produto purificado para um volume final de reação de 10 µL, contendo 1 µL de Big Dye Terminator Ready Reaction v3.0 (ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems Foster City, CA, USA), 3 µL do tampão de sequenciamento 5X (Applied Biosystems Foster City, CA, USA) e 1,6 pmol de um dos *primers* (*sense* ou *antisense*) utilizados na PCR, sendo o volume final completado com água deionizada estéril.

As condições da reação de sequenciamento foram: 25 ciclos a 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos. Após esta reação, as amostras foram novamente purificadas para eliminação dos nucleotídeos não incorporados.

### **3.2.2.3 Purificação da reação de sequenciamento**

Após realização da reação de sequenciamento, aos 10 µl do produto final foram adicionados 50 µl de isopropanol a 65%, permanecendo em repouso em ambiente escuro por 20 minutos e logo em seguida submetidos à centrifugação por 25 minutos a 25°C a 13000 rpm. Após centrifugação, o sobrenadante foi retirado por pipetagem. Foram adicionados, em seguida, 250 µl de etanol 60%, levando-se à centrifugação por 10 minutos a 25°C a 13000 rpm. Após centrifugação, o sobrenadante foi retirado por pipetagem. Em seguida, os tubos foram levados ao banho seco a 90°C por 4 minutos para evaporação do etanol

residual, permanecendo no tubo apenas o *pellet* do material tratado aderido à parede do tubo.

As amostras foram ressuspensas em 17  $\mu$ L de Formamida Hi-Di (Applied BioSystems, Foster City, CA, USA), desnaturadas a 95°C por 3 minutos, colocadas em gelo e submetidas à eletroforese no analisador automático de DNA Abi Prism 310 ou Abi Prism 3700 (Applied BioSystems, Foster City, CA, USA). Para confirmação da região genômica analisada, as sequências foram submetidas a buscas por similaridade, utilizando-se o algoritmo de buscas *Blast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

### **3.2.3 Análise estatística**

Os dados foram armazenados e submetidos às análises estatísticas no programa SPSS for Windows, versão 10.0. Para descrever o perfil da amostra segundo as variáveis em estudo, foram feitas estatísticas descritivas das variáveis numéricas..

Para comparar as variáveis numéricas entre os 3 genótipos no tempo basal foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, devido à ausência de distribuição normal das variáveis e o teste exato de Fisher para as variáveis categóricas. Para comparar as medidas longitudinais entre os grupos e os tempos foi utilizada a análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas, seguida do teste de comparação múltipla de Tukey para comparar os grupos em cada momento, e o teste de perfil por contrastes para analisar a evolução entre as avaliações, em cada grupo. As medidas de acuidade visual foram convertidas para logMAR para a

análise estatística e todas as variáveis foram transformadas em postos (*ranks*) devido à ausência de distribuição normal.

O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5%, ou seja,  $p < 0,05$ .



## **4. RESULTADOS**



## 4.1 Ensaio de curto prazo

### 4.1.1 Dados demográficos e clínicos dos indivíduos do estudo:

Trinta e um pacientes foram diagnosticados com DMRI exsudativa no período de inclusão do estudo. Quatro foram excluídos por fibrose subfoveal, um por proliferação angiomasosa retiniana e um por hemorragia sub-retiniana. Assim, 25 indivíduos foram incluídos no ensaio prospectivo de curto prazo. A Tabela 1 apresenta as características clínicas e demográficas da amostra.

Tabela 1. Dados demográficos e fenótipos da DMRI da população estudada no ensaio de curto prazo

Variável	Valor
Número de pacientes	25
Idade média (anos)	75,1
Sexo feminino (%)	64,0
Pseudofacia (%)	60,0
Hipertensão arterial (%)	32,0
História familiar de DMRI (%)	16,0
Tabagismo	
Atual (%)	36,0
Passado (%)	20,0
Nunca (%)	44,0
Cor da íris	
Castanho (%)	92,0
Azul-verde (%)	8,0
Lesões clássicas (%)	36,0
Tempo dos sintomas (meses)	10,8

O sequenciamento genético do *CFH* desses pacientes evidenciou que seis (24%) eram homozigotos para o alelo de risco (CC), doze (48%) heterozigotos (CT) e sete (28%) homozigotos para o alelo selvagem (TT) (Gráfico 1).

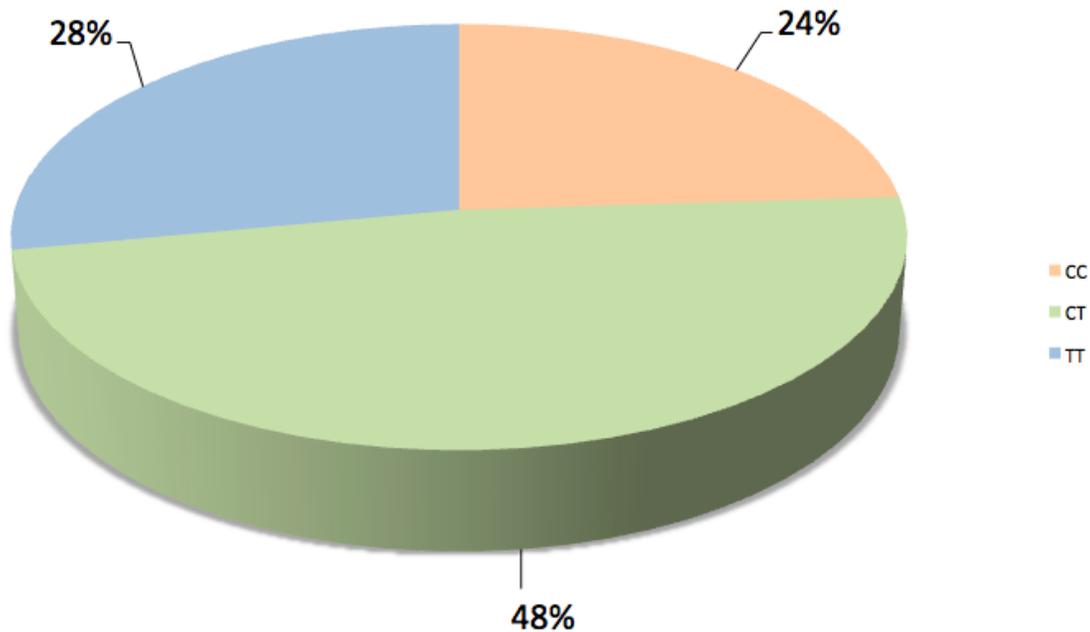


Gráfico 1. Frequência dos genótipos do *CFH* na população do ensaio de curto prazo

Os três grupos de genótipos não diferiram estatisticamente quanto à idade, sexo, história ocular pregressa de cirurgia de catarata, história sistêmica pregressa de hipertensão arterial, história familiar de DMRI, história pessoal de tabagismo, cor da íris, subtipo angiográfico da lesão ou tempo de apresentação dos sintomas.

A Tabela 2 apresenta as características clínicas e demográficas da amostra, de acordo com os diferentes polimorfismos.

Tabela 2. Dados demográficos e fenótipos dos pacientes com DMRI exsudativa de acordo com o genótipo do gene *CFH* no ensaio de curto prazo

Variável	Genótipo			p	
	CC	CT	TT		
Número de pacientes	6	12	7		
Idade média (anos)	74,3	75,4	75,2	0,768#	
Sexo feminino (%)	33,3	83,3	42,8	0,144*	
Pseudofacia (%)	33,3	66,6	71,4	0,386*	
Hipertensão arterial (%)	33,3	41,6	14,2	0,475*	
História familiar de DMRI (%)	16,6	16,6	14,2	1,000*	
Tabagismo	Atual (%)	50,0	14,2	41,6	
	Passado (%)	33,3	28,5	8,3	0,341*
	Nunca (%)	16,6	57,1	50,0	
Cor da íris	Castanho (%)	83,3	100	91,6	0,687*
	Azul-verde (%)	16,6	0	8,3	
Angiografia	Clássica (%)	33,3	41,6	28,5	0,873*
	Ocultas (%)	66,7	58,4	71,5	
Tempo dos sintomas (meses)	12,1	10,0	10,8	0,611#	

# teste de Kruskal-Wallis, \* teste exato de Fisher

Em relação ao tratamento, não houve intercorrências relacionadas à injeção intravítrea de bevacizumabe.

#### 4.1.2 Avaliação da acuidade visual

Quanto à acuidade visual média em logMAR, os três grupos não diferiram quanto à avaliação antes do tratamento (D0) ( $p=0,708$ ). No seguimento após o tratamento, não houve diferença significativa na acuidade visual média entre os

grupos no sétimo dia (D7) após a injeção intravítrea de bevacizumabe ( $p=0,860$ ), assim como no vigésimo oitavo dia (D28) após o tratamento ( $p=0,928$ ).

Os resultados da ANOVA para medidas repetidas para comparação da variável acuidade visual entre os tempos entre os três genótipos (CC vs. CT vs. TT) demonstrou que esta foi significativamente melhor no sétimo e vigésimo oitavo dias de acompanhamento em relação à acuidade visual inicial ( $p<0,001$ ) (Gráfico 2).

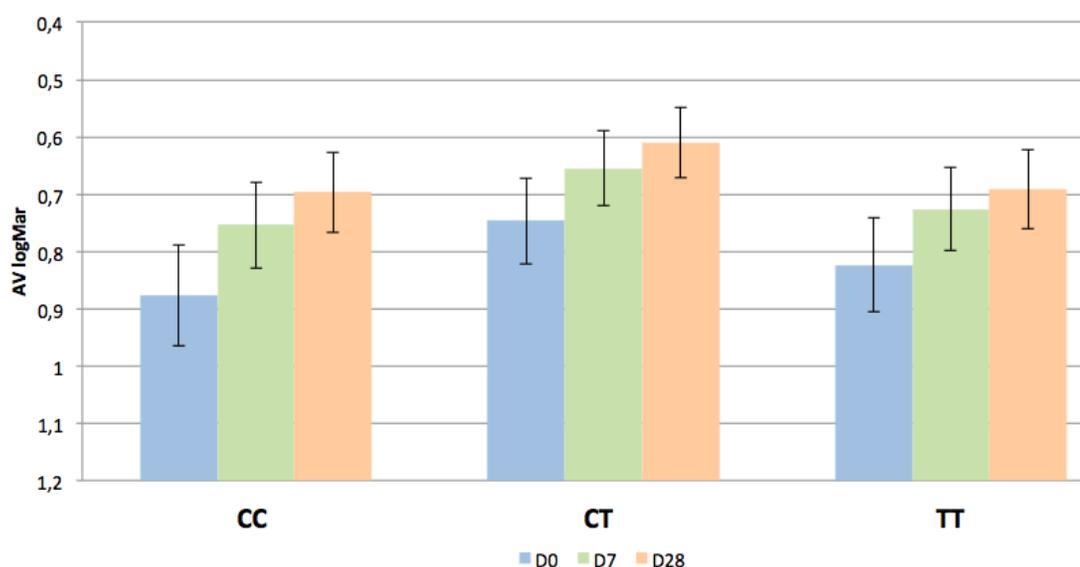


Gráfico 2. Comparação da acuidade visual em logMAR de acordo com o genótipo do *CFH* e momento do seguimento em relação a injeção intravítrea de bevacizumabe. AV=acuidade visual

A avaliação entre os tempos dentro de cada grupo de genótipo, através do teste de perfil por contraste, demonstrou que houve melhora da acuidade visual no dia 28 em relação ao valor inicial (D0 vs. D28) em todos os genótipos.

Entretanto, no grupo CC, ocorreu diferença apenas no dia 28 em relação ao dia 7 (D7 vs. D28). Enquanto isso, nos grupos CT e TT, a acuidade visual melhorou mais precocemente, no dia 7 em relação ao valor inicial (D0 vs. D7).

A Tabela 3 apresenta os níveis descritivos dos testes comparativos de acuidade visual nos diferentes tempos em cada genótipo.

Tabela 3. Níveis descritivos do teste de perfil por contrastes da acuidade visual entre os tempos em cada genótipo

Comparação entre tempos	Genótipo		
	CC	CT	TT
D0 vs. D7	p=0,073	<b>p=0,004</b>	<b>p=0,019</b>
D7 vs. D28	<b>p=0,040</b>	p=0,082	p=0,174
D0 vs. D28	<b>p=0,015</b>	<b>p=0,009</b>	<b>p=0,028</b>

#### 4.1.3 Avaliação da espessura retiniana

Em relação à medida de espessura retiniana central média por OCT, os grupos não apresentaram diferença significativa no pré tratamento (p=0,374). No seguimento após o tratamento, os grupos também não diferiram estatisticamente quanto à espessura retiniana central média no sétimo dia após a injeção intravítrea de bevacizumabe (p=0,187), assim como no vigésimo oitavo dia após o tratamento (p=0,476).

