



UnB

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
MÉDICAS (PPGCM)

BRUNO NOBRE LINS CORONADO

**ANÁLISE MOLECULAR POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE PACIENTES
COM DEGENERAÇÃO MACULAR RELACIONADA À IDADE DO TIPO
NEOVASCULAR (DMRI_n) RESISTENTES AO ANTI-VEGF**

BRASÍLIA, DF
2019



UnB

BRUNO NOBRE LINS CORONADO

**ANÁLISE MOLECULAR POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE PACIENTES
COM DEGENERAÇÃO MACULAR RELACIONADA À IDADE DO TIPO
NEOVASCULAR (DMRI_n) RESISTENTES AO ANTI-VEGF**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Otávio de Toledo Nóbrega

BRASÍLIA, DF
Julho de 2019

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA (UnB)**

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno: Bruno Nobre Lins Coronado

Orientador: Prof. Dr. Otávio de Toledo Nóbrega

Membros:

- 1. Prof. Dr. Otávio de Toledo Nóbrega (UnB, DF/Brasil)**
- 2. Prof. Dr. Marcos Pereira de Ávila (UFG, GO/Brasil)**
- 3. Prof. Dr. Wagner Fontes (UnB, DF/Brasil)**
- 4. Profa. Dra. Aline Maria Araújo Martins (CEU-USP, Madri/Espanha) - (suplente)**

Data: 18/07/2019

AGRADECIMENTOS

*“ O todo sem a parte não é todo,
A parte sem o todo não é parte...”*

Parafraseando o poeta, ratifico que a construção de uma dissertação se dá por muitas mãos.

Agradeço à Universidade de Brasília (UnB) e ao Centro Brasileiro da Visão (CBV) que me permitiram vivenciar a Academia e materializar uma pesquisa em instituições de referência e qualidade. Com a inexorabilidade do tempo e vicissitudes da vida, são as instituições que ficam.

Agradeço ao Professor Otávio pelo apoio de sempre. Foi peça imprescindível para viabilizar esta construção.

Agradeço à Professora Aline que me permitiu ousar, sair da zona de conforto e aguçar um pensamento translacional. Como poucas, são vivências que levarei para a vida.

Agradeço ao Professor Marcos Ávila, que pela trajetória e convivência, mais do que referência, representa uma inspiração.

Ao Dr Mauro Nish, pelas primeiras e tão importantes orientações.

Ao retinólogo, meu caro Fabrício Borges, pela dedicação, orientações e tempo disponibilizados que foram determinantes para a conclusão desta obra.

Ao grupo do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas e ao de Medicina Translacional, agradeço a confiança, incentivo e apoio: sintam-se, todos, abraçados.

Os amigos se reconhecem. Aos que fiz nesta jornada, saibam que meus agradecimentos são, de fato, sinceros!

Agradeço à Aline, minha esposa, que em meio ao meu foco nesta dissertação, costumeiramente me trazia às tantas outras realidades, demandas e belezas da vida: você representa para mim alento, orgulho e amor verdadeiro!

Não apenas por laços de sangue, mas por cumplicidade de almas, agradeço aos meus pais, Clóvis e Angela, como também ao meu filho Artur. Este, além de

tudo, é quem me renova com sua inocência, alegria contagiante e perspicácia. Na pessoa do mesmo, agradeço ainda a todos meus familiares.

Agradeço à cidade de Brasília. Seu concreto abriga um povo acolhedor e figura em uma paisagem onde o céu, quando de minha estadia, pareceu-me mais amplo, mais perto.

Agradeço ainda a Deus, apoio certo de horas incertas, na confiança que ciência e espiritualidade não precisam caminhar sozinhas.

RESUMO

A degeneração macular relacionada à idade (DMRI), apesar de pouco conhecida pela população em geral, está entre as principais causas de cegueira em todo o mundo. Existem duas formas: a seca e a úmida (neovascular). A forma neovascular tem nas injeções intravítreas de anti-angiogênicos (anti-VEGF) seu tratamento padrão ouro. No entanto, até um quarto destes pacientes apresenta deterioração da acuidade visual, mesmo sob o tratamento preconizado. Assim, existe a necessidade de estudos que elucidem as vias moleculares que atuam na neoangiogênese coroidal além do fator de crescimento vascular e endotelial (VEGF). Tal pesquisa trata-se de um estudo transversal de natureza translacional para avaliar os perfis de proteínas do humor aquoso de 25 pacientes divididos em três grupos: *grupo 1* formado por pacientes com DMRI neovascular virgens de tratamento (chamados *naive*), que em acompanhamento *a posteriori* demonstraram boa resposta às injeções de anti-VEGF; *grupo 2* formado por pacientes com DMRI neovascular resistentes ao anti-VEGF e *grupo 3* formado por pacientes controles, sem doenças sistêmicas ou sinais de retinopatia. Utilizamos a espectrometria de massas (*label-free*LC-MS/MS) para fazer a distinção proteômica dos grupos. Foram identificadas 2336 proteínas, das quais 185 estavam diferentemente reguladas e permitiram a diferenciação das condições clínicas entre si. Trinta e nove proteínas, incluindo algumas inéditas, permitiram ainda correlacionar os grupos analisados com o metabolismo lipídico, o estresse oxidativo, o sistema do complemento e vias inflamatórias e da angiogênese. Assim, este estudo ratifica a participação de outros potenciais biomarcadores e vias na fisiopatogênese da neovascularização macular além do conhecido fator de crescimento vascular e endotelial (VEGF).

Palavras chave: DMRI, resistência, neoangiogênese coroidal, espectrometria de massas, biomarcadores.

ABSTRACT

Age-related macular degeneration (AMD), although little known to the general population, is among the leading causes of blindness worldwide. There are two forms: dry and wet (neovascular). The neovascular form has intravitreal injections of anti-angiogenics (anti-VEGF) as its gold standard treatment. However, still up to a quarter of these patients have deterioration of visual acuity, even under the recommended treatment. Thus, there is a need for researches that elucidate the molecular pathways that act on choroidal neoangiogenesis in addition to vascular and endothelial growth factor (VEGF). This research evaluates the aqueous humor protein profiles of 25 patients divided into three groups: group 1 formed by patients with treatment-naive neovascular AMD, who in follow-up demonstrated good response to anti-VEGF injections; group 2 comprised patients with anti-VEGF-resistant neovascular AMD and group 3 comprised control patients with no systemic disease or signs of retinopathy. Mass spectrometry (label-free LC-MS / MS) was used to make the proteomic distinction of the groups. 2336 proteins were identified, 185 of which were differently regulated and allowed the differentiation of clinical conditions from each other. Thirty-nine proteins, including some unpublished proteins, also allowed correlating the analyzed groups with lipid metabolism, oxidative stress, complement system, inflammatory pathways and angiogenesis. Thus, this research ratifies the participation of other potential biomarkers and pathways in the pathophysiology of macular neovascularization besides the known vascular and endothelial growth factor (VEGF).

Keywords: AMD, resistance, choroidal neoangiogenesis, mass spectrometry, biomarkers.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	04
RESUMO	06
ABSTRACT	07
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE QUADROS	11
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS	13
1. INTRODUÇÃO	20
1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS	20
1.2. PRIVILÉGIO IMUNE OCULAR	22
1.3 AS PRINCIPAIS CAUSAS DE CEGUEIRA NO MUNDO	24
1.4 PRINCIPAIS EVENTOS MOLECULARES FISIOPATOLÓGICOS EM DMRI	28
1.4.1. ANGIOGÊNESE E DMRI	37
1.4.2. ESTRESSE OXIDATIVO E DMRI	37
1.4.3. SISTEMA DO COMPLEMENTO E DMRI	38
1.4.4. INFLAMAÇÃO E DMRI	38
1.4.5. METABOLISMO LIPÍDICO	39
1.4.6. PRINCIPAIS EFETORES MOLECULARES DA FISIOPATOLOGICA DA DMRI	41
1.5. DIFERENÇA ENTRE NEOVASCULARIZAÇÃO RETINIANA E COROIDAL	46
1.6. BIOMARCADORES E A ESTRATÉGIA TRANSLACIONAL EM PESQUISA MÉDICA	47
1.7. ESPECTROMETRIA DE MASSAS: UMA NOVA FERRAMENTA DE ANÁLISE NA ERA PÓS-GENÔMICA	48
2. OBJETIVOS	53
2.1. Objetivo Primário	53
2.2. Objetivos Secundários	53
3. JUSTIFICATIVA	54
4. PACIENTES E MÉTODOS	55
4.1. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	56
4.2. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	57
4.3. RISCOS E BENEFÍCIOS	58
4.4. PREPARAÇÃO DA AMOSTRA	59
4.5. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS E PEPTÍDEOS	59
4.6. DIGESTÃO TRÍPTICA DE PROTEÍNAS EM SOLUÇÃO (CLÁSSICA)	60
4.7. DESSALINIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS	61
4.8. ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS (uPLC-MS/MS)	61
4.9. ANÁLISE DE DADOS	62
4.10. ANOTAÇÕES FUNCIONAIS	64
5. RESULTADOS	65
6. DISCUSSÃO	76

7. CONCLUSÃO	95
8. REFERÊNCIAS	96
9. MATERIAL COMPLEMENTAR	116

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Barreiras hematorretinianas	23
Figura 2: Camadas vasculares da retina	29
Figura 3: Modelo de formação de depósitos sub-RPE (drusas)	31
Figura 4: Estágios clínicos e sinais de DMRI	31
Figura 5: DMRI seca	32
Figura 6: DMRI neovascular. Progressão da neovascularização coroidal	33
Figura 7: DMRI neovascular (DMRI _n). OCT angiography (angiograma por Tomografia de Coerência Óptica) e Angiofluoresceinografia	34
Figura 8: Patogênese DMRI seca	40
Figura 9: Patogênese da DMRI neovascular	41
Figura 10: Espectrometria de Massas e Oftalmologia	49
Figura 11: Visão esquemática da anatomia do olho humano. Sítios oculares e biofluidos examinados em estudos proteômicos	51
Figura 12: Quantificação por Qubit	60
Figura 13: Análise PCA pelo <i>software</i> Progenesis Q1 ($p < 0.05$) apresentando os <i>scores plot</i> das proteínas reguladas no humor aquoso de pacientes do grupo DMRI _n <i>naive</i> , do grupo DMRI _n resistentes ao anti-VEGF e Grupo Controle	66
Figura 14: Gráfico hierarquizado (análise HCA) mostrando o agrupamento de proteínas de acordo com seus perfis de abundância pelo <i>software</i> Progenesis Q1 ($p < 0,05$).....	67
Figura 15: Perfis de abundância relativa de proteínas agrupadas	67
Figura 16: VIP scores das proteínas que melhor discriminam as condições clínicas analisadas (PLS-DA <i>imp. features</i> , $p < 0.05$)	68
Figura 17: Análise HCA por agrupamento em <i>heatmap</i> das proteínas discriminantes indicadas pela análise PLS-DA (<i>imp. features</i> , $p < 0.05$)	72
Figura 18: Rede e Análise de Enriquecimento. Vias metabólicas do termo GO detectadas como reguladas pelas plataformas String	73-75
Figura 19: Prevalência de DMRI	78
Figura 20: Agrupamento das proteínas selecionadas em vias moleculares/ processos biológicos.....	83

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Fatores de Risco em DMRI	28
Quadro 2: Normatização da Resposta Terapêutica ao anti-VEGF na DMRIIn	35-36
Quadro 3: Normatização da Resposta Terapêutica ao anti-VEGF na DMRIIn	56-57
Quadro 4: Categorias de elegibilidade para o DMRI (classificação)	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estatística dos Resultados	65
Tabela 2: Proteínas discriminantes selecionadas por função metabólica (anotações GO)	69-71
Tabela 3: Proteínas discriminantes selecionadas por função metabólica relacionadas à fisiopatogênese da DMRI	80-83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AOA024R1B: Cristalina Beta 3, IsoformaCRA_a
AOA024R3E3: Apolipoproteína A-I, isoformaCRA_a
AOA024R433: Fator de crescimento insulina-símil proteína 7, isoformaCRA_a
AOA024R4F1: Enolase 1
AOA024R8D7: Lipocalina 1 (*Tear prealbumin*), isoformaCRA_a
AOA024RD88: Receptor de tirosina quinase, isoformaCRA_a
AOA087X1J7: Glutationaperoxidase
AOA1U9X7H5: CFB
AOA1W2PNW4: Receptor 1 do Fator de Crescimento Vascular Endotelial
AOA384NKS6: Clusterina
ABCA4: transportadores ATP-dependentes do tipo ABC 4 da subfamília A
AG: Atrofia Geográfica
AGF: angiofluoresceinografia
Akt: receptor de tirosina quinase B
AL1A1: Desidrogenase de retina 1
AMD: *Age-related macular degeneration*
Ang1: angiopoietina 1
Ang2: angiopoietina 2
Anti-VEGF: anti-angiogênicas
APLP1: Proteína semelhante à amiloide 1
Apo E: Apolipoproteína E
AV: Acuidade visual
B4DQ11: Complemento C2
BASP1: Proteína solúvel de ácido cerebral 1
C: córnea
CAT: catalase
CBR1: Redutase de carbonilo (NADPH) 1
CCG: camadas de células ganglionares
CFB: fator B do complemento
CFH: complemento solúvel H
CFI: complemento solúvel I

CFN: camada de fibras nervosas
CID: Dissociação induzida por colisão
CIR: cistos intraretinianos
Clearance: depuração
CNE: camada nuclear externa
CNI: camada nuclear interna
CPE: camada plexiforme externa
CPEs: células progenitoras endoteliais
Cr: cristalino
CRBA3: Beta-cristalina A3
CRBA4: Beta-cristalina A4
CRGC: Gama-cristalina C
CRT: espessura macular central
CRYA2: Cadeia alfa-cristalina A2
CRYAB: Cadeia alfa-cristalina B
CXCR4: *C-X-C motif receptor 4*
DDA: *Data Dependent Acquisition*
DEP: Descolamento do epitélio pigmentado da retina
DNA: ácido desoxirribonucleico
DMRI: Degeneração Macular Relacionada à Idade
DMRIIn: Degeneração Macular Relacionada à idade do tipo Neovascular
E7EUF1: Ectonucleotídeopirofosfatase / família fosfodiesterase – membro 2
EC/EPR: esclera, coróide, epitélio pigmentar da retina
ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
EMC: efetores da matriz extracelular
eNOS: óxido nítrico sintetase
ENPP2: Ectonucleotídeopirofosfatase I família fosfodiesterase – membro 2
EPA/DHA: ácidos graxos eicosapentaenóico e docosaheptaenóico
EPR: Epitélio Pigmentar da Retina
ERK: quinases reguladas por sinais extracelulares
ERO: espécies reativas de oxigênio
F1C4A7: Antígeno CD14 de diferenciação monocítica
F5GZ08: Amilóide símile proteína 1
FABP5: Proteína de ligação a ácidos-gordos 5

FDR: *False Discovery Rate*

FIBA: Cadeia alfa de fibrinogênio

FIR: fluido intra-retiniano

FL: filme lacrimal

FSR: fluido subretiniano

FXII: fator de coagulação XII

GO: *Gene Ontology*

GPx: glutationaperoxidase

HA: humor aquoso

HAP: Hidroxiapatita

HCA: *Hierarchical Cluster Analysis*

HIF-1: fator induzido por hipóxia

HK: quininogênio de alto peso molecular

HLA: antígeno leucocitário humano

HPCL: cromatografia líquida de alto rendimento

HV5X1: Variável pesada de imunoglobulina 5-10-1

I/CC: íris e corpo ciliar

ICG: angiografia com indocianina

ICGA: Indocianinografia

IGFBP-7: Fator de crescimento insulina-símile proteína 7

IMPG1: Interfotoreceptor matriz de proteoglicano 1

IPCV: vasculopatiacoroidalpolipoidal idiopática

KDR: Receptor de tirosina kinase, isoformaCRA_a

KEEG: enciclopédia de genes e genoma de kioto

KLKB1: calicreína plasmática

KKS: sistema de calicreína-cinina plasmático

L: líquor

LBPQ/UnB: Laboratório de Química e Bioquímica de Proteínas da Universidade de Brasília

LC: lipofuscina

label-free LC-MS/MDS: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas sem rótulos

LCN1: Lipocalina 1 (*Tear prealbumin*), isoformaCRA_a

LoBind: tubos *Eppendorf* de baixa adsorção para proteínas e peptídeos

MAVC: melhor acuidade visual corrigida

MEC: matriz extracelular

MMPs: metaloproteinases

MS: espectrometria de massas

m/z: massa/carga

Naive: grupo virgem de tratamento

NCBI: banco de dados para proteínas não redundantes e dados relacionados ao gene

NO: nervo óptico

OCT: Coerência Óptica

OCT *angiography*: angiografia por OCT

OCTA: Angiotomografia por tomografia de coerência óptica

OCT-SD: Tomografia de coerência óptica – *spectraldomain*

OMS: Organização Mundial de Saúde

P01024: Complemento C3

P01871: Cadeia Pesada de Imunoglobulina MU

P02753: Proteína 4 Ligante de Retinol

P03952: Calicreína Plasmática

P04040: Catalase

P06727: Apolipoproteína A-IV

P07357: Complemento C8 cadeia alfa

P08294: Superóxido dismutase extracelular [Cu-Zn]

P0C0L4: Complemento C4-A

P10643: Complemento C7

P10745: Proteína 3 ligadora de Retinol

P13640: Metalotioneína – 1G

P36955: Fator Derivado de Epitélio Pigmentar

PCA: *Pattern Cluster Analysis*

PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas

PDGF-B: fator de crescimento derivado de plaquetas B

PDGFRb: receptor b do fator de crescimento derivado de plaquetas

PDT: Terapia fotodinâmica

PED: Descolamento do Epitélio Pigmentar da Retina

PEDF: Fator derivado de epitélio pigmentar

PGK1: Fosfogliceratoquinase 1

PIO: pressão intra-ocular

PK: complexo de pré-caliceína

PLGF: fator de crescimento placentário

PLS-DA *imp. features*: dados gerados pelo VIP score

PRN: Pro Re Nata

PTKs: tirosina quinases

Q03591: Fator do Complemento H relacionado a proteína 1

Q16270: Fator de crescimento insulina-símile proteína 7

Q17R60: Interfotorreceptor de matriz proteoglicano 1

Q58P2 1: Inibidor Tecidual de Metaloproteinase 1

Q86YU9: FosfoinositídeoFosfolipase C

QSonica: TipSonicador Q125

R: retina

R4UMM2: Beta-cristalina B2

RBP-3: Proteína 3 ligante de retinol

RBP-4: Proteína 4 ligante de Retinol

RNA: Ácido ribonucleico

RTG: retinografia colorida

SBRV: Sociedade Brasileira de Retina e Vítreo

SDF-1: fator 1 derivado do estroma

SOD: superóxido dismutase extracelular [Cu-Zn]

subEPR: subretiniano ou subepitelial

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Tie2: tirosina-quinase 2

Tightjunctions: junções focais

TIMP1: Inibidor tecidual de metaloproteinase 1

TIMPs: inibidores tissulares

TPIS: Triosefosfatoisomerase

Tr: malha trabecular

UPLC: cromatografia líquida de ultra rendimento

UPLC-MS/MS: ultra cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

V: vítreo

VEGF: Fator de Crescimento Vascular e Endotelial

VEGFA: Fator de Crescimento Vascular e Endotelial A

VEGFB: Fator de Crescimento Vascular e Endotelial B

VEGFR1: Receptor 1 do Fator de Crescimento Vascular Endotelial

VE-PTP: proteína endotelial vascular tirosina fosfatase

VIP-scores: VariableImportanceProjection scores

V9HW74: Ubiquitinahidrolasecarboxi-terminal

XIC: *extratedionchromatogram*

“Se não sabes, aprende; se já sabes, ensina”.

(Confúcio)

1. INTRODUÇÃO

1.1. **Considerações gerais**

Com as últimas transformações socioeconômicas e o envelhecimento da população mundial, progressivamente o conceito de saúde faz intersecção com o de transição epidemiológica (MANTON, 1988; VAN WEEL; SCHELLEVIS, 2006). Este último processo comumente não obedece aos mesmos parâmetros na sequência, intensidade e velocidade nas diferentes regiões e países. Tem curso dinâmico e engloba a substituição das doenças transmissíveis por doenças não-transmissíveis/causas externas, o deslocamento da carga de morbi-mortalidade dos grupos mais jovens aos grupos mais senis e a transformação de uma situação em que predominava a mortalidade para outra na qual a morbidade é dominante. Com isso, ocorre o aumento do impacto das doenças crônico-degenerativas sobre o estado de saúde das populações, que são dos principais limitantes da qualidade de vida, particularmente na faixa etária mais idosa (MANTON, 1988; SCHRAMM et al., 2014; VAN WEEL; SCHELLEVIS, 2006).

O exame clínico do paciente ainda representa a base de todo o ato médico, especialmente quanto às considerações diagnósticas (CARNEIRO, 2017). É fácil, porém, imaginar que características biológicas mensuráveis podem não contemplar o estado clínico dos pacientes em sua completude: os sinais podem não necessariamente se correlacionarem com os sintomas da doença e vice-versa (IMRIE; TATHAM, 2016; WEINREB; AUNG; MEDEIROS, 2014). Sendo assim, ampliar o estudo das vias fisiopatológicas é condição estratégica para o avanço do conhecimento médico. Nesse contexto, a avaliação de genes, seus transcritos e produtos está cada vez mais presentes nas pesquisas médicas, corroborando com a compreensão molecular das mais diversas patologias.

A disponibilidade do sequenciamento do genoma humano não foi o suficiente para elucidar, por completo, o funcionamento biológico celular (PANDEY; MANN,

2000). Desta forma, ratifica-se que a presença do genoma e mesmo do RNA na célula não é garantia de expressão fenotípica. O foco dos estudos não deve estar apenas no gene e em seus transcritos, e sim, também em seus principais agentes ativos: as proteínas (CATHERMAN; SKINNER; KELLEHER, 2014; PANDEY; MANN, 2000).

O termo "*omics*" refere-se a análises de alto desempenho de genes, seus transcritos, proteínas ou metabólitos em um sistema. A interpretação de biomarcadores moleculares é comumente utilizada para avaliar a estrutura celular/tecidual e tem sido aplicada como uma ferramenta para a investigação funcional (HEIN et al., 2012; MURTHY et al., 2016, MISHUR; REA, 2012). Assim, estudos em transcriptômica, proteômica e metabolômica fornecem informações adicionais de proteínas e vias fisiopatológicas para várias enfermidades (LAUWEN et al., 2017).

O proteoma refere-se à expressão quantitativa do perfil proteico de uma célula, tecido ou organismo. Engloba não apenas a totalidade dos produtos protéicos traduzidos a partir das sequências genômicas e inclui proteínas resultantes de processos pós-transcricionais e pós-traducionais, sua localização na célula, interação e de acordo com algumas definições, também suas estruturas e funções (AHRENS et al., 2010; CATHERMAN; SKINNER; KELLEHER, 2014; GSTAIGER; AEBERSOLD, 2009). Fica claro, pois, que se trata de uma entidade dinâmica (HEIN et al., 2012) e que está mais próximo das manifestações clínicas das patologias do que o próprio genoma. No entanto, não são enfoques excludentes; são estratégias de conhecimentos complementares (PANDEY; MANN, 2000).

A fisiopatologia de várias doenças, via de regra, não é linear. Entende-se, contudo, que as manifestações clínicas são o resultado final de alterações metabólicas. O fenótipo se manifesta mediante o acúmulo dos produtos celulares determinantes de cada doença. No futuro, ao invés de se pensar apenas em uma identidade clínica, também será possível pensar em uma identidade molecular para inúmeras condições nosológicas. Isso é algo promissor, especialmente porque os recentes avanços na ciência molecular contribuíram para a precisão do atendimento de cada paciente, prevenindo doenças e trazendo terapias inovadoras e personalizadas (DOR et al., 2019; IONESCU et al., 2018; VELEZ et al., 2018). Assim, cada vez mais, os marcadores moleculares de perfil protéico estão presentes

na prática médica (CEHOFSKI; HONORÉ; VORUM, 2017). No entanto, especificamente em relação aos estudos proteômicos, pelo potencial oferecido, ainda são pouco utilizados em oftalmologia (LAUWEN et al., 2017)

1.2. Privilégio imune ocular

O olho é uma estrutura especificamente organizada para captar informação visual (BOWREY et al., 2016). De forma simplista, pode ser dividido em 3 camadas: (i) uma externa, conhecida como córneo-escleral; (ii) uma intermediária, o trato uveal (formado pela íris, ciliar corpo e coroide) e (iii) uma camada interna, conhecida como trato neurosensorial (retina). Em seu conteúdo, destacam-se o cristalino, o humor aquoso, que preenche o segmento anterior do olho e o humor vítreo, que preenche o segmento posterior. Com a idade, o humor vítreo vai sofrendo processo de liquefação e o humor aquoso preenche os espaços formados passando a ter também um maior contato com o segmento posterior do olho, em especial com a retina.

Os dois terços internos da retina são supridos pela artéria central da retina e o terço externo, que não possui leitos vasculares, tem seu principal suporte sanguíneo os capilares da coroide, que estão abaixo do epitélio pigmentar da retina (EPR). Assim, para manter a homeostase, o olho possui duas barreiras hematorretinianas, subdivididas em interna e externa (Figura 1). A barreira interna refere-se a adesões focais (*tight junctions*) entre células endoteliais capilares e a barreira externa é formada por adesões focais entre as células do epitélio pigmentar da retina. Os capilares retinianos e o EPR regulam o transporte entre a circulação sanguínea sistêmica e o meio intra-ocular, garantindo ao olho a manutenção de sua relação própria com o sistema imunológico, conhecida como privilégio imune (CAMPOCHIARO, 2015; STREILEIN, 2003; VOLZ; PAULY, 2015).

Para garantir concentrações terapêuticas de medicação no segmento posterior do olho, muitas das vezes é necessário aplicar injeção intra-vítrea, onde volumes de 20-100 microlitros podem ser aplicados de forma segura, normalmente sem comprometimento visual. Dentro do humor vítreo, as drogas de maiores massas moleculares podem ter meia-vida de dias ou mesmo semanas (LAUDE et al., 2010;

VOLZ; PAULY, 2015). Outras tecnologias como a dos implantes biodegradáveis intra-oculares de liberação controlada, podem perdurar na cavidade vítrea por meses (REZAR-DREINDL et al., 2017).