A comparação das medidas de espessura retiniana central média entre os tempos entre os três genótipos demonstrou que houve uma redução significativa no sétimo e vigésimo oitavo dias em relação à medida inicial (p<0,001) (Gráfico 3). Selecionou-se um caso para ilustração (Figura 5).

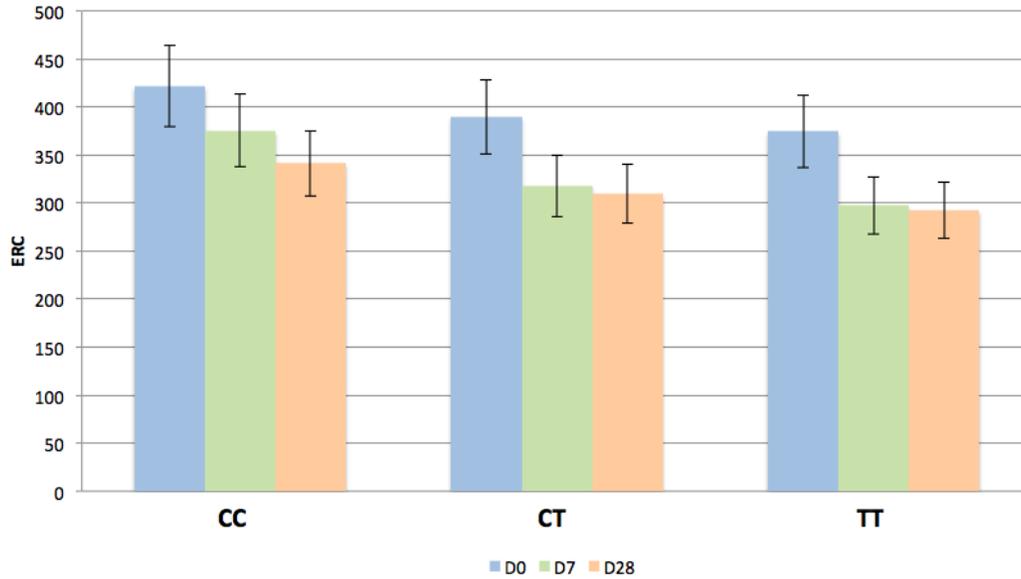


Gráfico 3. Comparação da medida de espessura retiniana central de acordo com o genótipo do *CFH* e momento do seguimento em relação à injeção intravítrea de bevacizumabe. ERC=espessura retiniana central

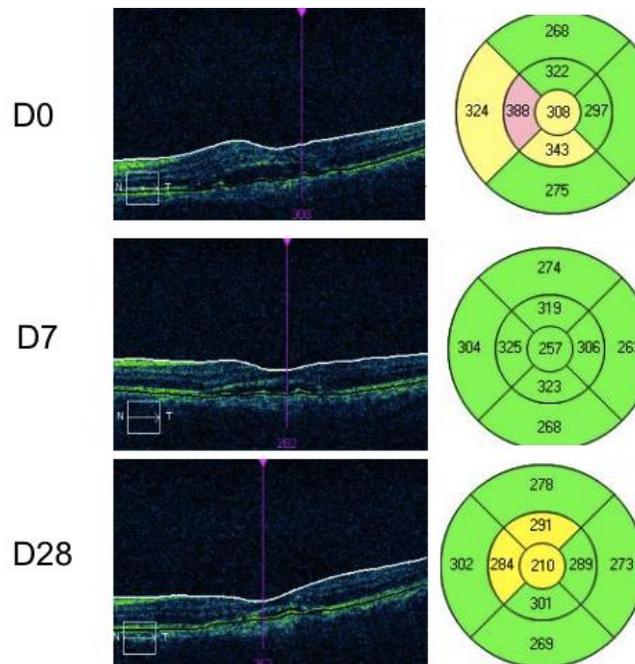


Figura 5. Paciente portador de DMRI exsudativa submetido à injeção intravítrea de bevacizumabe, demonstrando redução da espessura retiniana progressivamente no sétimo e vigésimo oitavo dias de acompanhamento.

A avaliação dentro de cada grupo de genótipo demonstrou que apenas os grupos CT (D0 vs. D7 e D0 vs. D28) e TT (D0 vs. D28) apresentavam diferenças significativas entre os tempos. A análise de perfil por contraste não evidenciou nenhuma diferença significativa no grupo CC (Tabela 4).

Tabela 4. Níveis descritivos do teste de perfil por contrastes da espessura retiniana central entre os tempos em cada genótipo

Comparação entre tempos	Genótipo		
	CC	CT	TT
D0 vs. D7	p=0,266	<b>p=0,002</b>	p=0,273
D7 vs. D28	p=0,123	p=0,472	p=0,141
D0 vs. D28	p=0,083	<b>p&lt;0,001</b>	<b>p=0,046</b>

## 4.2 Ensaio de longo prazo

### 4.2.1 Dados demográficos e clínicos dos indivíduos do estudo:

Quarenta e seis pacientes acompanhados por no mínimo um ano em tratamento para DMRI exsudativa com antiangiogênicos no regime PRN foram incluídos no ensaio retrospectivo de longo prazo. A Tabela 5 apresenta as características clínicas e demográficas da amostra.

Tabela 5. Dados demográficos e fenótipos da DMRI da população estudada no ensaio de longo prazo

<b>Variável</b>		<b>Valor</b>
Número de pacientes		46
Idade média (anos)		75,7
Sexo feminino (%)		65,2
Pseudofacia (%)		54,3
Hipertensão arterial (%)		50,0
História familiar de DMRI (%)		13,0
Tabagismo	Atual (%)	17,3
	Passado (%)	15,2
	Nunca (%)	67,3
Cor da íris	Castanho (%)	84,7
	Azul-verde (%)	15,2
Angiografia	Clássica (%)	30,4
	Ocultas (%)	43,4
	Não disponíveis (%)	26,0
Angiografias disponíveis (%)		73,9
Lesões clássicas (%)		41,1
Tempo dos sintomas (meses)		7,5
Uso de vitaminas (%)		69,5
Droga utilizada	Bevacizumabe (%)	60,8
	Ranibizumabe (%)	39,2

O sequenciamento direto do *CFH* desses pacientes evidenciou que onze (24%) eram homozigotos para o alelo de risco (CC), vinte e três (50%) heterozigotos (CT) e doze (26%) homozigotos para o alelo selvagem (TT) (Gráfico 4).

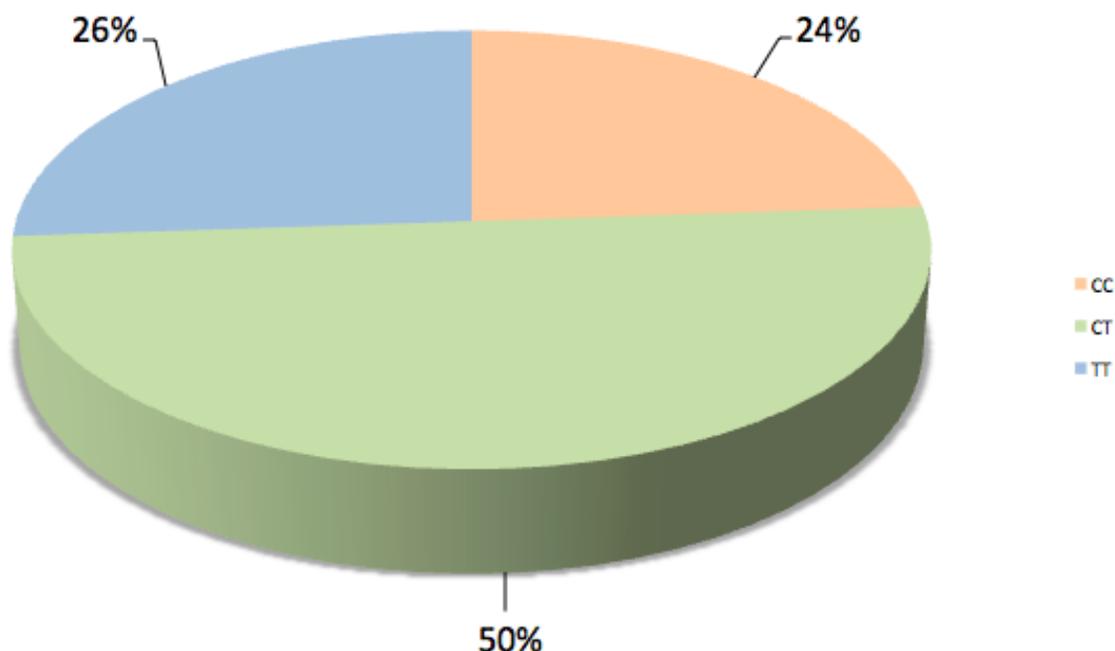


Gráfico 4. Frequência dos genótipos do *CFH* na população do ensaio de longo prazo

Os pacientes dos três genótipos não diferiram estatisticamente quanto à idade, cor da íris, história ocular pregressa de cirurgia de catarata, história sistêmica pregressa de hipertensão arterial, história familiar de DMRI, história pessoal de tabagismo, subtipo angiográfico da lesão ou tempo de apresentação dos sintomas.

Também não houve diferença significativa quanto ao uso de vitaminas durante o acompanhamento, ou utilização de bevacizumabe ou ranibizumabe

como inibidor do VEGF. O grupo CT apresentou significativamente uma frequência maior de mulheres que os demais grupos ( $p=0,041$ ). A Tabela 6 apresenta as características clínicas e demográficas da amostra, de acordo com os diferentes polimorfismos.

Tabela 6. Dados demográficos e fenótipos dos pacientes com DMRI exsudativa de acordo com o genótipo do gene *CFH* no ensaio de longo prazo

Variável	Genótipo			p	
	CC	CT	TT		
Número de pacientes	11	23	12		
Idade média (anos)	76,2	73,5	77,4	0,228#	
Sexo feminino (%)	45,4	82,6	50,0	0,041*	
Pseudofacia (%)	27,2	47,8	58,3	0,314†	
Hipertensão arterial (%)	54,5	47,8	50,0	0,935†	
História familiar de DMRI (%)	27,2	8,7	8,3	0,387*	
Tabagismo	Atual (%)	27,2	17,3	8,3	0,423*
	Passado (%)	27,2	8,7	16,6	
	Nunca (%)	45,4	73,9	75,0	
Cor da íris	Castanho (%)	90,9	82,6	83,3	0,823*
	Azul-verde (%)	9,1	17,3	16,6	
Angiografia	Clássica (%)	18,8	34,7	33,3	0,902*
	Oculto (%)	54,5	39,1	41,6	
	Não disponível (%)	27,2	26,0	25,0	
Tempo dos sintomas (meses)	8,3	6,6	7,5	0,660#	
Uso de vitaminas (%)	54,5	73,9	75,0	0,500*	
Droga utilizada	Bevacizumabe (%)	63,6	60,8	58,3	1,000*
	Ranibizumabe (%)	36,4	39,2	41,7	

# teste de Kruskal-Wallis, \* teste exato de Fisher, † teste de qui-quadrado

Não houve intercorrências relacionadas aos procedimentos de injeção intravítrea.

#### **4.2.2 Avaliação da acuidade visual**

Quanto à acuidade visual média em logMAR, os três grupos não diferiram quanto à avaliação antes do tratamento ( $p=0,652$ ), assim como ao final de um ano de acompanhamento ( $p=0,282$ ).

Ao final de um ano de acompanhamento, a análise de variância para os três grupos de genótipos (CC vs. CT vs. TT) não evidenciou significância estatística na comparação da acuidade visual em relação ao valor inicial ( $p=0,079$ ).

Entretanto, ao se realizar a análise comparativa para a presença ou ausência do alelo C (CC + CT vs. TT), essa diferença foi significativa, demonstrando uma melhora na acuidade visual entre os dois momentos ( $p=0,039$ ) (Gráfico 5).