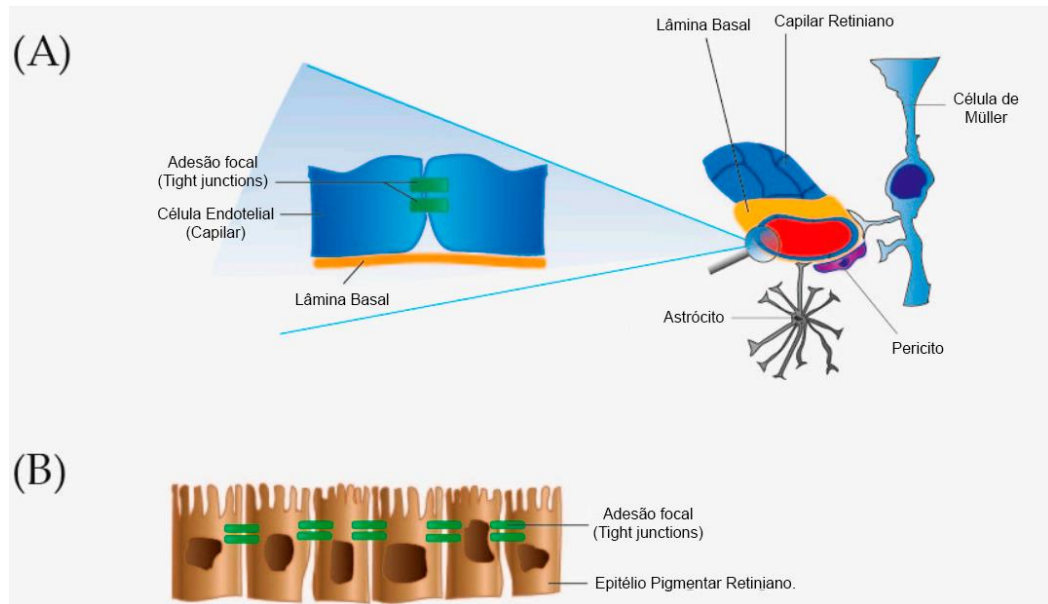


Figura 1: (A) barreira hematorretiniana interna. Adesões focais (*tight junctions*) mantêm as células endoteliais (capilares retinianos) firmemente aderidas. Pericitos, células de Müller e astrócitos estão envolvidos na manutenção da barreira hematorretiniana interna; e **(B) barreira hematorretiniana externa.** Mantida por adesões focais (*tight junctions*) entre as células do epitélio pigmentar da retina (EPR). Fonte: adaptado de CEHOFSKI; HONORÉ; VORUM, 2017.

Embora o mecanismo não seja completamente compreendido, acredita-se que tal isolamento imunológico do olho, não se trate apenas de uma condição física (barreiras hematorretinianas e ausência de vasos linfáticos). Deve-se também a: (i) o microambiente ocular inibitório, composto por fatores imunossupressores solúveis e ligados a células (com destaque para o fator de crescimento beta, hormônio estimulador de melanócitos α , peptídeo intestinal vasoativo, *cluster* de diferenciação 86, ligante do sistema Fas-FasL, trombospondina, galectinas) e (ii) regulação de respostas imunes sistêmicas, como indução de células T supressoras (também conhecidas por células *Tregs*) (STEIN-STREILEIN, 2008; TAYLOR, 2007; ZHOU; CASPI, 2010).

A oftalmologia pode ser considerada uma prática médica armada tecnologicamente e são exemplos do seu arsenal propedêutico diário: topografia e tomografia corneana, retinografia colorida, angiografias por fluoresceína, angiografia por

indocianina verde (ICGA), tomografia de coerência óptica (OCT) e angiografia por OCT (OCTa). A função visual pode ainda ser documentada, por exemplo, por campimetria computadorizada e eletrofisiologia. Assim sendo, os métodos diagnósticos e terapêuticos das doenças oftalmológicas normalmente requerem acompanhamento regular e continuado dos pacientes, bem como a execução de exames por médicos treinados, muitas das vezes com a necessidade da presença de equipamentos específicos que podem onerar todo o sistema de saúde.

Nas últimas décadas, no entanto, a oftalmologia tem se concentrado cada vez mais em pesquisas de precisão para se entender a fisiopatologia e definir estratégias diagnósticas e mesmo terapêuticas de inúmeras entidades. O entendimento da importância de imunomoduladores inflamatórios e da hemoglobina glicada para a retinopatia diabética e do fator de crescimento vascular e endotelial (VEGF) para a Degeneração Macular Relacionada à Idade (DMRI), por sua vez, são exemplos de marcadores moleculares que, mais do que presentes em ambientes de pesquisa, já são uma realidade na prática diária do oftalmologista. A utilização de biomarcadores moleculares, ao permitir a ampliação do entendimento fisiopatológico e da história natural da doença, pode garantir condutas mais precoces, prevenindo a progressão da doença, garantindo visão ao doente (KUIPER et al., 2017; REZAR-DREINDL et al., 2016; WONG et al., 2014) e desonerando o Estado de custos adicionais de tratamento.

1.3. As principais causas de cegueira no mundo

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define cegueira como a condição em que se tem acuidade visual menor que 3/60 (0,05) ou um correspondente menor que 10° de campo visual no melhor olho, com a melhor correção possível. Baixa visão, por sua vez, corresponde a uma acuidade visual menor que 6/18 (0,3), porém maior ou igual a 3/60 (0,05) também considerando o melhor olho, com a melhor correção possível (ROODHOOFT, 2002).

Estima-se que mundialmente em 2015 havia 36 milhões de pessoas cegas e um total de 216,6 milhões de pessoas com deficiência visual, um montante comparável a toda a população brasileira (FLAXMAN et al., 2017) e dentre as principais causas de cegueira e baixa acuidade visual do mundo, de origem não

infecciosa, destacam-se: a catarata, o glaucoma, a retinopatia diabética e a DMRI (FLAXMAN et al., 2017; ROODHOOFT, 2002).

A DMRI, por sua vez, atingirá cerca de 196 milhões de pessoas no mundo em 2020 (WONG et al., 2014), representando aproximadamente 10% dos casos totais de cegueira e atualmente já é a principal causa de perda visual severa em pacientes acima de 50 anos nos países industrializados. Trata-se de uma doença que gera baixa acuidade visual central, proporcionando perda da visão de detalhes (ÁVILA; GARCIA; ISAAC, 2015; BRANDL et al., 2016; RUDNICKA et al., 2012; SCHRAMM et al., 2014; WONG et al., 2014). E, devido ao envelhecimento da população, sua prevalência demonstra tendência permanente de alta chegando a quadruplicar a incidência a cada década de vida (R. et al., 2015; ZHOU et al., 2018).

Muitos são os fatores de risco para esta afecção degenerativa de causa multifatorial (Quadro 1), sendo os principais: idade, alterações genéticas, demográficas (variação de etnia), estilo de vida (tabagismo), dieta (rica ou pobre em vitaminas antioxidantes), exposição à luz e fatores oculares não completamente esclarecidos (CHAKRAVARTHY et al., 2010).

Fatores de risco potenciais para a degeneração macular relacionada à idade avançada

Fatores oculares (n=15)

- Opacidade nuclear
- Opacidade cortical
- Pterígio
- Opacidade da lente
- Escavação papilar
- Primeiro olho com DMRI
- Cor da íris
- Doença ocular
- Catarata/cirurgia de catarata
- Arco corneano
- Relação arteriolar e venular

- Freking
- Equivalentes esféricos
- Óculos para visão à distância
- História familiar de DMRI

Fatores Cardiovasculares (n=7)

- Aterosclerose
- História de doença cerebrovascular
- Nível sérico de colesterol total e nível sérico de colesterol HDL
- Hipertensão
- Antioxidantes do plasma

Outras condições médicas ou marcador (n=8)

- Variáveis bioquímicas incluindo albumina sérica, Proteína C-Reativa, fibrinogênio plasmático e triglicerídeo sérico.
- Densidade mineral óssea
- Diabetes
- Artrite
- Menopausa

Dieta (n=11)

- Ingestão dietética
- Alimentos gordurosos
- Gordura animal
- Gordura vegetal
- Ácido linoleico
- ácidos graxos EPA/DHA
- Antioxidantes
- Gordura saturada

- Gordura monoinsaturada
- Gordura poli-insaturada
- Gordura trans-insaturada

Medicações (n=9)

- Uso de controle de natalidade
- Uso de diuréticos
- Uso de antiácido
- Uso de medicações anti-hipertensivas
- Uso de drogas anti-inflamatórias
- Uso de hidroclorotiazida
- Terapia de reposição hormonal
- Hormônios (mulheres)
- Hipnóticos / sedativo

Estilo de vida (n=3)

- Tabagismo
- Consumo de álcool
- Nível de atividade física

Luz e outras exposições (n=3)

- Local de nascimento
- Radiação solar/Exposição ao ar livre
- Exposição química

Genética (n=9)

- Fibulina 5
- CST3
- CX3CR
- TLR4
- VEGF

- LRP6
- MMP9
- HLA – genes familiares
- CFH

Demográficos (n=8)

- Gênero
- Idade
- Raça/etnia
- Educação
- Peso/Índice de Massa Corpórea
- Circunferência abdominal
- Altura
- Estado Civil

Quadro 1: Fatores de risco em DMRI. Fonte: adaptado de CHAKRAVARTY et al., 2010.

1.4. Principais Eventos Moleculares Fisiopatológicos em DMRI

A degeneração macular relacionada à idade (DMRI) configura-se como uma doença degenerativa que atinge o epitélio pigmentar da retina (EPR) e os fotorreceptores, preferencialmente maculares (VOLZ; PAULY, 2015). Estes, por sua vez, estão presentes na retina externa e são células de alta atividade metabólica responsáveis pela conversão da energia luminosa em impulso nervoso. Neste sentido, e na medida em que os eritrócitos contêm hemoglobina que absorvem a luz, a ausência de vasos nas camadas externas da retina torna-se uma importante adaptação para a função visual (Figura 2). No entanto, representa um desafio no tocante ao fornecimento de oxigênio e nutrientes a esse segmento retiniano, que é suprido principalmente pela circulação da coróide. Os coriocapilares são fenestrados, possuem alto fluxo sanguíneo e permitem que o plasma banhe o EPR que seleciona o suprimento da retina externa (CAMPOCHIARO, 2015).

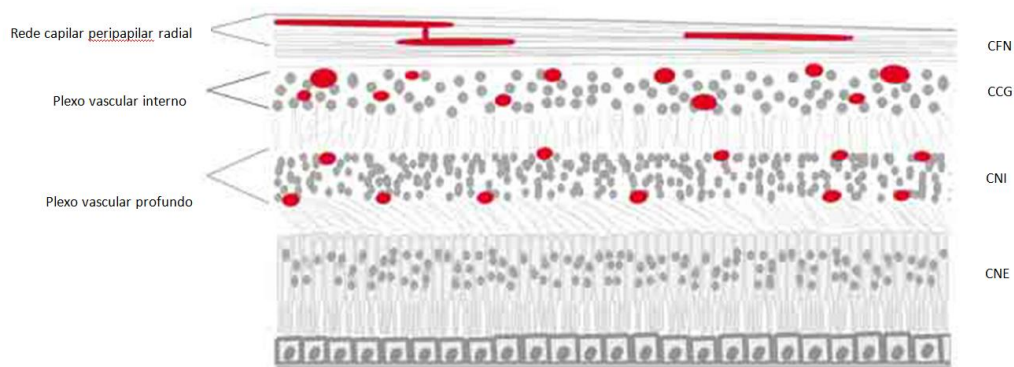


Figura 2: Camadas vasculares da retina. Os vasos são mostrados em vermelho. O curso de capilares peripapilares radiais são paralelos em relação às fibras nervosas. (CFN: camada de fibras nervosas; CCG: camadas de células ganglionares; CNI: camada nuclear interna; CNE: camada nuclear externa). Fonte: adaptado de SPAIDE; KLANCNIK; COONEY, 2015.

A DMRI apresenta uma variabilidade de apresentações clínicas. Nos estágios iniciais, normalmente assintomáticos, observa-se um acúmulo de detritos extracelulares no espaço entre o EPR e a membrana de Bruch, formando as chamadas drusas. Estas aumentam em número e tamanho até atingir os estágios mais avançados da doença, quer na forma seca (atrofia geográfica) ou neovascular (VOLZ; PAULY, 2015).

As drusas são compostas predominantemente por proteínas, lipídios, minerais e detritos celulares e extracelulares (WANG et al., 2010). As drusas duras, pequenas e em número reduzido podem estar associadas ao processo fisiológico de envelhecimento, enquanto as drusas moles intermediárias e grandes estão implicadas na evolução da doença. A retinografia colorida, a angiofluoresceinografia e predominantemente a tomografia de coerência óptica (OCT) e mesmo a angiografia por OCT compõem o principal arsenal propedêutico oftalmológico atual que documentam tais alterações e caracterizam sua progressão. Estudos moleculares, contudo, podem ajudar a aprimorar o diagnóstico e prognóstico da referida afecção (TAN et al., 2018).

Os componentes mais frequentemente encontrados nas drusas foram compostos protéicos como apolipoproteína E, lipofuscina, componentes amiloides (incluindo β amiloide), componentes do complemento e vitronectina. E o fato de tais componentes estarem revestindo hidroxapatita (HAP) depositada em gotículas lipídicas extracelulares contendo colesterol, amplia o campo de investigação metabólica ao se ratificar perspectiva dos compostos lipídicos e minerais na

fisiopatologia da DMRI. Assim, entende-se que alterações na homeostase de lipídeos e íons metálicos de zinco, cobre e ferro podem contribuir para a degeneração da retina na DMRI, normalmente associados a danos por estresse oxidativo (ANDERSON et al., 2004; BROWN et al., 2019; HAGEMAN et al., 1999; THOMPSON et al., 2015).

O aumento do ferro e a deficiência de zinco parecem estar ligados ao acúmulo de lipofuscina nas células do EPR (JULIEN et al., 2011) e tem sido demonstrado que prejudicam a atividade fagocítica e lisossomal das células do EPR por meio da peroxidação lipídica (TOKARZ; KAARNIRANTA; BLASIAK, 2013). Alternativamente, um excesso de zinco contribui para a citotoxicidade do EPR corroborando também para a formação e progressão das drusas (BROWN et al., 2019).