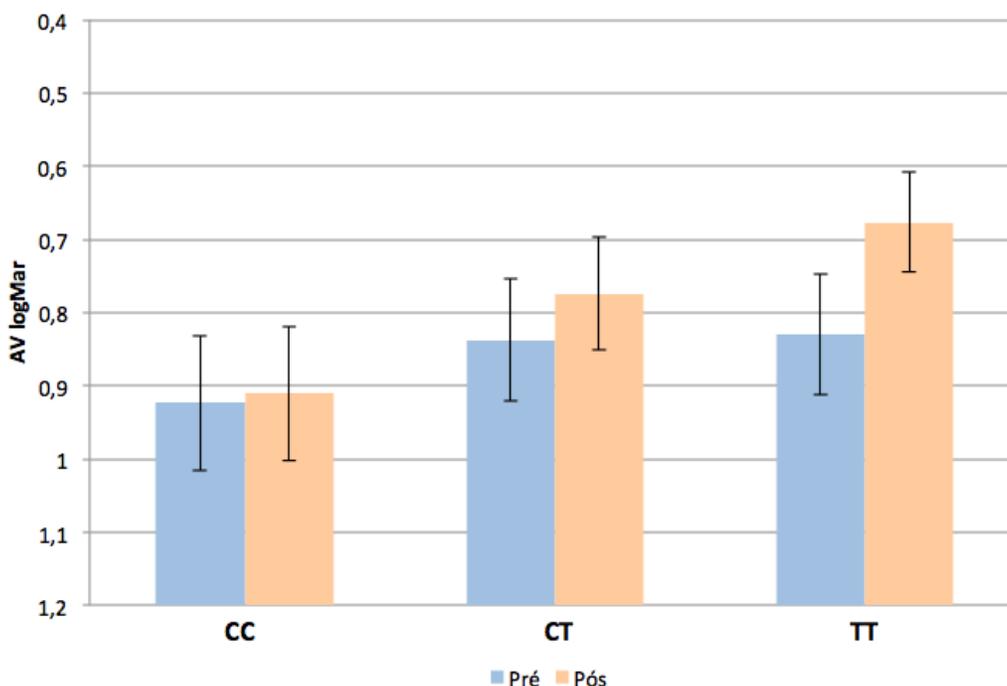


Gráfico 5. Comparação da acuidade visual em logMAR de acordo com o genótipo do *CFH* antes e ao final de um ano de acompanhamento. AV=acuidade visual

O teste de perfil por contraste evidenciou que essa diferença estava relacionada apenas a uma melhora no grupo sem o alelo C (Pré vs. pós), sem diferença significativa no grupo de pacientes com o alelo de risco.

A Tabela 7 apresenta os níveis descritivos dos testes comparativos de acuidade visual antes e ao final de um ano de acompanhamento, de acordo com a presença do alelo de risco.

Tabela 7. Níveis descritivos do teste de perfil por contrastes da acuidade visual entre os tempos de acordo com a presença do alelo de risco

Comparação entre tempos	Genótipo	
	CC + CT	TT
Pré vs. pós	p=0,241	p=0,049

### 4.2.3 Avaliação da espessura retiniana

Em relação à medida de espessura retiniana central por OCT, os três grupos de genótipos não apresentaram diferença significativa no pré tratamento ( $p=0,402$ ), assim como na avaliação com um ano de acompanhamento ( $p=0,294$ ).

A espessura retiniana central na análise de variância para os três grupos de genótipos (CC vs. CT vs. TT) foi significativamente menor ao final de um ano de tratamento em relação à medida inicial ( $p<0,001$ ) (Gráfico 6).

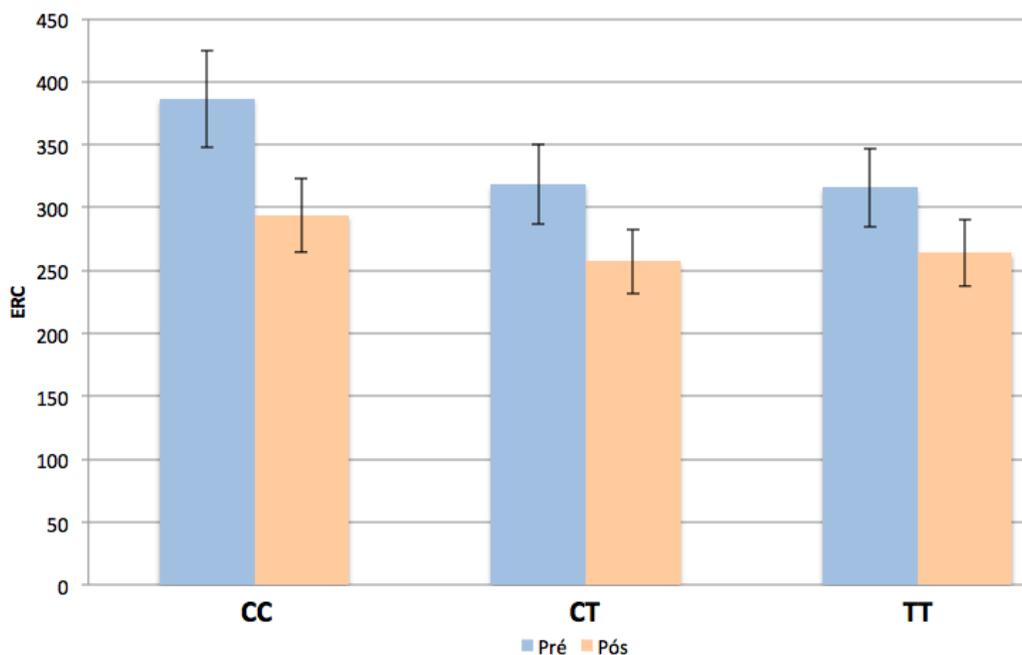


Gráfico 6. Comparação da medida de espessura retiniana central de acordo com o genótipo do *CFH* antes e ao final de um ano de acompanhamento. ERC=espessura retiniana central

Foram encontradas diferenças significativas no teste de perfil por contraste no genótipos CT e TT, enquanto que no genótipo CC não houve significância (Tabela 8).

Tabela 8. Níveis descritivos do teste de perfil por contrastes da espessura retiniana central entre os tempos em cada genótipo

Comparação entre tempos	Genótipo		
	CC	CT	TT
Pré vs. pós	p=0,148	p<0,001	p=0,002

#### 4.2.4 Avaliação do número de injeções intravítreas

Os pacientes do grupo CC foram submetidos em média a  $3,45 \pm 1,44$  injeções de antiangiogênicos ao longo de um ano de acompanhamento do estudo, enquanto os do grupo CT em média a  $3,83 \pm 1,95$  e o grupo TT a  $3,83 \pm 1,59$  injeções. Não houve diferença entre os grupos ( $p=0,787$ ) (Gráfico 7).

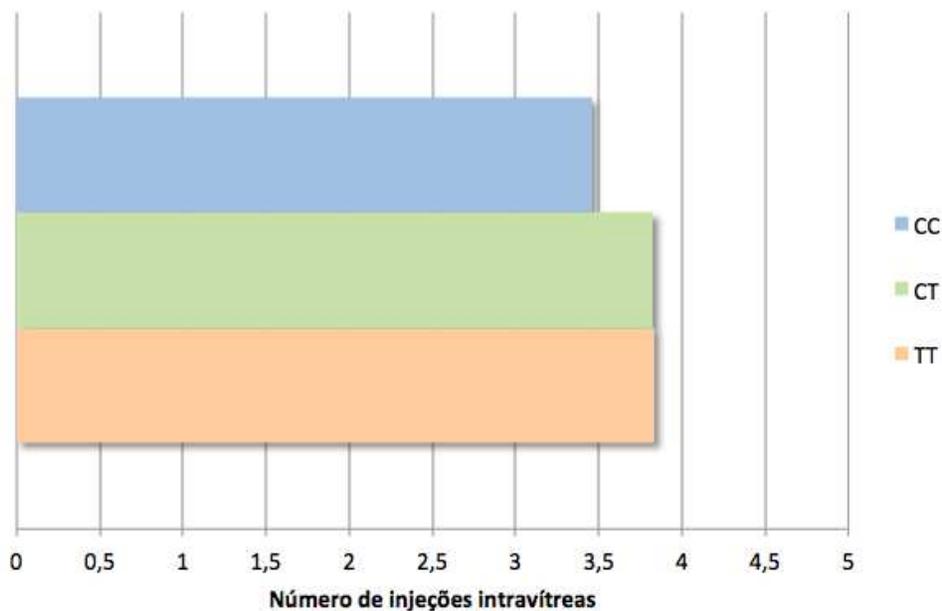


Gráfico 7. Número de injeções intravítreas de acordo com o genótipo

#### **4.2.5 Avaliação da persistência de atividade de doença**

Ao final de um ano de acompanhamento, 63,6% dos pacientes do grupo CC, 43,4% do grupo CT e 50% do grupo TT apresentavam sinais de atividade neovascular e estavam sendo submetidos a injeções intravítreas de inibidores do VEGF para controle da doença. Não houve significância estatística na diferença entre os grupos ( $p=0,546$ ).

#### **4.2.6 Avaliação da percepção subjetiva de melhora de visão**

Ao serem questionados sobre como percebiam a evolução da sua visão ao final de um ano de acompanhamento comparando com um ano antes, 36,3% dos pacientes com genótipo CC responderam que tinha havido uma melhora, 36,3% que havia permanecido igual e 27,2% que havia ocorrido uma piora. Os pacientes do genótipo CT referiram melhora em 39,1% dos casos, estabilidade em 43,4% e piora em 17,39%. Os do grupo do genótipo TT perceberam melhora, estabilização e piora em respectivamente 41,6%, 33,3% e 25% dos casos. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p=0,944$ ).



## **5. DISCUSSÃO**



## 5.1 Genética e DMRI

A complexa etiopatogenia da DMRI não está completamente estabelecida. Nos últimos anos, a influência dos fatores genéticos sobre a doença tem sido cada vez mais evidenciada através de estudos epidemiológicos populacionais, correlação genótipo-fenótipo e avaliação da história natural da doença, com ganhos a partir do projeto do genoma humano e a identificação de numerosos locus de susceptibilidade.<sup>111</sup> Mais recentemente, essa influência também foi demonstrada na relação dos fatores genéticos com a resposta a diversos tratamentos.<sup>97,101,103</sup>

A desregulação da via do complemento surgiu como um importante fator patogênico na DMRI. O CFH é um regulador negativo crítico da ativação do complemento. Estudos biológicos funcionais demonstraram que o polimorfismo rs1061170 (T1277C), que está localizado numa sequência codificadora, exerce diferenças alélicas na afinidade de ligação à CRP<sup>112</sup> e, assim, pode limitar a capacidade de ativação do complemento para eliminar células danificadas por lesão não imunológica. É possível que o polimorfismo Y402H reduza a capacidade funcional do complemento em participar na reparação vascular através das suas interações com a CRP na interface retina / coróide e possa levar à ativação do complemento descontrolada com dano celular e tecidual associados.<sup>113</sup>

Os primeiros estudos evidenciando a relação entre variantes genéticas e DMRI foram publicados em 2005, demonstrando a associação da DMRI com o polimorfismo no gene *CFH*,<sup>46,54</sup> e representaram um avanço na compreensão da etiopatogenia da DMRI. Desde 2007, a relação entre essas variantes genéticas e

a resposta ao tratamento da DMRI também é objeto de estudo.<sup>114</sup> A farmacogenética consiste em testar como uma característica genética de determinado indivíduo pode afetar a resposta ao tratamento com uma droga, em termos de eficácia e reações adversas.

Nos presentes ensaios, foi avaliada a relação entre o tratamento da DMRI exsudativa com antiangiogênicos e o genótipo do *CFH*. O ensaio prospectivo de curto prazo acompanhou os efeitos da injeção intravítrea de bevacizumabe sobre a morfologia e a função retiniana. Avaliaram-se acuidade visual e espessura retiniana central, bem como eventuais complicações do procedimento. Para compor o grupos de estudo, optou-se por selecionar pacientes com DMRI exsudativa recém diagnosticados sem tratamento prévio, no intuito de se obter menor interferência de outros tratamentos.

O ensaio retrospectivo de longo prazo avaliou o comportamento dos pacientes ao final de um ano de tratamento para DMRI exsudativa com inibidores do VEGF no regime PRN. Foram incluídos indivíduos regularmente acompanhados nas instituições envolvidas na pesquisa, no intuito de colher dados que correspondam à situação real do tratamento da DMRI exsudativa em nossa região.

## **5.2 Características gerais das amostras**

O sexo feminino, idade avançada e tabagismo estão relacionados à progressão da DMRI, com um risco 2,6 vezes maior de evolução para DMRI avançada no olho contralateral em mulheres, 5 vezes maior em maiores de 80 anos e 4,4 vezes maior em tabagistas maiores que 40 maços x ano.<sup>115</sup> Apesar de

catarata ou cirurgia de catarata não apresentarem associação com DMRI precoce nos estudos populacionais, esta última se relaciona a um risco maior de DMRI avançada, independentemente de outros fatores de risco, com um risco de 1,93 vez maior ao longo de cinco anos de acompanhamento.<sup>116</sup>

A população brasileira é etnicamente diversa e a cor da pele não é um critério confiável para subdividir uma população estudada em grupos raciais. Os indivíduos da presente pesquisa foram avaliados quanto à cor da íris, considerando que foi bem demonstrada a associação desta com a DMRI. Uma explicação biológica plausível para o efeito protetor de íris escuras em relação a DMRI é que esses indivíduos podem apresentar uma concentração maior de melanina tecidual, incluindo a coroide e a retina. Essa melanina pode prover proteção para a retina contra a exposição à luz solar, reduzindo o dano oxidativo direto.<sup>117</sup> Brockmann et al. evidenciou relação entre a cor da íris e a resposta ao tratamento da DMRI exsudativa com bevacizumabe e ranibizumabe. Indivíduos com íris escuras apresentaram ganho de visão significativamente maior após uma, assim como após duas injeções de antiangiogênicos, que pacientes com íris claras.<sup>118</sup>

No ensaio de curto prazo e no de longo prazo, as variáveis relacionadas ao fenótipos não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos de genótipos, reduzindo eventual interferência na avaliação dos indivíduos incluídos quanto à resposta inicial ao tratamento da DMRI exsudativa com bevacizumabe e ao comportamento ao longo de um ano de tratamento com inibidores do VEGF. No ensaio de longo prazo, foi encontrada uma frequência significativamente maior de mulheres no grupo CT, mas não há indícios de que

esse fator possa interferir na interpretação dos nossos resultados quanto à relação entre o genótipo do *CFH* e o tratamento da DMRI.