Qualquer interrupção na comunicação entre os coriocalilares e as células fotorreceptoras, como a presença de compostos drusenoides, pode induzir hipóxia local que potencialmente acarretará na degeneração progressiva destas células com consequente aumento das drusas. Cria-se um ciclo vicioso. E com a idade, devido ao espessamento da membrana de Bruch e ao afinamento destes coriocalilares maculares, forma-se um ambiente ainda mais propício a todo o processo degenerativo (BROWN et al., 2019).

Alterações metabólicas adicionais como a diminuição no fator de von Willebrand e das proteínas de classe I do antígeno leucocitário humano (HLA), por se tratarem de proteínas específicas vasculares, geram uma desdiferenciação das células endoteliais em olhos com DMRI inicial que, em conjunto com a perda da camada de células do EPR, criam uma desregulação da homeostase local e também estão associadas ao desenvolvimento de DMRI (BROWN et al., 2019; YUAN et al., 2010).

Contudo, a DMRI seca comumente só é percebida pelo paciente quando já progrediu para o estágio intermediário ou avançado da doença onde ocorre lesão e/ou atrofia dos fotorreceptores e do EPR na porção central da retina com consequente baixa da acuidade visual (Figuras 3, 4 e 5). Atualmente, não há muitas terapias eficazes para esta forma da doença, sendo um estilo de vida saudável e o uso de polivitamínicos específicos (formulação AREDES 2) os meios mais indicados para se retardar sua progressão (VOLZ; PAULY, 2015).

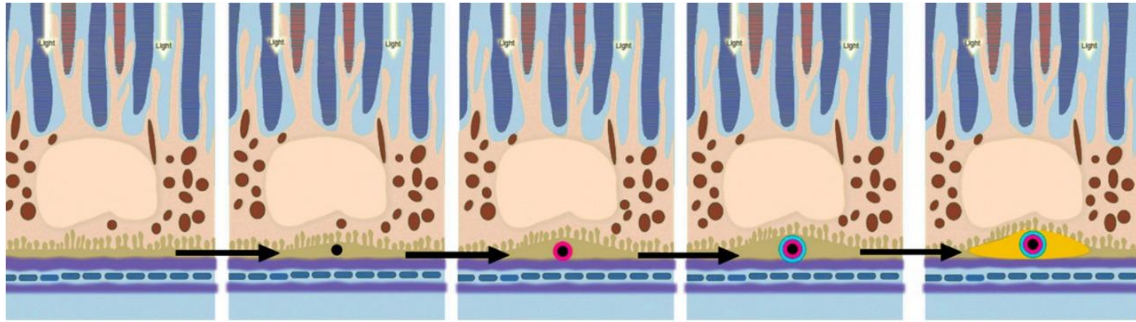


Figura 3: Modelo de formação de depósitos sub-RPE (drusas). A formação e crescimento das drusas associados à precipitação de HAP (hidroxiapatita, vermelho) contendo colesterol (preto). As proteínas (azul) ligam-se à superfície HAP, o que facilita a deposição adicional de detritos levando, em última instância, à formação dos depósitos sub-RPE macroscópicos (amarelo). Os melanócitos são representados como partículas marrons no EPR. Fonte: adaptado de THOMPSON et al, 2015.

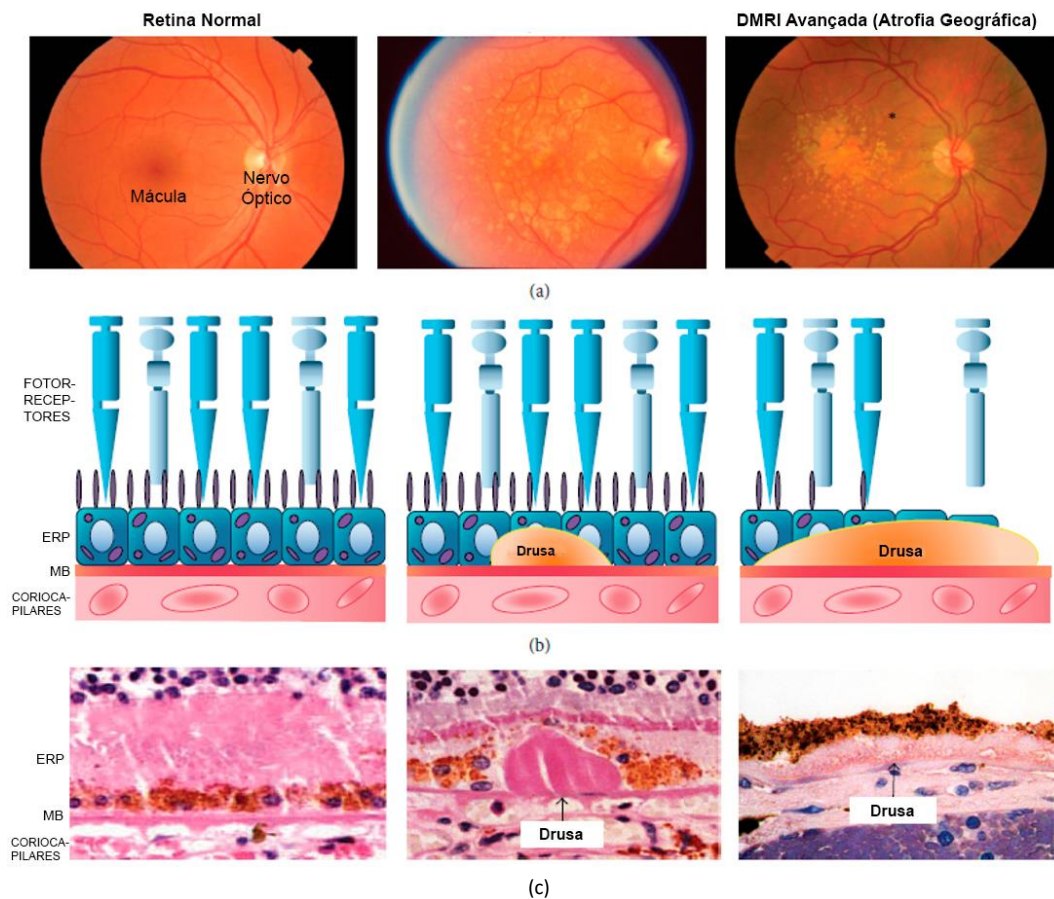


Figura 4: Estágios clínicos e sinais de DMRI. (a) As fotos do fundo do olho demonstram características clínicas da AMD em diferentes estágios. A DMRI inicial mostra depósitos extracelulares amarelos de drusas em torno da área macular. DMRI tardia (GA) mostra alterações pigmentares em torno das drusas. Um grande número de depósitos de drusas são observados acumulados na área macular. (b) Diagrama esquemático da degeneração do EPR/Fotorreceptores da DMRI. (c) Imagens histopatológicas de cadáveres (enucleação) em condição de normalidade, DMRI em estágio inicial e DMRI em estágio avançado. Fonte: adaptado de GAO et al, 2015.

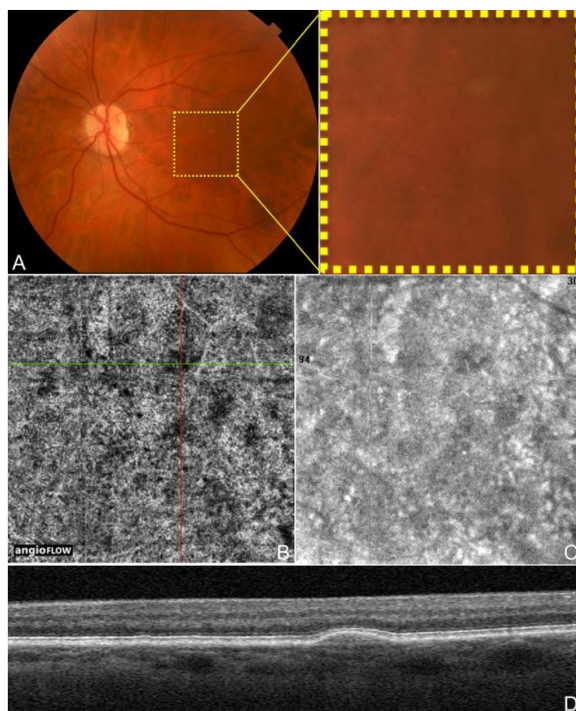


Figura 5: DMRI seca. OCT angiography (angiograma por Tomografia de Coerência Óptica). Olho esquerdo de um homem caucasiano de 72 anos com degeneração macular relacionada à idade (DMRI) do tipo seca usando angiograma por tomografia de coerência óptica (OCTa) do RTVue XR Avanti (Optovue, Inc., Fremont, CA). (A) Foto colorida do fundo de olho ampliada para uma área de aproximadamente 3 x 3 mm centrada na mácula mostrando drusas. (B) O angiograma de OCT (3x3 mm) dos coriocapilares maculares, como em A. As linhas verde e vermelha representam os *b-scans* de OCT dos eixos x e y que respectivamente cruzam em uma drusa demonstrando uma área de sinal diminuído nos coriocapilares subjacentes à mesma. (C) OCT estrutural dos coriocapilares maculares como em A-B (*En face OCT*). Essa imagem foi obtida simultaneamente durante a mesma varredura do angiograma de OCT em B. (D) *b-scan* OCT na seção transversal demonstrada pela linha verde em B evidenciando drusa. Tais cortes foram obtidos simultaneamente durante a mesma varredura do angiograma de OCT em B. Fonte: adaptado de CARLO et al, 2015.

A forma mais severa de manifestação clínica da DMRI é a neovascular, que abarca dois terços dos casos tardios avançados e responde por 90% dos casos de cegueira legal provocados pela doença (CHAKRAVARTHY et al., 2010). Esta afecção resulta de uma neovascularização coroidal que pode gerar extravasamento de fluido e mesmo de sangue para a retina, levando à deformação retiniana com potencial baixa visual, metamorfopsia e morte celular da área atingida, muitas vezes irreversível (Figuras 6 e 7). A forma neovascular representa também a maioria absoluta dos casos de resistência terapêutica (ÁVILA; GARCIA; ISAAC, 2015; KASSOFF et al., 2001).

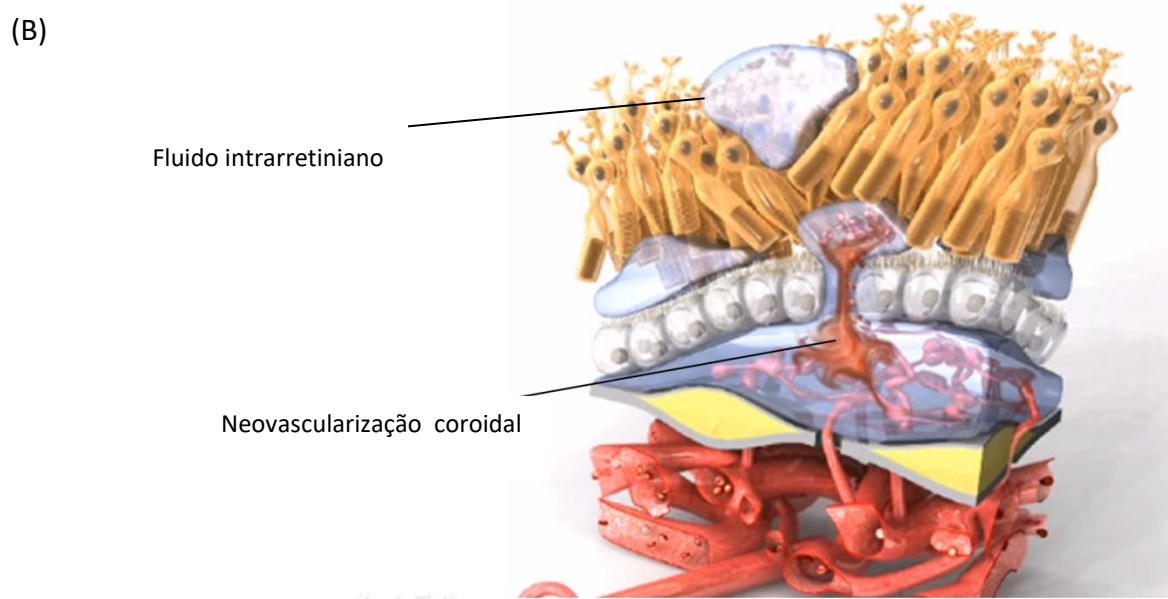
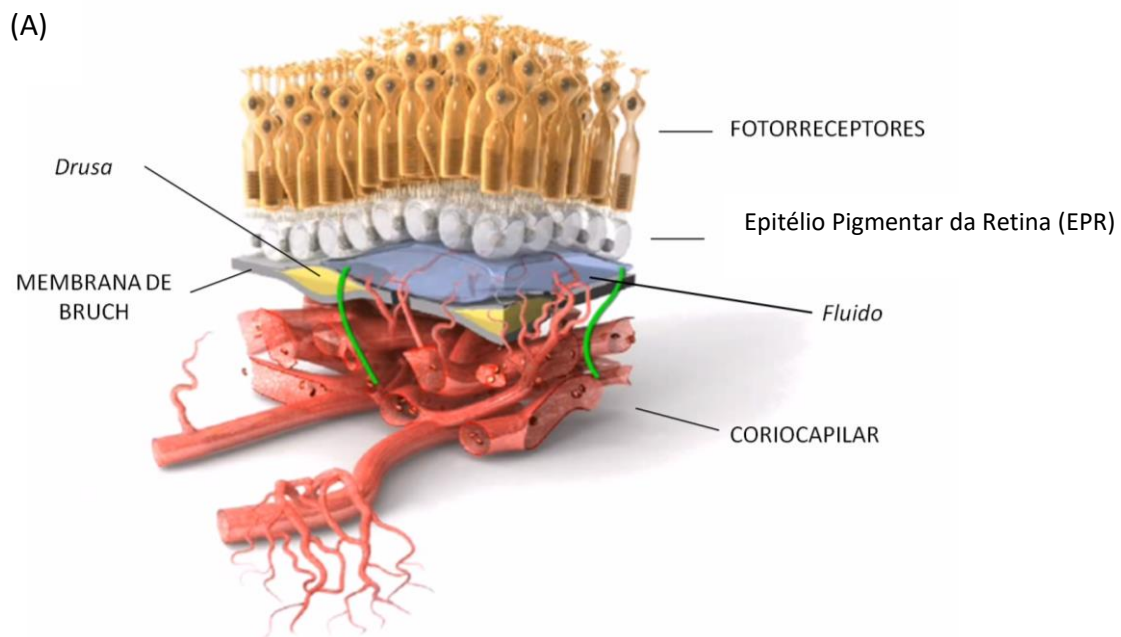


Figura 6: DMRI neovascular. Progressão da neovascularização coroidal. Esquema da progressão da neovascularização coroidal em pacientes com DMRI. Fonte: adaptado de The Science of AMD / The Angionenesis Foundation

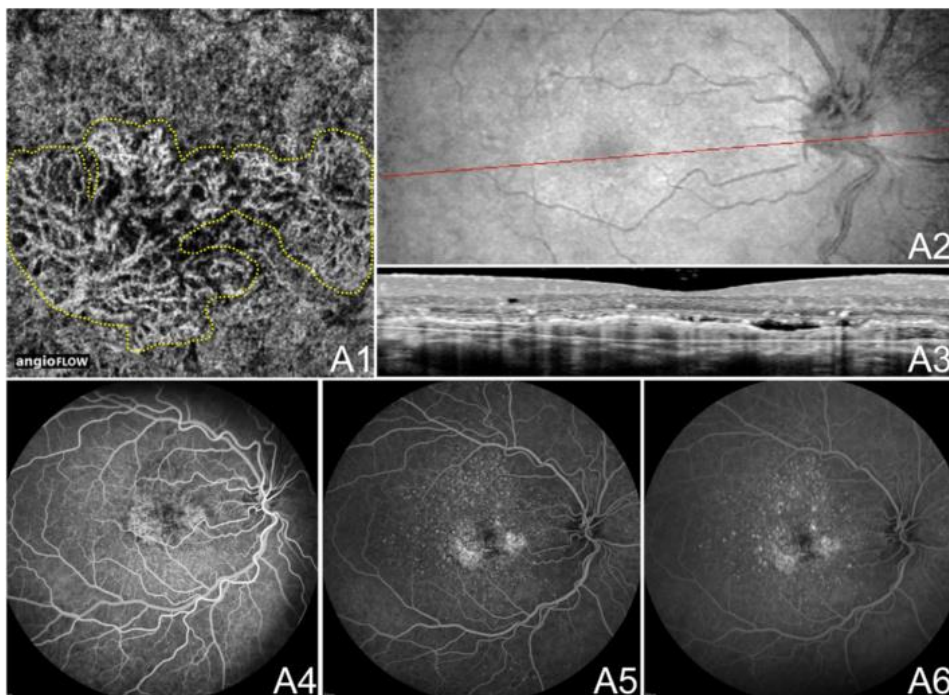


Figura 7: DMRI neovascular (DMRIv). OCT angiography (angiograma por Tomografia de Coerência Óptica) e Angiofluoresceinografia.(A) OD, homem branco, 63 anos. Angiovue - angiogramas de coerência óptica (Optovue, Inc., Fremont, CA). (A1) angiograma OCT 3 x 3 mm segmentado demonstrando retina externa e coriocapilares. Vasos anormais cercados por coriocapilares relativamente homogêneos. Os vasos anormais existem abaixo e acima da Membrana de Bruch. (A2-3) OCT estrutural com uma linha vermelha correspondente a um b-scan OCT da mácula. A3 *b-scan* OCT demonstra descolamento do epitélio pigmentado da retina (DEP), FSR, coleção cistóide intrarretiniana e material hiperreflectivo típico da neovascularização coroidal. (A4-6) Angiofluoresceinografia em estágios iniciais, intermediários e tardios demonstrando aumento da hiperfluorescência em porção central da retina. Fonte: adaptado de CARLO et al, 2015.

Sendo a DMRI uma doença multifatorial, os primeiros tratamentos para a sua forma neovascular basearam-se inicialmente em fotocoagulação a laser de lesões extramaculares e terapia fotodinâmica com verteporfina. Com estes tratamentos, foi possível a prevenção da perda visual, no entanto, não houve ganho terapêutico considerável de visão. A terapia com fotocoagulação a laser térmico apresenta ainda recidiva considerável e dano ao campo visual (AMARO et al., 2011). Já a terapia fotodinâmica (PDT), apesar de ainda utilizada para vasculopatia polipoidal idiopática da coróide, no que se refere à neovascularização de DMRI, apresenta resultados pouco precisos (SPAIDE; SORENSON; MARANAN, 2005). Nas últimas duas décadas, contudo, estudos com inibição do fator de crescimento vascular e endotelial (VEGF) demonstraram regressão da neovascularização e melhoravisaual. Esta terapia anti-angiogênica (anti-VEGF) é atualmente o tratamento padrão ouro para DMRI neovascular, na medida em que é consenso que o VEGF está no seu

cerne fisiopatológico e que os anticorpos administrados por via intravítrea provaram ser altamente eficazes e seguros (CHAKRAVARTHY et al., 2012; GAO et al., 2018; GROUP et al., 2011; HEIER et al., 2012).

Existem no mercado três drogas antiangiogênicas (anti-VEGF) com relativa equivalência em eficácia que são amplamente utilizadas em escala mundial para o tratamento da DMRI neovascular: o bevacizumabe (*Avastin*®), o ranibizumabe (*Lucentis*®) e o aflibercept (*Eylia*®) (CHAKRAVARTHY et al., 2012; EHLKEN et al., 2014; GROUP et al., 2011; HEIER et al., 2012). Cerca de um quarto dos pacientes não se beneficiam completamente da injeção intra-vítrea e há progressiva perda da acuidade visual em detrimento ao tratamento preconizado. Este dado corrobora, portanto, com a ideia de que múltiplas vias fisiopatológicas influenciam a história natural da doença (EHLKEN et al., 2014).

Devido a incongruências conceituais, foi proposta uma classificação uniforme da DMRI quanto à resposta ao VEGF sumarizada no quadro abaixo:

Resposta a Terapia anti-VEGF no DMRI		
Resposta	Morfologia	Funcional
Boa (I)	Ausência de fluido subretinal (FSR), fluido intraretinal (FIR), cistos intraretinais (CIR) ou a redução da espessura central da retina no subcampo central (CRT) >75% dos valores de base	Aumento da acuidade visual (AV) > 5 letras da linha de base (efeitos de teto nos olhos com bom início de AV, definido como ETDRS 70 letras ou acima). Prestar mais atenção nas características morfológicas se AV for boa esp>70).
Parcial (II)	Redução do CRT entre 25 a 75% dos valores de base, e/ou persistência do FSR, FIR, CIR e/ou aparecimento de novo CIR, FIR e FSR	Mudança da AV de 1-5 letras da linha de base
Pobre (III)	Entre 0 a <25% de redução do CRT e/ou persistência do FSR, FIR, CIR e/ou	Mudança da AV de 0-4 letras

aparecimento de novo CIR,
FIR e FSR

**Não há resposta
(= ausência de resposta)
(IV)**

Nenhuma mudança ou Mudança >5 letras, ou seja, aumento de CRT, FSR, FIR declínio da AV da linha de e/ou DEP comparado com a base desde 1 mês após a linha de base terceira injeção inicial

Notas:

1. Atrofia da retina/adelgaçamento e/ou fibrose subretiniana não envolvem resposta pobre, mas confunde AV. Similarmente, mudanças mínimas do fluido sobre o tecido cicatricial etc podem não implicar em resposta pobre. Estes podem resultar de uma doença de longa data e não do resultado do tratamento.
2. Tubulações retinianas externas (TRE) não representam vazamento de fluido ativo.
3. Presença de DEP – evidência até a data não indica que achatamento de PED determina resultados; entretanto, progressão de DEP indica ativação da doença e requer ICGA para excluir IPCV e/ou considerar a mudança de tratamento.
4. Características (respostas) morfológicas ou funcionais podem não estar correlacionadas.
5. Primeira resposta determinada após fase inicial, ou seja, na primeira visita após ter iniciado a terceira injeção.
6. Respostas secundárias são determinadas em qualquer tempo desde 1 mês após o início da terceira injeção (meses 4-11).
7. Respostas atrasadas são determinadas no 12º mês ou após.

Quadro 2: Normatização de Resposta Terapêutica ao anti-VEGF na DMRI. Fonte: adaptado de AMOAKU et al., 2015)

As vias da angiogênese na DMRI, por sua vez, já foram correlacionadas com vias do estresse oxidativo, ativação do sistema do complemento, ativação do sistema imune e metabolismo lipídico (Figuras 8 e 9) (AMBATI; ATKINSON; GELFAND, 2013; REZAR-DREINDL et al., 2016; VOLZ; PAULY, 2015).

1.4.1. Angiogênese e DMRI

A principal característica da DMRI neovascular é a formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes. Existem três tipos de membranas neovasculares: *(i)* na tipo 1, a neovascularização cresce na coróide, abaixo do EPR; *(ii)* na tipo 2, cresce da coróide, rompe a membrana de Bruch e o EPR até atingir o espaço sub-retiniano e *(iii)* na tipo 3, a neovascularização cresce na direção oposta, ou seja, nasce nos leitos capilares retinianos e seguem em direção aos coriocapilares (LONG et al., 2018). O mecanismo de iniciação exato de proliferação de células endoteliais e migração celular através da membrana de Bruch não é completamente conhecido, mas infere-se ser regulado por fatores de crescimento, interleucinas ou plasminogênios (VOLZ; PAULY, 2015). Reforçado por inúmeros ensaios clínicos, o VEGF está – pois - no centro fisiopatológico da neovascularização coroidal em pacientes com DMRI (CHAKRAVARTHY et al., 2012; GAO et al., 2018; GROUP et al., 2011; HEIER et al., 2012).

1.4.2. Estresse Oxidativo e DMRI

O estresse oxidativo, em resumo, trata-se de uma condição biológica em que ocorre desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a sua remoção ou ainda desequilíbrio no reparo dos danos causados. A retina como um todo e particularmente a mácula estão expostas a este processo que, quando prolongado, pode reduzir a expressão de inibidores do sistema do complemento, estimulando a inflamação e até mesmo o VEGF a ponto de comprometer a função de barreira do EPR (ROHOWETZ; KRAUS; KOULEN, 2018; ZARBIN; ROSENFELD, 2010).

A exposição constante à luz, a elevada atividade metabólica macular, o envelhecimento e o acúmulo patológico de lipoproteínas entre o epitélio pigmentar da retina e a membrana de Bruch são os principais responsáveis pelas lesões oxidativas das células do próprio EPR, o que propicia um ambiente favorável à degeneração macular (KAUPPINEN et al., 2016).

1.4.3. Sistema do Complemento e DMRI

O sistema do complemento é uma ponte importante entre o sistema imune adaptativo (adquirido) e o inato. É formado por mais de 30 proteínas, tanto solúveis no plasma como expressas nas membranas celulares. Consiste no principal mediador humoral do processo inflamatório junto aos anticorpos e tem função de ativar a resposta imune do paciente, fornecendo um mecanismo de defesa contra patógenos ou tecidos próprios modificados. Três caminhos diferentes ativam o sistema do complemento, todos por meio de cascatas de proteínas elaboradas: a via clássica, a via da lectina e a via alternativa (VOLZ; PAULY, 2015; YAMAMOTO; PORTINHO, 2001).

O sistema do complemento no olho é continuamente ativado sob rígido controle por proteínas reguladoras como os fatores do complemento solúvel H (CFH) e I (CFI) ou proteínas ligadas à membrana CD46 ou CD55. Vários componentes do complemento (por exemplo, iC3b, CD46, CD59), no entanto, foram encontrados nas drusas, fazendo desse sistema um potencial alvo terapêutico para o desenvolvimento de anticorpos específicos, numa possível terapia personalizada (VOLZ; PAULY, 2015).

1.4.4. Inflamação e DMRI

O envelhecimento do EPR em combinação com a desregulação imunológica parece desempenhar um papel fundamental na quebra da homeostase na DMRI. Ao se detectar concentrações elevadas de componentes do sistema do complemento ativados, bem como aumento da presença de micróglia no olho dos pacientes, foi possível inserir o sistema imune inato na fisiopatologia da DMRI (ZHAO; WONG, 2012). Também reforça-se o conceito da ativação do sistema imune adaptativo (LIU et al., 2011), porém, os eventos que levam à ativação e regulação por citocinas inflamatórias das células B e T ainda não foram completamente elucidados (CAMELO, 2014; LIU et al., 2011).

A participação dos processos imunológicos no desenvolvimento, progressão e tratamento da DMRI resultou na inferência do efeito sinérgico de drogas imunossupressoras ao atual tratamento clássico com anti-VEGF em pacientes com DMRI neovascular. Os achados preliminares mostraram uma melhora na acuidade visual e na espessura da retina, mas tratam-se ainda de estudos incipientes (VOLZ; PAULY, 2015).

1.4.5. Metabolismo lipídico e DMRI

Ainda não se compreende de forma definitiva a formação dos depósitos drusenóides e debris metabólicos retinianos entre o EPR e a membrana de Bruch (drusas) ou entre o EPR os segmentos externos dos fotorreceptores (pseudodrusas reticulares). Entretanto, já é consenso na literatura sua composição rica em proteínas, lipídeos e minerais. E especificamente em relação aos lipídios, predominam colesterol, ésteres de colesterol e fosfatidilcolina (VAN LEEUWEN et al., 2018).