Não detectamos uma frequência maior de história familiar para DMRI nos indivíduos com os genótipos de risco do *CFH*, assim como Zarepasi et al. em estudo envolvendo a população americana.<sup>119</sup> Apesar de esse mesmo autor ter evidenciado uma idade menor ao diagnóstico de DMRI exsudativa em pacientes com genótipo CC, nossas amostras apresentaram idades semelhantes entre os diferentes genótipos, de forma semelhante a Haines et al. na população inglesa<sup>94</sup> e Sepp et al. na população americana<sup>120</sup>.

Em relação à avaliação da acuidade visual, utilizou-se a tabela do ETDRS no ensaio de curto prazo, cuja escala logarítmica em passos de 0,1 unidades de log oferece medições mais precisas de acuidade visual, permitindo detectar pequenas variações com melhor poder de análise.<sup>121</sup> Falkenstein et al. demonstrou pobre concordância entre tabela de Snellen e do ETDRS, sugerindo que dados obtidos em ensaios clínicos, por meio da tabela do ETDRS, devem ser avaliados criteriosamente quando convertidos para Snellen, evitando erros de interpretação na prática clínica.<sup>122</sup> No ensaio de longo prazo, foi utilizada a tabela de Snellen, conforme a prática regular das instituições envolvidas na pesquisa.

No ensaio de curto prazo, as medidas de espessura retiniana central foram obtidas através de OCTs de alta resolução, Cirrus<sup>®</sup> e Spectralis<sup>®</sup>, e, no ensaio de longo prazo, foram colhidos dados de exames realizados também em outros dois equipamentos, Stratus<sup>®</sup> e RTVue<sup>®</sup>, sendo que cada paciente foi acompanhado no mesmo aparelho e pelo mesmo examinador. As imagens foram submetidas à correção manual de segmentação e centralização, considerando a evidência que esse procedimento aumenta a reprodutibilidade do exame, permitindo que

medidas quantitativas longitudinais, pelo mesmo operador, sejam utilizadas para avaliar uma intervenção terapêutica efetuada.<sup>123</sup> As medidas de espessura retiniana central nos aparelhos utilizados são virtualmente idênticas quando obtidas através de imagens submetidas à correção manual de segmentação.<sup>124</sup>

Encontramos o alelo de risco C presente em 48% das bases nitrogenadas dos pacientes incluídos no estudo de curto prazo e em 48,9% no estudo de longo prazo, valores intermediários à frequência de 34,9% evidenciada em uma meta-análise envolvendo diversas populações,<sup>125</sup> e os 55,8% encontrados em estudo na população brasileira.<sup>126</sup>

O retardo na terapia está relacionado a risco de deterioração visual, foi descrito como em média 2,27 meses na população alemã, é maior nas idades avançadas<sup>127</sup> e poderia ser uma variável de confusão da presente pesquisa, gerando diferenças entre os grupos, independentemente do genótipo. O tempo decorrido entre o relato do início dos sintomas e o início do tratamento foi semelhante entre os grupo de genótipos tanto no ensaio de curto prazo quanto no de longo prazo.

### **5.3 Genética e efeitos funcional e morfológico precoce da injeção intravítrea de bevacizumabe**

O genótipo CC está relacionado a uma maior taxa de incidência e progressão de DMRI para formas graves.<sup>128</sup> Os desfechos do ensaio de curto prazo, ao avaliar a resposta à medicação em momentos precoces após a injeção, destacam a relação farmacogenética propriamente dita, minimizando a influência da agressividade da própria doença ao longo do tempo relacionada ao genótipo.

Quanto aos efeitos precoces do bevacizumabe sobre a anatomia e função retiniana em pacientes com DMRI exsudativa recém diagnosticados, evidenciamos que os três grupos de genótipos apresentaram melhora da acuidade visual após injeção intravítrea de bevacizumabe, com uma melhora média em logMAR de 0,79 no D0 para 0,69 no D7 e 0,65 no D28, o que corresponde a melhora respectivamente de uma linha ou 5 letras de ETDRS no primeiro intervalo e de 4 letras no segundo. A espessura retiniana central apresentou redução média de 45 micra na primeira semana e 63 micra ao final de um mês.

Bolz et al. já havia demonstrado resposta funcional e estrutural semelhante à injeção intravítrea de antiangiogênico, com uma melhora média na acuidade visual de 5,1 letras de ETDRS na primeira semana após o tratamento com ranibizumabe e 4,7 letras no primeiro mês. A resposta anatômica ocorreu principalmente por redução do edema e do número de cistos intrarretinianos, e correspondeu a uma redução média da espessura retiniana central em 83 micra na primeira semana e 102 micra no primeiro mês.<sup>129</sup>

Ferraz et al. também demonstrou o efeito inicial da injeção intravítrea de bevacizumabe na acuidade visual de pacientes com DMRI exsudativa, com uma melhora de  $0,92 \pm 0,50$  em logMAR na avaliação pré-tratamento para  $0,84 \pm 0,51$  após 4 semanas.<sup>130</sup> Menguini et al. evidenciou que a resposta inicial ao tratamento é fator preditivo significativo da melhora da acuidade visual a longo prazo. Um ganho maior que 5 letras no primeiro mês de tratamento apresenta uma razão de chances de 6,75 de um ganho maior de 5 letras após um ano de acompanhamento. Nesse grupo de pacientes, a distribuição dos polimorfismos do genótipo do *CFH* não foi significativamente diferente nos olhos que apresentaram um ganho inicial ou não.<sup>131</sup>

Em nossos pacientes, a melhora de acuidade visual foi significativamente mais precoce em pacientes com genótipos CT e TT, que em pacientes do grupo CC. Quanto à avaliação da redução da espessura retiniana de acordo com o genótipo, demonstramos que esta foi significativa apenas nos genótipos CT e TT, e que não houve significância nos pacientes com o genótipo CC.

Genótipos de alto risco podem influenciar a resposta precoce ao bevacizumabe por alterações críticas em mediadores inflamatórios locais, devido à abundância da proteína variante CFH que pode limitar a ação da medicação.<sup>39</sup> Essas diferenças quanto à resposta podem estar relacionadas a uma influência farmacodinâmica da presença do alelo de risco C sobre a ação do bevacizumabe, gerando um retardo ou limitação do efeito funcional e morfológico.

#### **5.4 Genética e evolução a longo prazo da DMRI exsudativa em tratamento com antiangiogênicos**

A influência do genótipo do *CFH* na resposta a longo prazo ao tratamento da DMRI, especialmente com antiangiogênicos, foi objeto frequente de estudo nos últimos anos, envolvendo diversas populações, com resultados conflitantes.<sup>97,101,107</sup>

Evidenciamos que pacientes acompanhados por um ano, com DMRI exsudativa em tratamento com antiangiogênicos em regime PRN, apresentaram melhora média na acuidade visual, de 0,85 para 0,78 em logMAR, com significância estatística pelo teste de ANOVA para medidas repetidas ao se analisar grupos de acordo com a presença ou ausência do alelo de risco. Essa

melhora corresponde a um aumento médio de 3,5 letras de ETDRS, semelhante ao encontrado em estudos que também utilizaram mesmo regime de tratamento.<sup>84</sup>

A comparação dessa evolução, entre os pacientes que apresentavam pelo menos uma cópia do alelo de risco do gene *CFH* ou não apresentavam, evidenciou que a melhora da acuidade visual foi significativa neste último grupo. A recuperação visual ao longo de um ano no grupo que apresentava algum alelo de risco não teve significância estatística.

A adesão à frequência mensal de revisões no tratamento pelo regime PRN pode variar de acordo com a população estudada. Em uma população brasileira submetida ao tratamento com bevacizumabe, foi evidenciado que 29,3% dos pacientes haviam interrompido o acompanhamento inadvertidamente, tendo recebido em média 2,0 injeções. Os principais motivos citados foram resultados visuais ruins não esperados, falta de informação sobre os retornos, comorbidades e problemas de locomoção.<sup>132</sup>

Os indivíduos acompanhados por Brantley et al. por um período mínimo de seis meses e em média de 9,33 meses, e que receberam em média 2,85 tratamentos com bevacizumabe, apresentaram comportamento semelhante ao evidenciado em nosso estudo, sendo que indivíduos com genótipo CC sofreram piora de acuidade visual ao longo do tratamento, enquanto os com genótipo CT e TT tiveram melhora visual.<sup>97</sup>

Nischler et al. evidenciou também perda visual no grupo CC enquanto os grupos CT e TT apresentaram estabilidade da visão, ao acompanhar pacientes também por no mínimo 6 meses após o último tratamento e em média 11,3 meses, que receberam em média 3,75 injeções de bevacizumabe.<sup>101</sup> Kloeckener-

Gruissem B et al. realizou em média 3,9 injeções de ranibizumabe em 243 pacientes com DMRI exsudativa em 12 meses e estabeleceu, baseado na mudança de acuidade visual, dois grupos: maus respondedores correspondendo ao percentil 25% de pior evolução e bons respondedores, ao percentil 25% de melhor resposta. Indivíduos com o genótipo CC tiveram menor chance de desfecho positivo.<sup>103</sup>

Enquanto isso, nos pacientes acompanhados por Orlin et al. por em média dois anos, após pelo menos três meses após o último tratamento com bevacizumabe ou ranibizumabe, não foi evidenciada diferença entre as frequências dos genótipos entre pacientes com melhora da visão, que receberam em média 9,80 injeções e os com piora, sendo 10,26 injeções.<sup>106</sup> Os pacientes do estudo CATT também não diferiram quanto à evolução da acuidade visual ao final de um ano de tratamento com bevacizumabe ou ranibizumabe, tendo o grupo CC recebido em média 7,4 injeções, o CT também 7,4 e o TT 7,6.<sup>107</sup>

A população incluída em nosso ensaio de longo prazo recebeu em média 3,73 injeções intravítreas de antiangiogênicos e esse número não diferiu entre os genótipos. Evidenciamos que essa frequência de tratamentos é semelhante à realizada nos estudos em que se detectou influência do genótipo do *CFH* sobre a evolução dos pacientes.

A comparação entre os dados dos estudos previamente realizados e os resultados de nosso trabalho sugere que a influência do genótipo do *CFH* sobre a evolução a longo prazo de pacientes com DMRI em uso de antiangiogênicos no regime PRN pode sofrer influência do tempo de acompanhamento e da frequência de injeções intravítreas realizadas.

A presença de persistência de atividade de doença definida por critérios de acuidade visual, aspecto fundoscópico, angiográfico e por OCT, pelos médicos das instituições envolvidas na pesquisa ao final de um ano de acompanhamento foi semelhante entre os grupos e variou de 43,4% a 63,6%, ligeiramente inferiores aos cerca de 70% de pacientes com atividade em estudo prospectivo.<sup>86</sup>

A percepção subjetiva da visão ao longo de um ano de acompanhamento foi semelhante entre os grupos, sendo que a melhora visual descrita, entre 36,3% e 41,6%, foi menor que a encontrada previamente.<sup>89</sup>

## **5.5 Considerações finais**

Limitações dos presentes ensaios incluem o tamanho da amostra, que corresponde à dificuldade de acesso às instituições envolvidas de pacientes que preenchiam os critérios de inclusão e exclusão e à pouca disponibilidade e alto custo dos inibidores do VEGF.

A interpretação da angiografia fluoresceínica é prejudicada no seguimento do tratamento da DMRI exsudativa com antiangiogênicos<sup>133</sup> e apresenta riscos inerentes ao procedimento.<sup>134</sup> Nos presentes ensaios, a fluorescência retiniana não foi adotada no seguimento dos pacientes para analisar a involução da MNVSR, perdendo-se um parâmetro do efeito dos inibidores do VEGF como droga antiangiogênica. Apesar de a delimitação da área de fluorescência ser obtida de forma subjetiva e não ser conhecida a reprodutibilidade do exame, a angiofluoresceinografia poderia ser realizada para comparar as alterações vasculares entre os grupos.<sup>135</sup> Com isso, apesar de alguns pacientes terem sido

submetidos à angiofluoresceinografia nas visitas de seguimento, não foi possível analisar essa variável.