Fisiologicamente, as lipoproteínas selecionadas ou produzidas pelo EPR são de muito baixo peso molecular e podem seguir para os coriocapilares sem maiores restrições. Entretanto, com o envelhecimento das células do EPR e o espessamento da membrana de Bruch, ocorrem retenção e acúmulo destes compostos inicialmente na própria membrana até o total comprometimento do EPR. Mediante estresse oxidativo local e em um processo de retroalimentação positiva, as drusas tendem ao aumento em número e tamanho, gerando progressão da doença (HANDA et al., 2017).

A apolipoproteína E (Apo E), altamente expressa na membrana de Bruch e EPR, regula a permeabilidade desta membrana às lipoproteínas. O subtipo E2 especificamente, além de reduzir a permeabilidade, aumenta o acúmulo desses detritos correlacionados com a formação das drusas. Estudos já demonstraram que Apo E promove a sobrevivência de células fagocíticas mononucleares subretinianas, perpetuando um processo inflamatório crônico na DMRI (LEVY et al., 2015).

O transporte de lipídios por meio das membranas biológicas é de fundamental importância para a estrutura, função e sobrevivência celular. Trata-se de um processo normalmente mediado por uma variedade de proteínas integrantes da

membrana. No ciclo visual, destacam-se transportadores ATP-dependentes do tipo ABC com destaque para o membro 4 da subfamília A (ABCA4). Trata-se de um transportador localizado nos segmentos externos dos fotorreceptores que atua como transportador de membrana para a reciclagem de cromóforos no EPR durante o ciclo visual (HUSSAIN et al., 2018). Fritsche e colaboradores (2012) demonstraram associação entre alterações do ABCA4 e atrofia geográfica, estágio avançado de DMRI seca (FRITSCHÉ et al., 2012).

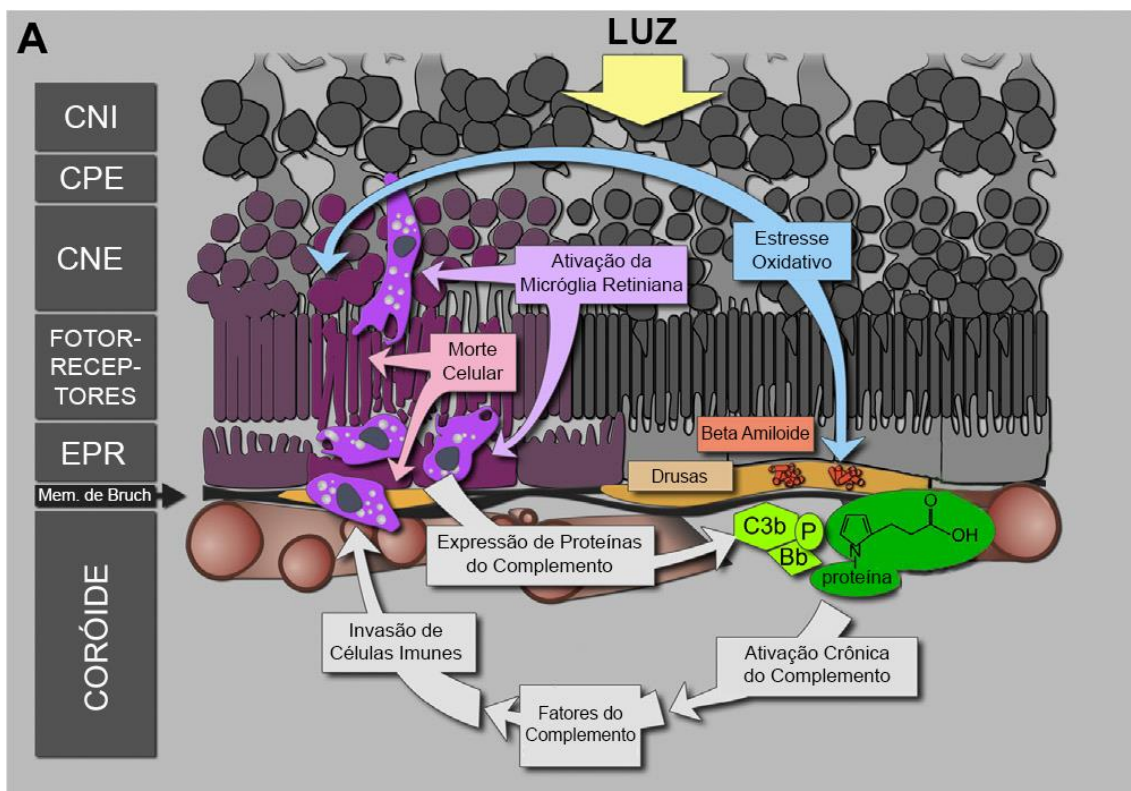


Figura 8: Patogênese DMRI seca. Uma combinação de estresse oxidativo, ativação de células da microglia e alteração da homeostase do metabolismo celular resultam na deposição de proteínas modificadas, beta-amilóide e outros detritos celulares entre o EPR e a membrana de Bruch para a formação da drusa. As drusas prejudicam o fornecimento de nutrientes e oxigênio ao EPR e aos fotorreceptores. A ativação crônica do sistema do complemento atrai células imunes sistêmicas gerando morte celular na região macular. (EPR: epitélio pigmentar da retina; CNE: camada nuclear externa; CPE: camada plexiforme externa; CNI: camada nuclear interna). Fonte: adaptado de VOLZ; PAULY, 2015.

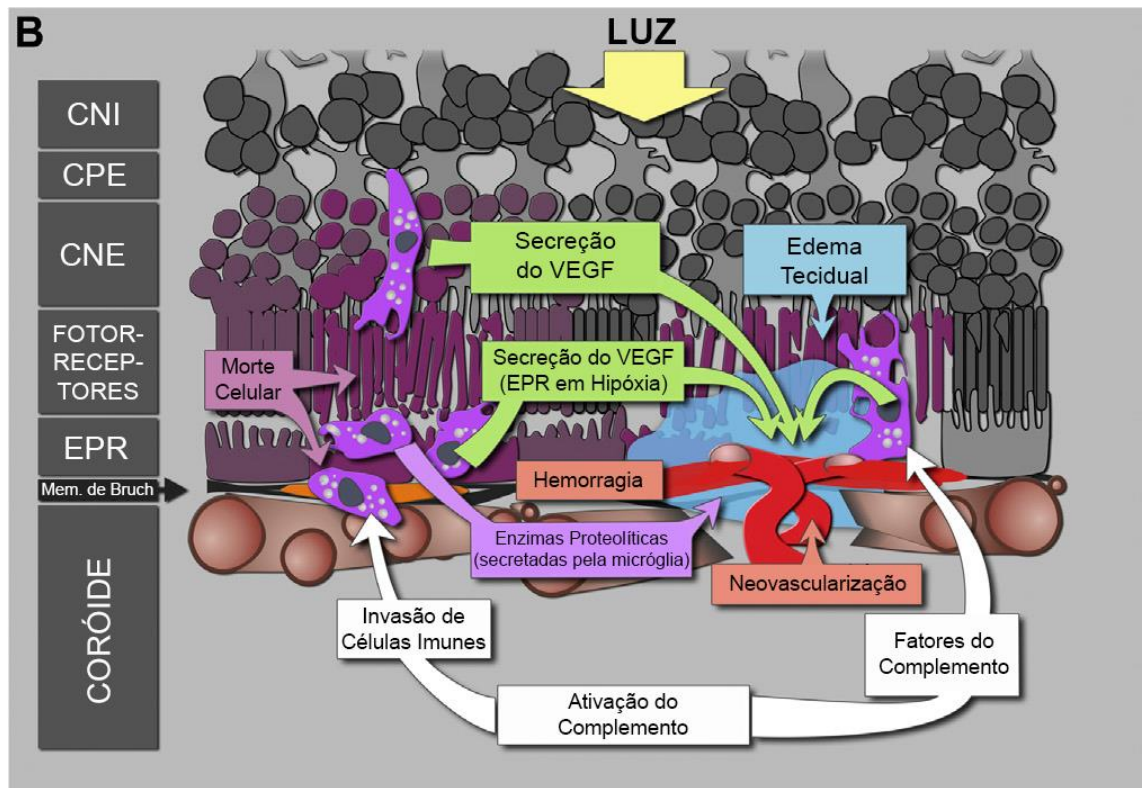


Figura 9: Patogênese da DMRI neovascular. A neovascularização penetra na membrana de Bruch e invade o espaço sub-retiniano. O VEGF produzido pelas células de Müller, células do EPR e células imunes rege este processo. (EPR: epitélio pigmentar da retina; CNE: camada nuclear externa; CPE: camada plexiforme externa; CNI: camada nuclear interna). Fonte: adaptado de VOLZ; PAULY, 2015.

1.4.6. Principais Efeitores Moleculares da Fisiopatologia da DMRI

A literatura médica demonstra, por trabalhos clínicos e experimentais, múltiplos fatores moleculares envolvidos na fisiopatologia da formação de drusas e progressão da DMRI. Destacam-se, não necessariamente por ordem de prioridade, os seguintes já conhecidos:

1.4.6.1. Fator de crescimento vascular e endotelial (VEGF)

É consenso na literatura o papel crítico do VEGF na neovascularização retiniana e coroidal. Há polêmica, porém, na repercussão da sua supressão total para a retina, EPR e coróide. Entende-se que a esta supressão absoluta possa causar atrofia dos coriocapilares, que por sua vez, provocaria danos ao EPR sobrejacente e retina (KURIHARA et al., 2012). No entanto, é improvável que injeções intra-oculares de anti-VEGF garantam supressão suficiente do VEGF produzido pelo EPR que propicie esse fim indesejável. Ainda é controversa na literatura a completa elucidação da atrofia macular encontrada em alguns pacientes com DMRI tratados com anti-VEGF. Acredita-se que não seja um dano direto da medicação, visto que, essa atrofia não é caracteristicamente encontrada em outras afecções tratadas com os mesmos agentes (CAMPOCHIARO, 2015). Sendo assim, outras vias devem ser melhor elucidadas para uma maior compreensão multifatorial da fisiopatologia da DMRI.

1.4.6.2. Inibidores endógenos de angiogênese

Adegradação proteolítica de componentes da membrana basal e outras proteínas resulta em fragmentos que participam de um sistema de retroalimentação negativa da angiogênese quando o reparo normal da lesão está em processo de finalização. Assim, angiostatina (fragmento de plasminogênio), endostatina (fragmento de colágeno XVIII) e múltiplos fragmentos de colágeno IV têm atividade antiangiogênica (O'REILLY, 1997; PETITCLERC et al., 2000). Existem também proteínas complexas como ofator derivado do epitélio pigmentar (PEDF) e trombospondinas que participam da supressão da angiogênese (DAWSON et al., 1999). Um terceiro componente do sistema de defesa antiangiogênico endógeno é o antagonista de VEGF chamado receptor FMS-símile tirosina quinase-1 solúvel (sFIT-1) (FAILLA; CARBO; MOREA, 2018).

1.4.6.3. Efeitores da matriz extracelular (EMEC)

Sinais derivados da matriz extracelular (MEC) também participam da neovascularização coriorretiniana. Assim, a invasão e migração de células endoteliais através da matriz extracelular são moduladas por moléculas de adesão celular, com destaque para as integrinas. A secreção de enzimas proteolíticas chamadas metaloproteinases (MMPs) potencializa este processo, que é modulado por inibidores tissulares chamados TIMPs (DAMICO, 2007; KADONOSONO et al., 1999; NITA et al., 2014).

Estudos experimentais descrevem que em ambiente de hipóxia e mediante a produção de receptor da fibronectina (como a integrinas $\alpha 5\beta 1$), forma-se uma membrana fibrovascular neoangiogênica que pode não regredir a curto ou longo prazo, mesmo quando o VEGF é bloqueado. Sendo assim, estudos inferem que uma molécula antagonista destes referidos efetorespode levar à apoptose das células endoteliais participantes na neovascularização coroidal, resultando em sua regressão (UMEDA et al., 2006).

1.4.6.4. Beta amiloide

O efetor beta-amiloide é representado por um grupo de peptídeos curtos que resultam da clivagem de proteínas precursoras amilóides. Tal grupo peptídico é encontrado em depósitos extracelulares como drusas de pacientes com DMRI ou placas amilóides no cérebro dos pacientes com Alzheimer, o que permite que a literatura faça um paralelo ainda não completamente elucidado entre estas condições clínicas (LEE et al., 2019; OHNO-MATSUI, 2011). Tais peptídeos interagem com o sistema do complemento e trabalhos demonstram que, neste ambiente, a expressão de VEGF em células do EPR é aumentada. Ainda são alvos terapêuticos pré-clínicos, necessitando de pesquisas complementares para ratificar e viabilizar seu potencial em DMRI (VOLZ; PAULY, 2015; YOSHIDA et al., 2005).

1.4.6.5. Tirosina cinases (PTKs)

As tirosina cinases ou proteína quinases (PTKs) são proteínas responsáveis pela fosforilação de substratos proteicos, como por exemplo, enzimas. Atuam como um ponto de apoio na rede de moléculas sinalizadoras independentes, cuja função é a regulação da expressão gênica. Podem ser divididas em duas famílias: as proteínas cinases receptoras, a exemplo do receptor de insulina e os diversos receptores do fator de crescimento e proteínas cinases não-receptoras. A fosforilação das PTKs é um mecanismo chave nos processos de proliferação e diferenciação de células endoteliais, uma vez que a atividade de receptores da tirosina cinase é um pré-requisito para a vasculogênese e a angiogênese. Neste contexto, o receptor transmembrana de proteína tirosina-cinase 2 (Tie2) é expresso predominantemente nas células endoteliais vasculares. A Angiopietina 1 (Ang1) liga-se a este receptor e estimula a fosforilação de mediadores da angiogênese como a óxido nítrico sintetase (eNOS), receptor de tirosina quinase B (Akt) e quinases reguladas por sinais extracelulares (ERK). Já a angiopietina 2 (Ang2) consiste em uma citocina pró-angiogênica também já implicada em DMRIn e correlacionada com acuidade visual, espessura macular central e gravidade de apresentação da doença (NG et al., 2017). O Tie2 também é regulado por uma fosfatase, denominada proteína endotelial vascular tirosina fosfatase (VE-PTP). Estudos experimentais demonstraram que tal proteína está aumentada em ambiente de hipóxia retiniana e que o antagonismo de VE-PTP com um anticorpo específico pode suprimir a neoangiogênese (CAMPOCHIARO, 2015).

1.4.6.6. Fator de Crescimento Placentário (PLGF)

O fator de crescimento placentário (PLGF) tem seu mais alto nível de expressão no endotélio e ativa especificamente o receptor 1 de VEGF (VEGFR1). Este receptor, por sua vez, atua na superfície celular como receptor tanto do PLGF como também para outros membros da família do VEGF (VEGFA e VEGFB), desempenhando um papel essencial no desenvolvimento da regulação da angiogênese coroidal (NOWAK, 2006). Reforçando a função angiogênica e relação do fator de crescimento placentário com o VEGFR1, estudos experimentais

demonstram que a supressão de VEGF A em olhos com níveis elevados de PLGF não elimina todos os estímulos angiogênicos coroidais inerentes à DMRI neovascular (CAMPOCHIARO, 2015).

1.4.6.7. Fator de Crescimento derivado de plaquetas B (PDGF-B)

Também atua como fator de crescimento ao regular a formação de vasos sanguíneos ou a neoangiogênese coroidal. A expressão de PDGF-B é otimizada em ambiente de hipóxia, predominantemente em células do endotélio vascular e é importante no recrutamento de pericitos de capilares. Estudos experimentais demonstraram que o bloqueio seletivo de PDGF-B causa leve supressão da neovascularização coroidal em locais de ruptura de membrana de Bruch e tem um efeito supressivo adicional quando combinado com um antagonista de VEGF (LINDBLOM et al., 2003).

1.4.6.8. Fator 1 Derivado do Estroma (SDF-1)

O fator 1 derivado do estroma (SDF-1) e seu receptor (C-X-C motif receptor 4, CXCR4) encontram-se em concentrações elevadas na retina hipóxica. Trata-se de uma quimiocina cujo aumento na produção leva a uma neovascularização pelo recrutamento de células progenitoras endoteliais (CPEs) e pela indução de um processo inflamatório (RINSKY et al., 2017). Apesar de localizados principalmente em macrófagos, pesquisas demonstraram que os receptores de SDF-1 também são expressos por células gliais retinianas, o que sugere uma estimulação autócrina (LIMA E SILVA et al., 2007). Os antagonistas de CXCR4, por suprimirem fortemente os três tipos de neovascularização retinianas, fornecem novas perspectivas de alvos terapêuticos complementares aos antagonistas do VEGF (LIMA E SILVA et al., 2007).

1.4.6.9. Lipofuscina (LC)

Uma das principais funções do epitélio pigmentar da retina é a autofagia dos segmentos externos dos fotorreceptores em um processo denominado heterofagia.

E com o envelhecimento das células do EPR, é comum observar o acúmulo em lisossomos de um metabólito não degradável e autofluorescente chamado lipofuscina (KAUPPINEN et al., 2016).

Trata-se de um lipopigmento formado por lipídeos, metais e proteínas que é especialmente abundante em células nervosas, como as presentes na retina. A literatura confirma sua contribuição para a formação das drusas e, devido ao efeito fototóxico e inflamatório da exposição à luz azul e também ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio, associa a lipofuscina com degeneração retiniana, estresse oxidativo, lesão de células do EPR e, portanto, com DMRI. (MORENO-GARCÍA et al., 2018).

1.4.6.9. Fator Induzido por Hipóxia (HIF-1)

Trata-se de um fator de transcrição, isto é, consiste em uma proteína que se liga ao DNA e promove a transcrição do gene-alvo em RNA. O HIF é uma fator naturalmente produzido na célula de forma contínua, mas em concentrações normais de oxigênio, é marcado pela ubiquitina e degradado por um complexo multiproteico denominado proteassoma. Em estado de hipóxia, no entanto, o HIF-1 se acumula e transcricionalmente regula todos os genes que codificam proteínas implicados na neovascularização retiniana e coroidal (VEGF e seu receptor VEGFR1, PDGF-B e seu receptor PDGFRb, SDF-1 e seu receptor CXCR4, Ang2 e VE-PTP, dentre outros) (CAMPOCHIARO, 2015; KELLY et al., 2003). Desta forma, o HIF 1, assim como o VEGF, potencialmente está envolvido em múltiplas vias fisiopatológicas da DMRI neovascular. E mais, pesquisadores já conseguiram detectar esta molécula-chave no endotélio e macrófagos das membranas neovasculares humanas associadas à DMRI (CAMPOCHIARO, 2013; SEMENZA, 2000).

1.5. Diferença entre neovascularização retiniana e coroidal

Existe considerável sobreposição de proteínas vasoativas envolvidos na neovascularização retiniana e coroidal, principalmente porque o HIF-1 está envolvido em ambos os processos. No entanto, a neovascularização coroidal é mais resistente

à ação de antagonista do VEGF (ROSENFELD et al., 2006). Uma possível explicação está baseada nas diferenças de concentração de proteínas derivadas da matriz extracelular: a neovascularização retiniana cresce em direção ao vítreo, um sítio com pouca celularidade (CAMPOCHIARO, 2015). Mais experimentos são necessários para testar essa hipótese, entretanto o resultado prático da diferença claramente observável na dependência do VEGF é que, apesar da contribuição de outras proteínas vasoativas para neovascularização retiniana, os antagonistas de VEGF são normalmente suficientes. Em contraste, apesar da revolução terapêutica dos anti-VEGF para os casos de DMRI neovascular, ainda há supostas substâncias, ou sinais, que necessitam ser melhor compreendidos para a fisiopatologia adjuvante da neovascularização coroidal. Deve-se notar ainda que os antagonistas do VEGF comumente não causam regressão da neovascularização coroidal em boa parcela dos pacientes com DMRI, entretanto, o tratamento prolongado com anti-VEGF pode resultar em regressão da neovascularização coroidal com atrofia macular secundária (CHANNA et al., 2015). Sendo assim, até uma mais completa elucidação fisiopatológica, para se evitar atrofias retinianas secundárias terminais, muitas vezes, pode ser necessário apenas o controle do extravazamento de fluidos e da neovascularização.

1.6. Biomarcadores e a estratégia translacional em pesquisas médicas

Diversas são as estratégias e métodos utilizados nas pesquisas científicas que podem ser caracterizadas classicamente em dois pólos: pesquisas básicas e estudos aplicados. Apesar da multiplicidade conceitual, o principal objetivo da pesquisa básica é a adesão do conhecimento sem a obrigação de aplicá-lo a fins práticos. No que diz respeito aos estudos clínicos aplicados, estes são pesquisas orientadas para o paciente e podem ser epidemiológicas, comportamentais, podem analisar as manifestações das doenças, as intervenções terapêuticas, o desenvolvimento de novas tecnologias e se materializam classicamente nos ensaios clínicos (BUTLER, 2008; RUBIO et al., 2010). A pesquisa translacional, por sua vez, busca unir estas duas estratégias. Tenta encurtar a transmissão do conhecimento à medida que os resultados das pesquisas são transferidos da bancada laboratorial

para a beira do leito, isto é, das pesquisas básicas para a clínica (RUBIO et al., 2010).

Ainda controverso na literatura, o termo biomarcador constitui uma característica que pode ser objetivamente quantificada, um indicador tanto de processos biológicos normais quanto de condições patológicas ou de respostas farmacológicas às intervenções terapêuticas (STRIMBU; TAVEL, 2010). Pode ainda se tratar de uma propriedade biológica cuja medida ou identificação é útil para a prevenção, diagnóstico, prognóstico, tratamento e acompanhamento das doenças (FUENTES-ARDERIU, 2013). Por conseguinte, sua elegibilidade se dá mediante caracterização objetiva, exatidão e reprodutibilidade. Seu uso em desfechos científicos tornou-se tão comum que normalmente é aceito sem maiores questionamentos (STRIMBU; TAVEL, 2010).

1.7. Espectrometria de massas: uma nova ferramenta de análise na era pós-genômica

A pesquisa translacional está invadindo as subespecialidades médicas com promessa de ser uma evolução da medicina baseada em evidências, objetivando uma aproximação cada vez mais de uma medicina personalizada e de precisão (SIQUEIRA, 2012).

Recentes avanços tecnológicos em proteômica estiveram presentes na última década. A espectrometria de massas trata-se de uma técnica robusta, considerada uma das principais tecnologias em proteômica da atualidade (CEHOFSKI; HONORÉ; VORUM, 2017; YATES, 2019). É uma ferramenta analítica que ioniza espécies químicas e classifica estes íons com base na sua relação massa-carga (m/z). Ou seja, peptídeos e seus fragmentos são ionizados e cada uma destas unidades apresenta uma massa e uma carga específica, que permite sua identificação precisa (Figura 10). Mais recentemente, para reduzir a complexidade das amostras a serem analisadas pelo espectrômetro ou mesmo aumentar o fracionamento dos peptídeos, foi associada a cromatografia líquida de alto ou ultra rendimento (HPCL e UPLC, respectivamente) (PRATIMA; GADIKAR, 2018).

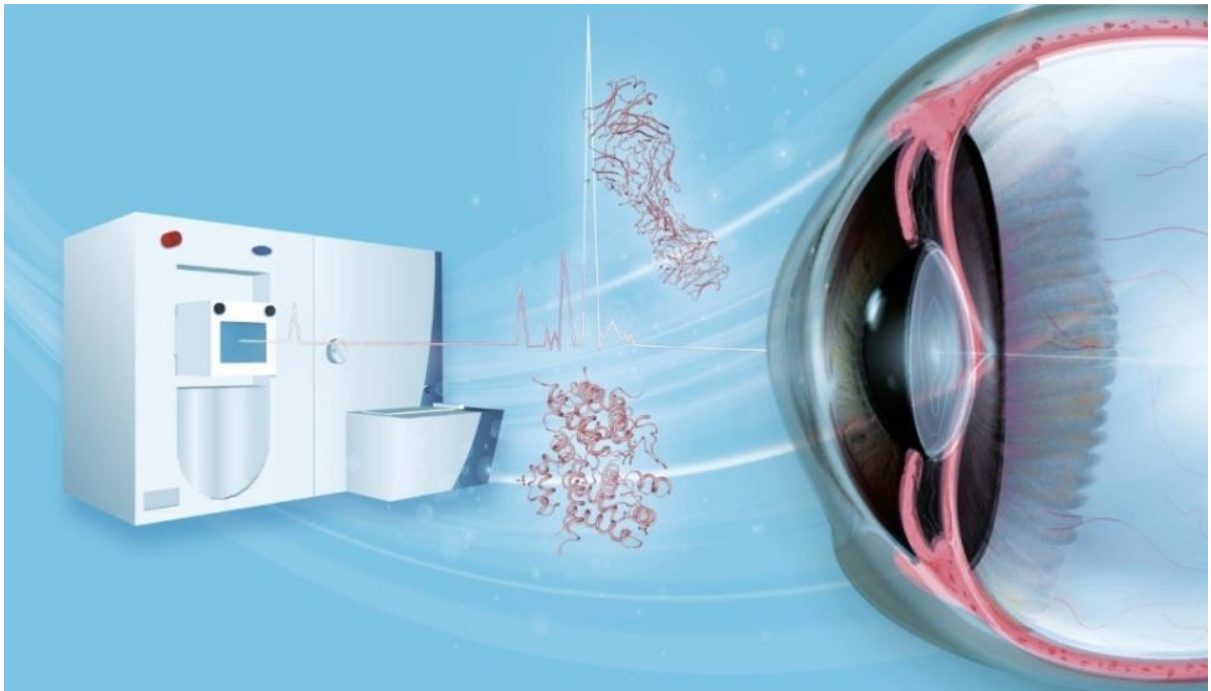


Figura 10: Espectrometria de Massas e Oftalmologia. A principal tecnologia em proteômica da atualidade para encontrar biomarcadores e suas correlações fisiopatológicas em diversas condições oculares. Fonte: do autor (2019)

Na espectrometria de massas utilizada na proteômica, resumidamente, temos uma fonte de ionização, um analisador de massas e um detector. Depois de processar a amostra, compostos peptídicos são ionizados e posteriormente acelerados pelo campo elétrico para serem separados por sua razão massa/carga (m/z) no analisador. Serão, portanto, detectados pelo espectrômetro que está conectado a programas de informática capazes de processar grandes conjuntos de dados. Assim, a espectrometria de massas permite a separação cuidadosa e a identificação com grande acurácia de peptídeos que poderão ser, *a posteriori*, correlacionados com suas proteínas precursoras e vias de processos biológicos.

De maneira geral, os métodos aplicados em proteômica e em particular na espectrometria de massas, podem ser classificados como *top-down* ou *bottom-up*.

No primeiro caso, são avaliadas proteínas intactas e no segundo, as proteínas são hidrolisadas em peptídeos, na chamada fragmentação química (SCHUBERT et al., 2017). A abordagem *top-down* permite cobertura total da sequência e caracterização completa das proteoformas. Já a metodologia *bottom-up* (também conhecida por *shotgun*), apesar de sensível e reprodutível mesmo em casos de proteomas complexos como o do soro/plasma e lisados celulares, fornece respostas baseadas em fragmentos de um todo. No entanto, considerando as limitações técnico-instrumentais atuais, grande parte dos autores considera a análise de proteínas intactas um método ainda com muitas limitações, baixa sensibilidade e baixo rendimento (CATHERMAN; SKINNER; KELLEHER, 2014).