Nenhum caso de endoftalmite ou pseudo-endoftalmite foi diagnosticado. Este achado é compatível com dados na literatura, devido à raridade dessas complicações secundária a injeção intravítrea<sup>136</sup> e à obediência da realização dos procedimentos às diretrizes estabelecidas.<sup>110</sup>

Evidenciamos, no estudo de curto prazo, uma ação mais precoce de 1,25 mg de bevacizumabe injetado intravítreo em pacientes sem o genótipo de risco. Esses resultados sugerem que o perfil do genótipo do *CFH* pode exercer influência sobre a farmacodinâmica do bevacizumabe intravítreo para DMRI exsudativa.

No estudo de longo prazo, observamos que a presença do alelo de risco está relacionado à ausência de melhora visual ao longo de um ano de tratamento com antiangiogênicos. Observamos que os pacientes incluídos no presente estudo receberam injeções intravítreas de inibidores de VEGF numa frequência semelhante a dos estudos que evidenciaram uma relação entre o genótipo e a evolução da acuidade visual, e menor que a dos que não encontraram esse efeito.

É possível que as diferenças encontradas quanto à evolução da acuidade visual ao longo de um ano de acompanhamento estejam relacionadas à gravidade da própria DMRI exsudativa, da mesma forma que o genótipo do *CFH* influencia a história natural da DMRI quanto à evolução para as formas graves.<sup>92</sup> Dessa forma, um regime de tratamento com maior adesão ao tratamento e maior número de injeções ao longo do primeiro ano de acompanhamento talvez esteja relacionado a

uma supressão dos efeitos dos genótipos de risco do *CFH* sobre a evolução da doença.

Considerando os resultados conflitantes sobre a influência do polimorfismo Y402H do gene *CFH* em relação à resposta ao tratamento da DMRI com antiangiogênicos, a utilização deste isoladamente provavelmente não apresenta ainda acurácia suficiente para prever a resposta de um indivíduo ao tratamento. Mais estudos serão necessários para esclarecer a farmacogenética dos antiangiogênicos para DMRI exsudativa e orientar possivelmente a escolha do tratamento de acordo com o genótipo. Estabelecer uma combinação de polimorfismos preditivos com marcadores clínicos e patológicos provavelmente será útil para guiar o acompanhamento de pacientes no regime PRN.

## **6. CONCLUSÕES**



*Conclusão principal:*

Observou-se que as variantes do polimorfismo Y402H do gene *CFH* exercem efeito farmacogenético nesse grupo de pacientes brasileiros, influenciando negativamente a resposta ao tratamento da DMRI exsudativa com antiangiogênicos.

*Conclusões secundárias:*

A injeção intravítrea de 1,25 mg de bevacizumabe apresentou uma ação sobre a melhora da acuidade visual, avaliada em uma e quatro semanas, mais precoce em pacientes com os genótipos CT e TT do polimorfismo Y402H do gene *CFH*, do que naqueles com o genótipo CC. Houve redução significativa da espessura retiniana central no mesmo período somente nos grupos CT e TT.

O alelo de risco C esteve relacionado à ausência de melhora da acuidade visual e espessura retiniana central de pacientes com DMRI exsudativa acompanhados por um ano em uso de inibidores do VEGF no regime PRN, tendo sido detectada melhora funcional e morfológica significativa somente na ausência deste alelo de risco. Nesse grupo de pacientes brasileiros, não foi evidenciado efeito das variantes do polimorfismo Y402H do gene *CFH* sobre o número de injeções intravítreas, persistência de atividade neovascular e percepção subjetiva de melhora no período de acompanhamento.



## **7. REFERÊNCIAS**



1. Age-Related Eye Disease Study Research G. The Age-Related Eye Disease Study system for classifying age-related macular degeneration from stereoscopic color fundus photographs: the Age-Related Eye Disease Study Report Number 6. *American journal of ophthalmology*. 2001; **132**(5): 668-81.
2. Seddon JM, Chen CA. Epidemiology of Age-related Macular Degeneration. In: Ryan SJ, Schchat AP, editors. *Retina*. Los Angeles, CA, USA: Elsevier; 2006. p. 1017-8.
3. Leibowitz HM, Krueger DE, Maunder LR, Milton RC, Kini MM, Kahn HA, et al. The Framingham Eye Study monograph: An ophthalmological and epidemiological study of cataract, glaucoma, diabetic retinopathy, macular degeneration, and visual acuity in a general population of 2631 adults, 1973-1975. *Survey of ophthalmology*. 1980; **24**(Suppl): 335-610.
4. Klaver CC, Wolfs RC, Vingerling JR, Hofman A, de Jong PT. Age-specific prevalence and causes of blindness and visual impairment in an older population: the Rotterdam Study. *Archives of ophthalmology*. 1998; **116**(5): 653-8.
5. Klein R, Chou CF, Klein BE, Zhang X, Meuer SM, Saaddine JB. Prevalence of age-related macular degeneration in the US population. *Archives of ophthalmology*. 2011; **129**(1): 75-80.
6. Kawasaki R, Yasuda M, Song SJ, Chen SJ, Jonas JB, Wang JJ, et al. The prevalence of age-related macular degeneration in Asians: a systematic review and meta-analysis. *Ophthalmology*. 2010; **117**(5): 921-7.

7. Owen CG, Jarrar Z, Wormald R, Cook DG, Fletcher AE, Rudnicka AR. The estimated prevalence and incidence of late stage age related macular degeneration in the UK. *The British journal of ophthalmology*. 2012; **96**(5): 752-6.
8. Klein R, Klein BE, Knudtson MD, Meuer SM, Swift M, Gangnon RE. Fifteen-year cumulative incidence of age-related macular degeneration: the Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology*. 2007; **114**(2): 253-62.
9. Santos L, Diniz J, Leão A, Sena MI. Degeneração macular relacionada à idade: prevalência e fatores de risco em dois centros oftalmológicos de referência em Pernambuco. *Arq Bras Oftalmol* 2005;68(2):229-33.
10. Oguido AP. Prevalência da maculopatia relacionada à idade, em japonesa e descendentes, na cidade de Londrina-PR. Tese de mestrado - Londrina; sn; 2004 86 p tab, ilustr.
11. Mitchell P, Smith W, Attebo K, Wang JJ. Prevalence of age-related maculopathy in Australia. The Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology*. 1995; **102**(10): 1450-60.
12. Rudnicka AR, Jarrar Z, Wormald R, Cook DG, Fletcher A, Owen CG. Age and gender variations in age-related macular degeneration prevalence in populations of European ancestry: a meta-analysis. *Ophthalmology*. 2012; **119**(3): 571-80.
13. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo, 2010. Brasília, DF, 2010. Disponível em: <[http://www.censo2010.ibge.gov.br/dados\\_divulgados/](http://www.censo2010.ibge.gov.br/dados_divulgados/)>. Acesso em: 17 nov. 2012.

14. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Diretoria de Pesquisas. Coordenação de População e Indicadores Sociais. Gerência de Estudos e Análises da Dinâmica Demográfica. Projeção da População do Brasil por Sexo e Idade para o Período 1980-2050 - Revisão 2008.
15. Yang K, Liang YB, Gao LQ, Peng Y, Shen R, Duan XR, et al. Prevalence of age-related macular degeneration in a rural Chinese population: the Handan Eye Study. *Ophthalmology*. 2011; **118**(7): 1395-401.
16. Moon BG, Joe SG, Hwang JU, Kim HK, Choe J, Yoon YH. Prevalence and risk factors of early-stage age-related macular degeneration in patients examined at a health promotion center in Korea. *Journal of Korean medical science*. 2012; **27**(5): 537-41.
17. Krishnaiah S, Das T, Nirmalan PK, Nutheti R, Shamanna BR, Rao GN, et al. Risk factors for age-related macular degeneration: findings from the Andhra Pradesh eye disease study in South India. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2005; **46**(12): 4442-9.
18. Klein R, Klein BE, Moss SE. Relation of smoking to the incidence of age-related maculopathy. The Beaver Dam Eye Study. *American journal of epidemiology*. 1998; **147**(2): 103-10.
19. Friedman DS, Katz J, Bressler NM, Rahmani B, Tielsch JM. Racial differences in the prevalence of age-related macular degeneration: the Baltimore Eye Survey. *Ophthalmology*. 1999; **106**(6): 1049-55.
20. Bressler SB, Munoz B, Solomon SD, West SK, Salisbury Eye Evaluation Study T. Racial differences in the prevalence of age-related macular degeneration: the Salisbury Eye Evaluation (SEE) Project. *Archives of ophthalmology*. 2008; **126**(2): 241-5.

21. Farah M, Oshima A, Costa R, Sallum J. Degeneração macular relacionada à idade: modalidades terapêuticas. *Arq Bras Oftalmol* 2001;64:583-8.
22. Bressler N. Age-related macular degeneration is the leading cause of blindness... *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2004; **21**(291): 1900-1.
23. Age-Related Eye Disease Study Research G. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS report no. 8. *Archives of ophthalmology*. 2001; **119**(10): 1417-36.
24. Bird AC, Bressler NM, Bressler SB, Chisholm IH, Coscas G, Davis MD, et al. An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. The International ARM Epidemiological Study Group. *Survey of ophthalmology*. 1995; **39**(5): 367-74.
25. Watzke RC, Klein ML, Hiner CJ, Chan BK, Kraemer DF. A comparison of stereoscopic fluorescein angiography with indocyanine green videoangiography in age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. 2000; **107**(8): 1601-6.
26. Olsen TW, Feng X, Kasper TJ, Rath PP, Steuer ER. Fluorescein angiographic lesion type frequency in neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. 2004; **111**(2): 250-5.
27. Cohen SY, Creuzot-Garcher C, Darmon J, Desmettre T, Korobelnik JF, Levrat F, et al. Types of choroidal neovascularisation in newly diagnosed exudative age-related macular degeneration. *The British journal of ophthalmology*. 2007; **91**(9): 1173-6.

28. Zawinka C, Ergun E, Stur M. Prevalence of patients presenting with neovascular age-related macular degeneration in an urban population. *Retina*. 2005; **25**(3): 324-31.
29. Smith W, Assink J, Klein R, Mitchell P, Klaver CC, Klein BE, et al. Risk factors for age-related macular degeneration: Pooled findings from three continents. *Ophthalmology*. 2001; **108**(4): 697-704.
30. Yehoshua Z, Rosenfeld PJ. Strategies for following dry age-related macular degeneration. *Ophthalmic research*. 2012; **48 Suppl 1**: 6-10.
31. Green WR, McDonnell PJ, Yeo JH. Pathologic features of senile macular degeneration. *Ophthalmology*. 1985; **92**(5): 615-27.
32. 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.
33. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocrine reviews*. 2004; **25**(4): 581-611.
34. Kvanta A, Algvere PV, Berglin L, Seregard S. Subfoveal fibrovascular membranes in age-related macular degeneration express vascular endothelial growth factor. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1996; **37**(9): 1929-34.
35. Adamis AP, Shima DT. The role of vascular endothelial growth factor in ocular health and disease. *Retina*. 2005; **25**(2): 111-8.
36. Anderson DH, Mullins RF, Hageman GS, Johnson LV. A role for local inflammation in the formation of drusen in the aging eye. *American journal of ophthalmology*. 2002; **134**(3): 411-31.

37. Reynolds R, Hartnett ME, Atkinson JP, Giclas PC, Rosner B, Seddon JM. Plasma complement components and activation fragments: associations with age-related macular degeneration genotypes and phenotypes. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2009; **50**(12): 5818-27.
38. Loyet KM, Deforge LE, Katschke KJ, Jr., Diehl L, Graham RR, Pao L, et al. Activation of the Alternative Complement Pathway in Vitreous is Controlled by Genetics in Age-related Macular Degeneration. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2012.
39. Silva AS, Teixeira AG, Bavia L, Lin F, Velletri R, Belfort R, Jr., et al. Plasma levels of complement proteins from the alternative pathway in patients with age-related macular degeneration are independent of Complement Factor H Tyr(4)(0)(2)His polymorphism. *Molecular vision*. 2012; **18**: 2288-99.
40. Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, Tsai JY, Sackler RS, Haynes C, et al. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science*. 2005; **308**(5720): 385-9.
41. den Dunnen JT, Antonarakis SE. Nomenclature for the description of human sequence variations. *Human genetics*. 2001; **109**(1): 121-4.
42. Goverdhan SV, Lotery AJ, Cree AJ, Ye S. Complement factor H Y402H gene polymorphism in coronary artery disease and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2006; **188**(1): 213-4.
43. Rodriguez de Cordoba S, Esparza-Gordillo J, Goicoechea de Jorge E, Lopez-Trascasa M, Sanchez-Corral P. The human complement factor H: functional roles, genetic variations and disease associations. *Molecular immunology*. 2004; **41**(4): 355-67.

44. Francois J. [The inheritance of senile macule degeneration]. *Ophthalmologica Journal international d'ophtalmologie International journal of ophthalmology Zeitschrift fur Augenheilkunde*. 1977; **175**(2): 67-72.
45. Liu MM, Chan CC, Tuo J. Genetic mechanisms and age-related macular degeneration: common variants, rare variants, copy number variations, epigenetics, and mitochondrial genetics. *Human genomics*. 2012; **6**: 13.
46. Edwards AO, Ritter R, 3rd, Abel KJ, Manning A, Panhuysen C, Farrer LA. Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science*. 2005; **308**(5720): 421-4.
47. Fisher SA, Rivera A, Fritsche LG, Babadjanova G, Petrov S, Weber BH. Assessment of the contribution of CFH and chromosome 10q26 AMD susceptibility loci in a Russian population isolate. *The British journal of ophthalmology*. 2007; **91**(5): 576-8.
48. Simonelli F, Frisso G, Testa F, di Fiore R, Vitale DF, Manitto MP, et al. Polymorphism p.402Y>H in the complement factor H protein is a risk factor for age related macular degeneration in an Italian population. *The British journal of ophthalmology*. 2006; **90**(9): 1142-5.
49. Souied EH, Leveziel N, Richard F, Dragon-Durey MA, Coscas G, Soubrane G, et al. Y402H complement factor H polymorphism associated with exudative age-related macular degeneration in the French population. *Molecular vision*. 2005; **11**: 1135-40.
50. Lau LI, Chen SJ, Cheng CY, Yen MY, Lee FL, Lin MW, et al. Association of the Y402H polymorphism in complement factor H gene and neovascular age-related macular degeneration in Chinese patients. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2006; **47**(8): 3242-6.

51. Kaur I, Hussain A, Hussain N, Das T, Pathangay A, Mathai A, et al. Analysis of CFH, TLR4, and APOE polymorphism in India suggests the Tyr402His variant of CFH to be a global marker for age-related macular degeneration. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2006; **47**(9): 3729-35.
52. Chowers I, Cohen Y, Goldenberg-Cohen N, Vicuna-Kojchen J, Lichtinger A, Weinstein O, et al. Association of complement factor H Y402H polymorphism with phenotype of neovascular age related macular degeneration in Israel. *Molecular vision*. 2008; **14**: 1829-34.
53. Almeida LN, Melilo-Carolino R, Veloso CE, Pereira PA, Bastos-Rodrigues L, Sarubi H, et al. Association Analysis of CFH and ARMS2 Gene Polymorphisms in a Brazilian Cohort with Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmic research*. 2013; **50**(2): 117-22.
54. Hageman GS, Anderson DH, Johnson LV, Hancox LS, Taiber AJ, Hardisty LI, et al. A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005; **102**(20): 7227-32.
55. Shuler RK, Jr., Hauser MA, Caldwell J, Gallins P, Schmidt S, Scott WK, et al. Neovascular age-related macular degeneration and its association with LOC387715 and complement factor H polymorphism. *Archives of ophthalmology*. 2007; **125**(1): 63-7.
56. Jakobsdottir J, Conley YP, Weeks DE, Mah TS, Ferrell RE, Gorin MB. Susceptibility genes for age-related maculopathy on chromosome 10q26. *American journal of human genetics*. 2005; **77**(3): 389-407.
57. Churchill AJ, Carter JG, Lovell HC, Ramsden C, Turner SJ, Yeung A, et al. VEGF polymorphisms are associated with neovascular age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet*. 2006; **15**(19): 2955-61.

58. Almeida LN, Melilo-Carolino R, Veloso CE, Pereira PA, Miranda DM, De Marco LA, et al. Homozygosity for the +674C>T polymorphism on VEGF gene is associated with age-related macular degeneration in a Brazilian cohort. Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie. 2011.
59. Spencer KL, Hauser MA, Olson LM, Schmidt S, Scott WK, Gallins P, et al. Protective effect of complement factor B and complement component 2 variants in age-related macular degeneration. Hum Mol Genet. 2007; **16**(16): 1986-92.
60. Gold B, Merriam JE, Zernant J, Hancox LS, Taiber AJ, Gehrs K, et al. Variation in factor B (BF) and complement component 2 (C2) genes is associated with age-related macular degeneration. Nature genetics. 2006; **38**(4): 458-62.
61. Anastasopoulos E, Kakoulidou A, Coleman AL, Sinsheimer JS, Wilson MR, Yu F, et al. Association of Sequence Variation in the CX3CR1 Gene With Geographic Atrophy Age-Related Macular Degeneration in a Greek Population. Current eye research. 2012.
62. Aiello LP, Pierce EA, Foley ED, Takagi H, Chen H, Riddle L, et al. Suppression of retinal neovascularization in vivo by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1995; **92**(23): 10457-61.
63. Krzystolik MG, Afshari MA, Adamis AP, Gaudreault J, Gragoudas ES, Michaud NA, et al. Prevention of experimental choroidal neovascularization with intravitreal anti-vascular endothelial growth factor antibody fragment. Archives of ophthalmology. 2002; **120**(3): 338-46.

64. Kaiser PK. Antivascular endothelial growth factor agents and their development: therapeutic implications in ocular diseases. *American journal of ophthalmology*. 2006; **142**(4): 660-8.
65. Curtis LH, Hammill BG, Qualls LG, DiMartino LD, Wang F, Schulman KA, et al. Treatment patterns for neovascular age-related macular degeneration: analysis of 284 380 medicare beneficiaries. *American journal of ophthalmology*. 2012; **153**(6): 1116-24 e1.
66. Moisseiev J, Alhalel A, Masuri R, Treister G. The impact of the macular photocoagulation study results on the treatment of exudative age-related macular degeneration. *Archives of ophthalmology*. 1995; **113**(2): 185-9.
67. Photodynamic therapy of subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration with verteporfin: one-year results of 2 randomized clinical trials--TAP report. Treatment of age-related macular degeneration with photodynamic therapy (TAP) Study Group. *Archives of ophthalmology*. 1999; **117**(10): 1329-45.
68. Verteporfin In Photodynamic Therapy Study G. Verteporfin therapy of subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration: two-year results of a randomized clinical trial including lesions with occult with no classic choroidal neovascularization--verteporfin in photodynamic therapy report 2. *American journal of ophthalmology*. 2001; **131**(5): 541-60.
69. Bressler NM. Verteporfin therapy of subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration: two-year results of a randomized clinical trial including lesions with occult with no classic choroidal neovascularization-verteporfin in photodynamic therapy report 2. *American journal of ophthalmology*. 2002; **133**(1): 168-9.

70. Gragoudas ES, Adamis AP, Cunningham ET, Jr., Feinsod M, Guyer DR, Group VISiONCT. Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *The New England journal of medicine*. 2004; **351**(27): 2805-16.
71. Ferrara N, Hillan KJ, Gerber HP, Novotny W. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nature reviews Drug discovery*. 2004; **3**(5): 391-400.
72. Michels S, Rosenfeld PJ, Puliafito CA, Marcus EN, Venkatraman AS. Systemic bevacizumab (Avastin) therapy for neovascular age-related macular degeneration twelve-week results of an uncontrolled open-label clinical study. *Ophthalmology*. 2005; **112**(6): 1035-47.
73. Rosenfeld PJ, Moshfeghi AA, Puliafito CA. Optical coherence tomography findings after an intravitreal injection of bevacizumab (avastin) for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmic surgery, lasers & imaging : the official journal of the International Society for Imaging in the Eye*. 2005; **36**(4): 331-5.
74. Manzano RP, Peyman GA, Khan P, Kivilcim M. Testing intravitreal toxicity of bevacizumab (Avastin). *Retina*. 2006; **26**(3): 257-61.
75. Avery RL, Pieramici DJ, Rabena MD, Castellarin AA, Nasir MA, Giust MJ. Intravitreal bevacizumab (Avastin) for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. 2006; **113**(3): 363-72 e5.
76. Spaide RF, Laud K, Fine HF, Klancnik JM, Jr., Meyerle CB, Yannuzzi LA, et al. Intravitreal bevacizumab treatment of choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. *Retina*. 2006; **26**(4): 383-90.
77. Michels S, Rosenfeld PJ. [Treatment of neovascular age-related macular degeneration with Ranibizumab/Lucentis]. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde*. 2005; **222**(6): 480-4.

78. Rosenfeld PJ, Brown DM, Heier JS, Boyer DS, Kaiser PK, Chung CY, et al. Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *The New England journal of medicine*. 2006; **355**(14): 1419-31.
79. Boyer DS, Antoszyk AN, Awh CC, Bhisitkul RB, Shapiro H, Acharya NR, et al. Subgroup analysis of the MARINA study of ranibizumab in neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. 2007; **114**(2): 246-52.
80. Brown DM, Kaiser PK, Michels M, Soubrane G, Heier JS, Kim RY, et al. Ranibizumab versus verteporfin for neovascular age-related macular degeneration. *The New England journal of medicine*. 2006; **355**(14): 1432-44.
81. Brown DM, Michels M, Kaiser PK, Heier JS, Sy JP, Ianchulev T, et al. Ranibizumab versus verteporfin photodynamic therapy for neovascular age-related macular degeneration: Two-year results of the ANCHOR study. *Ophthalmology*. 2009; **116**(1): 57-65 e5.
82. Heier JS, Brown DM, Chong V, Korobelnik JF, Kaiser PK, Nguyen QD, et al. Intravitreal aflibercept (VEGF trap-eye) in wet age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. 2012; **119**(12): 2537-48.
83. Lalwani GA, Rosenfeld PJ, Fung AE, Dubovy SR, Michels S, Feuer W, et al. A variable-dosing regimen with intravitreal ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration: year 2 of the PrONTO Study. *American journal of ophthalmology*. 2009; **148**(1): 43-58 e1.
84. Holz FG, Amoaku W, Donate J, Guymer RH, Kellner U, Schlingemann RO, et al. Safety and efficacy of a flexible dosing regimen of ranibizumab in neovascular age-related macular degeneration: the SUSTAIN study. *Ophthalmology*. 2011; **118**(4): 663-71.

85. Investigators IS, Chakravarthy U, Harding SP, Rogers CA, Downes SM, Lotery AJ, et al. Ranibizumab versus bevacizumab to treat neovascular age-related macular degeneration: one-year findings from the IVAN randomized trial. *Ophthalmology*. 2012; **119**(7): 1399-411.
86. Group CR, Martin DF, Maguire MG, Ying GS, Grunwald JE, Fine SL, et al. Ranibizumab and bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration. *The New England journal of medicine*. 2011; **364**(20): 1897-908.
87. Comparison of Age-related Macular Degeneration Treatments Trials Research G, Martin DF, Maguire MG, Fine SL, Ying GS, Jaffe GJ, et al. Ranibizumab and bevacizumab for treatment of neovascular age-related macular degeneration: two-year results. *Ophthalmology*. 2012; **119**(7): 1388-98.
88. Munk M, Kiss C, Huf W, Sulzbacher F, Bolz M, Sayegh R, et al. Therapeutic Interventions for Macular Diseases Show Characteristic Effects on near and Distance Visual Function. *Retina*. 2013.
89. Koch KR, Muether PS, Hermann MM, Hoerster R, Kirchhof B, Fauser S. Subjective perception versus objective outcome after intravitreal ranibizumab for exudative AMD. *Graefes archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie*. 2012; **250**(2): 201-9.
90. Djordjevic N, Carrillo JA, Ueda N, Gervasini G, Fukasawa T, Suda A, et al. N-Acetyltransferase-2 (NAT2) gene polymorphisms and enzyme activity in Serbs: unprecedented high prevalence of rapid acetylators in a White population. *Journal of clinical pharmacology*. 2011; **51**(7): 994-1003.

91. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *The Journal of clinical investigation*. 1990; **86**(4): 1343-6.
92. Seddon JM, Francis PJ, George S, Schultz DW, Rosner B, Klein ML. Association of CFH Y402H and LOC387715 A69S with progression of age-related macular degeneration. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2007; **297**(16): 1793-800.
93. Klein ML, Francis PJ, Rosner B, Reynolds R, Hamon SC, Schultz DW, et al. CFH and LOC387715/ARMS2 genotypes and treatment with antioxidants and zinc for age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. 2008; **115**(6): 1019-25.
94. Haines JL, Hauser MA, Schmidt S, Scott WK, Olson LM, Gallins P, et al. Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. *Science*. 2005; **308**(5720): 419-21.
95. Brantley MA, Jr., Edelstein SL, King JM, Plotzke MR, Apte RS, Kymes SM, et al. Association of complement factor H and LOC387715 genotypes with response of exudative age-related macular degeneration to photodynamic therapy. *Eye*. 2009; **23**(3): 626-31.
96. Goverdhan SV, Hannan S, Newsom RB, Luff AJ, Griffiths H, Lotery AJ. An analysis of the CFH Y402H genotype in AMD patients and controls from the UK, and response to PDT treatment. *Eye*. 2008; **22**(6): 849-54.
97. Brantley MA, Jr., Fang AM, King JM, Tewari A, Kymes SM, Shiels A. Association of complement factor H and LOC387715 genotypes with response of exudative age-related macular degeneration to intravitreal bevacizumab. *Ophthalmology*. 2007; **114**(12): 2168-73.

98. Lee AY, Raya AK, Kymes SM, Shiels A, Brantley MA, Jr. Pharmacogenetics of complement factor H (Y402H) and treatment of exudative age-related macular degeneration with ranibizumab. *The British journal of ophthalmology*. 2009; **93**(5): 610-3.
99. McKibbin M, Ali M, Bansal S, Baxter PD, West K, Williams G, et al. CFH, VEGF and HTRA1 promoter genotype may influence the response to intravitreal ranibizumab therapy for neovascular age-related macular degeneration. *The British journal of ophthalmology*. 2012; **96**(2): 208-12.
100. Seitsonen SP, Jarvela IE, Meri S, Tommila PV, Ranta PH, Immonen IJ. The effect of complement factor H Y402H polymorphism on the outcome of photodynamic therapy in age-related macular degeneration. *European journal of ophthalmology*. 2007; **17**(6): 943-9.
101. Nischler C, Oberkofler H, Ortner C, Paikl D, Riha W, Lang N, et al. Complement factor H Y402H gene polymorphism and response to intravitreal bevacizumab in exudative age-related macular degeneration. *Acta ophthalmologica*. 2011; **89**(4): e344-9.
102. Tian J, Qin X, Fang K, Chen Q, Hou J, Li J, et al. Association of genetic polymorphisms with response to bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration in the Chinese population. *Pharmacogenomics*. 2012; **13**(7): 779-87.
103. Kloeckener-Gruissem B, Barthelmes D, Labs S, Schindler C, Kurz-Levin M, Michels S, et al. Genetic association with response to intravitreal ranibizumab in patients with neovascular AMD. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2011; **52**(7): 4694-702.

104. Francis PJ. The influence of genetics on response to treatment with ranibizumab (Lucentis) for age-related macular degeneration: the lucentis genotype study (an American Ophthalmological Society thesis). Transactions of the American Ophthalmological Society. 2011; **109**: 115-56.
105. Chen H YK, Xu GZ. Association between variant Y402H in age-related macular degeneration (AMD) susceptibility gene CFH and treatment response of AMD: a meta-analysis. PloS one. 2012; **7**(8).
106. Orlin A HD, Chang W, Ho AC, Brown G, Kaiser RS, Regillo CD, Godshalk AN, Lier A, Kaderli B, Stambolian D. Association between high-risk disease loci and response to anti-vascular endothelial growth factor treatment for wet age-related macular degeneration. Retina. 2012; **32**(1): 4-9.
107. Hagstrom SA, Ying GS, Pauer GJ, Sturgill-Short GM, Huang J, Callanan DG, et al. Pharmacogenetics for Genes Associated with Age-Related Macular Degeneration in the Comparison of AMD Treatments Trials (CATT). Ophthalmology. 2013.
108. Braghini CA, Neshich IA, Neshich G, Soardi FC, de Mello MP, Costa VP, et al. New mutation in the myocilin gene segregates with juvenile-onset open-angle glaucoma in a Brazilian family. Gene. 2013; **523**(1): 50-7.
109. Della Paolera M, de Vasconcellos JP, Umbelino CC, Kasahara N, Rocha MN, Richeti F, et al. CYP1B1 gene analysis in primary congenital glaucoma Brazilian patients: novel mutations and association with poor prognosis. Journal of glaucoma. 2010; **19**(3): 176-82.
110. Aiello LP, Brucker AJ, Chang S, Cunningham ET, Jr., D'Amico DJ, Flynn HW, Jr., et al. Evolving guidelines for intravitreal injections. Retina. 2004; **24**(5 Suppl): S3-19.

111. Hyman L, Neborsky R. Risk factors for age-related macular degeneration: an update. *Current opinion in ophthalmology*. 2002; **13**(3): 171-5.
112. Skerka C, Lauer N, Weinberger AA, Keilhauer CN, Suhnel J, Smith R, et al. Defective complement control of factor H (Y402H) and FHL-1 in age-related macular degeneration. *Molecular immunology*. 2007; **44**(13): 3398-406.
113. Laine M, Jarva H, Seitsonen S, Haapasalo K, Lehtinen MJ, Lindeman N, et al. Y402H polymorphism of complement factor H affects binding affinity to C-reactive protein. *Journal of immunology*. 2007; **178**(6): 3831-6.
114. Parmeggiani F, Costagliola C, Gemmati D, D'Angelo S, Perri P, Scapoli GL, et al. Predictive role of coagulation-balance gene polymorphisms in the efficacy of photodynamic therapy with verteporfin for classic choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. *Pharmacogenetics and genomics*. 2007; **17**(12): 1039-46.
115. Lechanteur YT, van de Ven JP, Smailhodzic D, Boon CJ, Klevering BJ, Fauser S, et al. Genetic, behavioral, and sociodemographic risk factors for second eye progression in age-related macular degeneration. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2012; **53**(9): 5846-52.
116. Klein BE, Howard KP, Lee KE, Iyengar SK, Sivakumaran TA, Klein R. The relationship of cataract and cataract extraction to age-related macular degeneration: the Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology*. 2012; **119**(8): 1628-33.
117. Weiter JJ, Delori FC, Wing GL, Fitch KA. Relationship of senile macular degeneration to ocular pigmentation. *American journal of ophthalmology*. 1985; **99**(2): 185-7.

118. Brockmann C, Brockmann T, Dawczynski J. Influence of seasonal sunlight intensity and iris color on the anti-VEGF therapy for neovascular age-related macular degeneration. *Eye*. 2013.
119. Zarepari S, Branham KE, Li M, Shah S, Klein RJ, Ott J, et al. Strong association of the Y402H variant in complement factor H at 1q32 with susceptibility to age-related macular degeneration. *American journal of human genetics*. 2005; **77**(1): 149-53.
120. Sepp T, Khan JC, Thurlby DA, Shahid H, Clayton DG, Moore AT, et al. Complement factor H variant Y402H is a major risk determinant for geographic atrophy and choroidal neovascularization in smokers and nonsmokers. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2006; **47**(2): 536-40.
121. Lim LA, Frost NA, Powell RJ, Hewson P. Comparison of the ETDRS logMAR, 'compact reduced logMar' and Snellen charts in routine clinical practice. *Eye*. 2010; **24**(4): 673-7.
122. Falkenstein IA, Cochran DE, Azen SP, Dustin L, Tammewar AM, Kozak I, et al. Comparison of visual acuity in macular degeneration patients measured with snellen and early treatment diabetic retinopathy study charts. *Ophthalmology*. 2008; **115**(2): 319-23.
123. Krebs I, Smretschig E, Moussa S, Brannath W, Womastek I, Binder S. Quality and reproducibility of retinal thickness measurements in two spectral-domain optical coherence tomography machines. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2011; **52**(9): 6925-33.
124. Heussen FM, Ouyang Y, McDonnell EC, Narala R, Ruiz-Garcia H, Walsh AC, et al. Comparison of manually corrected retinal thickness measurements from multiple spectral-domain optical coherence tomography instruments. *The British journal of ophthalmology*. 2012; **96**(3): 380-5.

125. Thakkinstian A, Han P, McEvoy M, Smith W, Hoh J, Magnusson K, et al. Systematic review and meta-analysis of the association between complement factor H Y402H polymorphisms and age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet.* 2006; **15**(18): 2784-90.
126. Almeida L. Associação de polimorfismos nos genes CFH, LOC387715 e VEGF com a degeneração macular relacionada à idade. Tese de doutorado - UFMG. 2012.
127. Schalnus R, Meyer CH, Kuhli-Hattenbach C, Luchtenberg M. Time between symptom onset and assessment in age-related macular degeneration with subfoveal choroidal neovascularization. *Ophthalmologica Journal international d'ophtalmologie International journal of ophthalmology Zeitschrift fur Augenheilkunde.* 2010; **224**(3): 176-82.
128. Gangnon RE, Lee KE, Klein BE, Iyengar SK, Sivakumaran TA, Klein R. Effect of the Y402H Variant in the Complement Factor H Gene on the Incidence and Progression of Age-Related Macular Degeneration: Results From Multistate Models Applied to the Beaver Dam Eye Study. *Archives of ophthalmology.* 2012; **130**(9): 1169-76.
129. Bolz M, Simader C, Ritter M, Ahlers C, Benesch T, Prunte C, et al. Morphological and functional analysis of the loading regimen with intravitreal ranibizumab in neovascular age-related macular degeneration. *The British journal of ophthalmology.* 2010; **94**(2): 185-9.
130. Ferraz D, Bressanim G, Takahashi B, Pelayes D, Takahashi W. Three-monthly intravitreal bevacizumab injections for neovascular age-related macular degeneration: short-term visual acuity results. *European journal of ophthalmology.* 2010; **20**(4): 740-4.

131. Menghini M, Kloeckener-Gruissem B, Fleischhauer J, Kurz-Levin MM, Sutter FK, Berger W, et al. Impact of loading phase, initial response and CFH genotype on the long-term outcome of treatment for neovascular age-related macular degeneration. *PloS one*. 2012; **7**(7): e42014.
132. Nunes RP, Nobrega MJ, De Novelli FJ, Coral SA, Berti TB, Missen MM, et al. Causes of interruption of bevacizumab therapy in age-related macular degeneration. *Arquivos brasileiros de oftalmologia*. 2010; **73**(2): 146-9.
133. Lala C, Framme C, Wolf-Schnurrbusch UE, Wolf S. Three-year results of visual outcome with disease activity-guided ranibizumab algorithm for the treatment of exudative age-related macular degeneration. *Acta ophthalmologica*. 2012.
134. Lira RP, Oliveira CL, Marques MV, Silva AR, Pessoa Cde C. Adverse reactions of fluorescein angiography: a prospective study. *Arquivos brasileiros de oftalmologia*. 2007; **70**(4): 615-8.
135. Tran TH, Querques G, Forzy G, Souied EH. Angiographic regression patterns after intravitreal ranibizumab injections for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmic surgery, lasers & imaging : the official journal of the International Society for Imaging in the Eye*. 2011; **42**(6): 498-508.
136. Jager RD, Aiello LP, Patel SC, Cunningham ET, Jr. Risks of intravitreal injection: a comprehensive review. *Retina*. 2004; **24**(5): 676-98.

# ANEXOS



## Anexo A

### PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

[www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html](http://www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html)

CEP, 03/02/10.  
(Grupo II)

**PARECER CEP:** N° 981/2009 (Este n° deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)  
**CAAE:** 0762.0.146.000-09

#### I - IDENTIFICAÇÃO:

**PROJETO:** “ASSOCIAÇÃO DOS GENÓTIPOS DO FATOR DE COMPLEMENTO H COM A RESPOSTA AO TRATAMENTO DA DEGENERACÃO MACULAR RELACIONADA À IDADE COM BEVACIZUMAB E RANIBIZUMAB”.

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Flávio Mac Cord Medina

**INSTITUIÇÃO:** Hospital das Clínicas/UNICAMP

**APRESENTAÇÃO AO CEP:** 13/10/2009

**APRESENTAR RELATÓRIO EM:** 03/02/11 (O formulário encontra-se no *site* acima)

#### II - OBJETIVOS

Avaliar a influência dos genótipos do CFH no desenvolvimento da Degeneração Macular Relacionada à Idade (DMRI), assim como a associação desses genótipos com a resposta ao tratamento da DMRI com bevacizumab e ranibizumab na população brasileira.

#### III - SUMÁRIO

O presente projeto consiste em uma tese de doutorado em que o autor deseja investigar a influência dos genótipos do CFH no desenvolvimento da Degeneração Macular Relacionada à Idade (DMRI) na população brasileira e também a associação desses genótipos com a resposta ao tratamento com bevacizumab e ranibizumab. Ele informa não haver esse tipo de estudo na população do Brasil e acredita que, mediante os resultados desta pesquisa, poderá contribuir para as decisões terapêuticas e de seguimento de pacientes com DMRI, uma vez que a população brasileira apresenta um padrão genético próprio. Serão recrutados dentro da Instituição 40 sujeitos. Eles receberão um questionário com perguntas referentes a antecedentes patológicos oculares e sistêmicos, história familiar de doença ocular, tabagismo, dieta e exposição solar. Todos os participantes realizarão exame oftalmológico que inclui medida da acuidade visual, refração, avaliação com tela de Amsler, teste de sensibilidade ao contraste, biomicroscopia e fundoscopia. Serão colhidas amostras de sangue, que serão armazenadas no Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética da UNICAMP. Estas amostras serão utilizadas exclusivamente para a finalidade prevista no projeto. As coletas de sangue serão realizadas durante o atendimento ambulatorial.

#### IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Após respostas às pendências, o projeto encontra-se adequadamente redigido e de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP  
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126  
Caixa Postal 6111  
13083-887 Campinas - SP

FONE (019) 3521-8936  
FAX (019) 3521-7187  
cep@fcm.unicamp.br



## V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

## VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

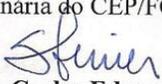
O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

## VII- DATA DA REUNIÃO

Homologado na X Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 27 de outubro de 2009.

  
**Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner**

PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP

## Anexo B

---

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS - UNICAMP  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP  
(0\_19) 3521-8936  
FAX (0\_19) 3521-7187  
[www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html](http://www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html)  
[cep@fcm.unicamp.br](mailto:cep@fcm.unicamp.br)

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) a participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado(a) de forma alguma.

Título do projeto: **Associação dos genótipos do fator de complemento H com a resposta ao tratamento da degeneração macular relacionada à idade com bevacizumabe e ranibizumabe**

Investigador principal: Dr. Flávio Mac Cord Medina

Telefone para contato: (19) 3521-8907

#### OBJETIVO DA PESQUISA:

Eu entendo que fui convidado(a) a participar de um projeto de pesquisa envolvendo pacientes com degeneração macular relacionada à idade. O objetivo geral do estudo é identificar genes que participem da resposta ao tratamento da degeneração macular relacionada à idade em nossa amostra de pacientes. Esses estudos poderão levantar dados que possibilitarão um conhecimento mais aprofundado sobre a degeneração macular relacionada à idade, doença que representa uma das principais causas de cegueira no mundo. Tanto as amostras de DNA, como a informação médica que forem obtidas para este estudo, poderão ser compartilhadas com outros pesquisadores, podendo assim ser utilizadas eventualmente para outros fins de pesquisa desta moléstia. O sigilo será mantido em todos os estudos colaborativos através da utilização de um código para a identificação dos indivíduos participantes.

### PROCEDIMENTO:

Entendo que se eu concordar em participar desse estudo, os pesquisadores participantes farão perguntas a respeito dos meus antecedentes médicos e familiares. Eu serei submetido a um exame oftalmológico para confirmar meu estado clínico. O exame oftalmológico tem o objetivo de observar se há alterações no olho que lembrem aquelas que vemos na degeneração macular relacionada à idade. Estes procedimentos são normalmente realizados em qualquer exame oftalmológico, são seguros e não apresentam riscos à minha vista. Finalmente, uma amostra de sangue será colhida (5 a 10 ml, o equivalente a duas colheres de sopa). Hospitalização não será necessária. O DNA, extraído a partir do sangue de cada paciente, será preservado conforme o Regimento do Laboratório de Genética Molecular Humana do CBMEG (UNICAMP) se o paciente assim o consentir.

### RISCO E DESCONFORTO:

Uma coleta de 5 a 10 ml de sangue será efetuada. Os riscos associados a esse procedimento são mínimos, podendo ocorrer dor e manchas roxas (equimoses) no local da coleta de sangue. O desconforto será mínimo, pois se trata de uma coleta de sangue geralmente da veia do braço que será realizado por profissional treinado e devidamente habilitado para realizar esse procedimento.

### VANTAGENS:

Entendo que não obterei nenhuma vantagem direta com a participação neste estudo e que o diagnóstico e o tratamento provavelmente não serão modificados. Os resultados dos testes moleculares que por ventura forem obtidos estarão disponíveis através do acompanhamento no ambulatório de origem.

### SIGILO:

Entendo que toda a informação médica, assim como o resultados dos testes genéticos decorrentes desse projeto de pesquisa, farão parte do prontuário médico do propósito e serão submetidos aos regulamentos do Hospital de Clínicas da UNICAMP, referentes ao sigilo da informação médica.

Se os resultados ou informações fornecidas forem utilizados para fins de publicação científica, nenhum nome será utilizado.

#### FORNECIMENTO DE INFORMAÇÃO ADICIONAL:

Entendo que posso requisitar informações adicionais relativas ao estudo a qualquer momento. O Dr. Flávio Mac Cord Medina, tel. (19) 3521-8907 estará disponível para responder minhas questões e preocupações. Em caso de recurso, dúvidas ou reclamações contactar a secretaria da comissão de ética da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, tel. (19) 3521-7232.

#### RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO:

Entendo que a participação é voluntária e que eu posso me recusar a participar ou retirar meu consentimento e interromper a minha participação no estudo a qualquer momento (incluindo a retirada da amostra de sangue) sem comprometer os cuidados médicos que recebo atualmente ou receberei no futuro no Hospital de Clínicas da UNICAMP. Eu reconheço também que o Dr. Flávio Mac Cord Medina pode interromper a minha participação nesse estudo a qualquer momento que julgar apropriado.

Fui informado que poderei autorizar que esse material genético seja guardado no Banco de Material Biológico do Laboratório de Genética Molecular Humana CBMEG/UNICAMP. Caso este material venha a ser útil para outros estudos aprovados pelo Comitê de Ética, estou ciente que serei informado para que autorize ou não o uso da(s) amostra(s).

- Inclui o armazenamento do material para pesquisas genéticas futuras.
- Determina que o material deva ser descartado após o término da pesquisa.

---

Nome e RG do sujeito da pesquisa

## CONSENTIMENTO

Título do projeto: **Associação dos genótipos do fator de complemento H com a resposta ao tratamento da degeneração macular relacionada à idade com bevacizumabe e ranibizumabe**

Investigador principal: Dr. Flávio Mac Cord Medina

Eu confirmo que o (a) Dr. (a) \_\_\_\_\_ me explicou o objetivo do estudo, os procedimentos que serão realizados, os riscos, desconforto e possíveis vantagens advindas desse projeto de pesquisa. Eu li e/ou me foi explicado, assim como compreendi esse formulário de consentimento e estou de pleno acordo em participar desse estudo.

\_\_\_\_\_  
Nome e RG do sujeito da pesquisa

\_\_\_\_\_  
Assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável

\_\_\_\_\_  
Data

\_\_\_\_\_  
Endereço e telefone

### RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR:

Eu expliquei a \_\_\_\_\_ o objetivo do estudo, os procedimentos requeridos e os possíveis riscos e vantagens que poderão advir do estudo, usando o melhor do meu conhecimento. Eu me comprometo a fornecer uma cópia desse formulário de consentimento ao participante ou responsável.

\_\_\_\_\_  
Nome do pesquisador

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador

\_\_\_\_\_  
Data

Telefones para contato: Dr. Flávio Mac Cord Medina - (19) 3521-8907

Comitê de Ética em Pesquisa - (19) 3521-8360/ (19) 3521-8936

## Anexo C

### QUESTIONÁRIO ESTRUTURADO

**Data:**  **Iniciais:**

**Nome:**

**Sexo:**  Masculino  
 Feminino

**Olho do estudo:**  Direito  
 Esquerdo

**Data de nascimento:**   
dd mm aaaa

**Tempo de apresentação dos sintomas em meses:**

**História ocular progressa:**  Cir. Catarata  
 Outra, especificar: \_\_\_\_\_

**História sistêmica progressa:**  HAS  
 Outra, especificar: \_\_\_\_\_

**Cor da íris:**  Castanho  
 Azul-verde

**História familiar:**  DMRI  
Grau de parentesco: \_\_\_\_\_  
 Outra, especificar: \_\_\_\_\_

**História pessoal:**  Tabagismo  Uso de vitaminas  
 Atual  Outra, especificar: \_\_\_\_\_  
 Prévio \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_ maços x ano

## Anexo D

Tabela 1. Descrição quantitativa da idade, tempo dos sintomas e medidas de acuidade visual e espessura retiniana central dos pacientes com DMRI exsudativa recém-diagnosticados e submetidos a injeção intravítrea de bevacizumabe, avaliados após 7 e 28 dias

Genótipo	VARIÁVEL	N	MÉDIA	D. P.	MÍN	MEDIANA	MÁX	VALOR-P*
CC	Idade	6	74,33	7,37	63,00	78,50	80,00	P=0,768
	Tempo de Sintomas	6	12,17	6,40	6,00	12,00	24,00	P=0,611
	LogMar D0	6	0,88	0,48	0,30	0,82	1,64	P=0,708
	LogMar D7	6	0,75	0,38	0,22	0,77	1,26	P=0,860
	LogMar D28	6	0,70	0,43	0,14	0,68	1,30	P=0,928
	OCT D0	6	421,83	109,01	303,00	392,50	565,00	P=0,374
	OCT D7	6	389,83	108,86	286,00	378,50	558,00	P=0,187
	OCT D28	6	374,50	147,64	232,00	321,50	625,00	P=0,476
CT	Idade	12	75,42	5,12	62,00	76,00	83,00	
	Tempo de Sintomas	12	10,08	8,18	1,00	11,00	24,00	
	LogMar D0	12	0,75	0,35	0,28	0,65	1,50	
	LogMar D7	12	0,66	0,35	0,20	0,50	1,40	
	LogMar D28	12	0,61	0,37	0,28	0,40	1,34	
	OCT D0	12	375,50	98,78	276,00	325,00	577,00	
	OCT D7	12	317,58	100,97	240,00	286,00	597,00	
	OCT D28	12	297,50	93,66	171,00	276,00	511,00	
TT	Idade	7	75,29	8,60	57,00	77,00	83,00	
	Tempo de Sintomas	7	10,86	13,72	1,00	3,00	36,00	
	LogMar D0	7	0,82	0,52	0,30	0,54	1,60	
	LogMar D7	7	0,73	0,55	0,18	0,46	1,54	
	LogMar D2	7	0,69	0,57	0,18	0,42	1,56	
	OCT D0	7	341,57	64,45	259,00	368,00	418,00	
	OCT D7	7	309,71	44,23	229,00	322,00	350,00	
	OCT D28	7	292,57	38,91	244,00	281,00	366,00	

\* Valor-P referente ao teste de Kruskal-Wallis para comparação das variáveis entre 3 grupos.

Tabela 2. Descrição quantitativa da idade, tempo dos sintomas, número de injeções e medidas de acuidade visual e espessura retiniana central dos pacientes com DMRI exsudativa em tratamento com antiangiogênicos acompanhados por um ano

Genótipo	VARIÁVEL	N	MÉDIA	D. P.	MÍN	MEDIANA	MÁX	VALOR-P*
CC	Idade	11	76,27	10,07	63,00	79,00	93,00	P=0,228
	Tempo de Sintomas	11	8,36	6,95	1,00	7,00	24,00	P=0,660
	No. de injeções	11	3,45	1,44	1,00	3,00	6,00	P=0,787
	LogMar Pré	11	0,92	0,39	0,30	1,00	1,64	P=0,652
	LogMar Pós	11	0,91	0,41	0,48	0,78	1,68	P=0,282
	OCT Pré	11	386,45	138,38	245,00	333,00	647,00	P=0,402
	OCT Pós	11	294,00	76,25	200,00	322,00	400,00	P=0,294
	CT	Idade	23	73,52	7,11	58,00	75,00	83,00
Tempo de Sintomas		23	6,65	6,75	1,00	3,00	24,00	
No. de injeções		23	3,83	1,95	1,00	3,00	8,00	
LogMar Pré		23	0,84	0,42	0,10	0,90	1,50	
LogMar Pós		23	0,77	0,55	0,10	0,60	1,64	
OCT Pré		23	318,48	82,84	149,00	308,00	577,00	
OCT Pós		23	257,13	87,57	118,00	273,00	435,00	
TT		Idade	12	77,42	7,32	57,00	79,00	86,00
	Tempo de Sintomas	12	7,50	6,67	1,00	5,50	24,00	
	No. de injeções	12	3,83	1,59	1,00	4,00	7,00	
	LogMar Pré	12	0,83	0,49	0,30	0,62	1,60	
	LogMar Pós	12	0,68	0,53	0,08	0,58	1,66	
	OCT Pré	12	315,75	67,77	250,00	275,00	418,00	
	OCT Pós	12	264,00	113,68	170,00	228,00	564,00	

\* Valor-P referente ao teste de Kruskal-Wallis para comparação das variáveis entre 3 grupos.