Tipicamente, o fluxo de trabalho na proteômica *bottom-up* inicia com a digestão triptica de uma amostra proteica em peptídeos, que são separados por cromatografia líquida, geralmente de alta ou ultra *performance*, de acordo com a sua hidrofobicidade em fase reversa (AEBERSOLD; MANN, 2003; SCHUBERT et al., 2017). Nesta etapa, cada componente da amostra interage de forma distinta com o material sorvente que, quando pressurizado e bombeado por uma coluna, resulta em tempos de retenção distintos (para cada resíduo de peptídeo), permitindo sua separação e conseqüentemente fracionamento da amostra complexa. A medida que são eluídos, os peptídeos são submetidos a ionização por *electrospray* (ESI) e atraídos para o espectrômetro, onde dois eventos de MS sequenciais (*tandem*) ditos MS1 e MS2 podem ocorrer: MS1 para identificação da razão *m/z* dos íons peptídicos não fragmentados (precursores) e MS2 para aferição da razão *m/z* dos íons fragmentados de peptídeos detectados e especificamente selecionados em MS1 – no presente trabalho a fragmentação dos 15 precursores mais abundantes (*top 15*) – (AEBERSOLD; MANN, 2003; FENN et al., 1989). Cada peptídeo apresenta um padrão único de fragmentação, portanto, conjuntamente os dados permitem a identificação confiável dos peptídeos resultantes da fragmentação. A última etapa consiste em mapear as sequências peptídicas identificadas para proteínas e correlacionar a intensidade dos sinais detectados pelo analisador com alterações relativas a abundância entre as amostras (SCHUBERT et al., 2017).

Diante deste cenário, o número de sítios oftalmológicos para coleta de amostras é, pois, bastante amplo, sendo os principais: córnea, esclera, malha trabecular, cristalino, humor aquoso, íris, corpo ciliar, vítreo, retina, coróide, epitélio

pigmentar da retina e filme lacrimal (FUNKE et al., 2017). Agrega-se a vantagem de ser possível a utilização de amostras *in vivo*, aproximando-se ainda mais da perspectiva de pesquisa translacional (Figura 11).

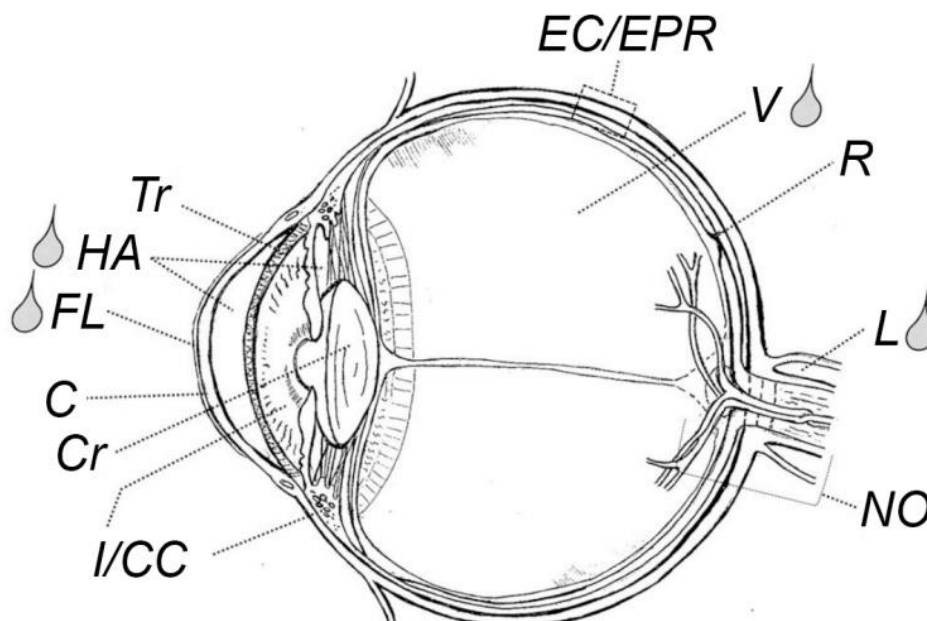


Figura 11: Visão esquemática da anatomia do olho humano. Sítios oculares e biofluidos (símbolo de gota) examinados em estudos proteômicos. (NO: nervo óptico; L: líquido cerebrospinal; R: retina; V: vítreo; EC/EPR: esclera, coróide, epitélio pigmentar da retina; I/CC: íris, corpo ciliar; Cr: cristalino; Tr: malha trabecular; HA: humor aquoso; C: córnea; FL: filme lacrimal). Fonte: adaptado de Funke et al, 2017.

Nos experimentos de descoberta onde se busca investigar todo o perfil protéico (*discovery proteomic*), é comum a seleção de um conjunto de amostras com determinada afecção que será comparada com controles, usando espectrometria de massas, sendo possível identificar um conjunto amplo de proteínas solúveis presentes, incluindo aquelas pouco abundantes. Assim, ao invés de se procurar somente a presença, ausência ou até mesmo a quantidade de determinada proteína, amplia-se as possibilidades investigativas ao se encontrar o proteoma daquela amostra. Fazendo-se então análises pertinentes às hipóteses, torna-se possível a busca por biomarcadores e/ou proteínas inéditas para aquela condição analisada, bem como, um maior entendimento da vias patogênicas de uma dada afecção.

A implementação de técnicas de alto rendimento analítico, como a espectrometria de massas, possibilita análises descritivas e comparativas, com alta

precisão, não invasivas ou minimamente invasivas (KARTHIKKEYAN et al., 2018). Pesquisas em oftalmologia translacional utilizando esta técnica permitem ainda que o olho se torne uma porta de entrada para análises sistêmicas. A validação da técnica geralmente ocorre com análises ortogonais, como Western Blot e ELISA, enquanto a imuno-histoquímica pode fornecer informações sobre a localização das alterações observadas na proteína-alvo (CEHOFSKI; HONORÉ; VORUM, 2017). Alguns autores, contudo, questionam a validação por se tratar de técnicas menos sensíveis e específicas. A mais, pode-se ter uma maior acurácia da avaliação ao se expandir o tamanho da amostra ou por meio de comprovações dos achados em modelos experimentais (CEHOFSKI et al., 2014).

Assim, diante das vantagens da técnica, utilizamos a espectrometria de massas neste estudo experimental.

2. Objetivos

2.1. **Objetivo Primário:**

- Caracterizar, por espectrometria de massas, o perfil proteômico do humor aquoso de pacientes com Degeneração Macular Relacionada à Idade do tipo neovascular (DMRI_n), comparados com pacientes com Degeneração Macular Relacionada à Idade neovascular virgens de tratamento (DMRI_n *naïve*) e pacientes com catarata (controle negativo).

2.2. **Objetivos Secundários:**

- Demonstrar os perfis proteicos alterados nas vias fisiopatológicas da DMRI neovascular com capacidade de discriminação entre os grupos analisados;
- Demonstrar potenciais vias fisiopatogênicas adicionais e potenciais biomarcadores, *in vivo*, em pacientes com DMRI neovascular resistentes ao padrão ouro de tratamento (anti-VEGF) que possam corroborar com o diagnóstico, o prognóstico e/ou com a terapêutica da DMRI neovascular;
- Correlacionar os achados deste estudo com aqueles descritos na literatura internacional.

3. Justificativa

A degeneração Macular Relacionada à Idade (DMRI) representa a principal causa de baixa acuidade visual severa em idosos de países desenvolvidos. Nas suas múltiplas formas representa aproximadamente 10% dos casos totais de cegueira e com tendência de alta na prevalência devido ao envelhecimento da população (BRANDL et al., 2016; RUDNICKA et al., 2012; SCHRAMM et al., 2014; WONG et al., 2014).

A forma neovascular responde pelo maior percentual de perda visual em pacientes com DMRI e o tratamento padrão ouro para este estágio avançado é com medicação antiangiogênica (anti-VEGF), entretanto, cerca de um quarto dos pacientes tratados apresentam resistência (EHLKEN et al., 2014). Isto é, não apresentam, a contento, recuperação morfológica da retina nem melhoram o desempenho visual mesmo com o tratamento instituído. Trata-se de uma doença com tratamento de alto custo que compromete uma população vulnerável e que não tem sua patogênese completamente elucidada.

Por conseguinte, observa-se certa urgência na caracterização molecular da doença para se aprofundar no conhecimento fisiopatológico, ser possível o fornecimento de informações sobre sua resistência à terapêutica padrão, corroborando com a caracterização de possíveis marcadores de diagnóstico precoce e assim buscar novos alvos terapêuticos, ainda que adjuvantes (CAMPOCHIARO, 2015).

4. Pacientes e métodos

Os sujeitos da pesquisa foram pacientes que se submeteram à aplicação intra-vítrea de anti-VEGF para o tratamento de DMRI neovascular. De forma voluntária e respeitando a Declaração de Helsinque, assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), sendo este trabalho aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Oftalmológico de Brasília/Plataforma Brasil, com CAAE 64921317.1.0000.5667.

O humor aquoso coletado por paracentese da câmara anterior do olho com agulha e seringa estéril num volume de 0,5 ml foi armazenado em um recipiente com gelo seco até ser acondicionado em um refrigeradora -80°C no Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas da Universidade de Brasília – LBQP/UnB. O material foi submetido a análise proteômica utilizando técnica analítica de alto desempenho, a ultra cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (uPLC-MS/MS).

Os sujeitos da pesquisa foram separados em 3 grupos: (i) pacientes com DMRI neovascular virgens de tratamento, chamados aqui de *naive*, que em acompanhamento *a posteriori* demonstraram boa resposta ao anti-VEGF; (ii) pacientes com DMRI neovascular resistentes aos anti-VEGF (descritos em detalhes abaixo) e (iii) grupo controle composto por pacientes portadores de catarata, sem patologias sistêmicas ou afecção retiniana de base.

Para a classificação da DMRI, foram realizados exames oftalmológicos completos com documentação da melhor acuidade visual corrigida (MAVC), pressão intra-ocular (PIO), sendo todos os pacientes caracterizados quanto à morfologia retiniana utilizando-se da Tomografia de Coerência Óptica - *Spectral Domain* (OCT-SD). Os seguintes aspectos retinianos foram analisados: presença de fluido intrarretiniano (FIR); fluido subretiniano (FSR); descolamento do Epitélio Pigmentar da Retina (DEP); a espessura macular central (CRT); presença de cistos intrarretinianos (CIR) e presença/aumento de sangramento subretiniano ou sub-epitelial (subEPR).

Para descartar pacientes com diagnósticos diferenciais, foram também realizadas retinografia colorida (RTG), angiofluoresceinografia (AGF), angiografia

com indocianina (ICG) e angiografia por OCT (*OCT angiography*). Todos estavam cientes de que a qualquer momento poderiam se desligar do estudo, sem ônus.

4.1. Critérios de Inclusão

Para categorizar os pacientes como resistentes foi realizada uniformização de classificação da resposta dos indivíduos com DMRI neovascular ao anti-VEGF, sintetizada no quadro que segue:

Resposta a Terapia anti-VEGF no DMRI		
Resposta	Morfologia	Funcional
Boa (I)	Ausência de fluido subretinal (FSR), fluido intraretinal (FIR), cistos intraretinais (CIR) ou a redução da espessura central da retina no subcampo central (CRT) >75% dos valores de base	Aumento da acuidade visual (AV) > 5 letras da linha de base (efeitos de teto nos olhos com bom início de AV, definido como ETDRS 70 letras ou acima). Prestar mais atenção nas características morfológicas se AV for boa esp>70).
Parcial (II)	Redução do CRT entre 25 a 75% dos valores de base, e/ou persistência do FSR, FIR, CIR e/ou aparecimento de novo CIR, FIR e FSR	Mudança da AV de 1-5 letras da linha de base
Pobre (III)	Entre 0 a <25% de redução do CRT e/ou persistência do FSR, FIR, CIR e/ou aparecimento de novo CIR, FIR e FSR	Mudança da AV de 0-4 letras
Não há resposta (= ausência de resposta) (IV)	Nenhuma mudança ou aumento de CRT, FSR, FIR e/ou DEP comparado com a linha de base	Mudança >5 letras, ou seja, declínio da AV da linha de base desde 1 mês após a terceira injeção inicial

Notas:

1. Atrofia da retina/adelgaçamento e/ou fibrose subretiniana não envolvem resposta pobre, mas confunde AV. Similarmente, mudanças mínimas do fluido sobre o tecido cicatricial etc podem não implicar em resposta pobre. Estes podem resultar de uma doença de longa data e não do resultado do tratamento.
2. Tubulações retinianas externas (TRE) não representam vazamento de fluido ativo.
3. Presença de DEP – evidência até a data não indica que achatamento de PED determina resultados; entretanto, progressão de DEP indica ativação da doença e requer ICGA para excluir IPCV e/ou considerar a mudança de tratamento.
4. Características (respostas) morfológicas ou funcionais podem não estar correlacionadas.
5. Primeira resposta determinada após fase inicial, ou seja, na primeira visita após ter iniciado a terceira injeção.
6. Respostas secundárias são determinadas em qualquer tempo desde 1 mês após o início da terceira injeção (meses 4-11).
7. Respostas atrasadas são determinadas no 12º mês ou após.

Quadro 3: Normatização de Resposta Terapêutica ao anti-VEGF na DMRI. (Semelhante ao Quadro 2). Fonte: adaptado de AMOAKU et al., 2015.

Para este estudo, como resistentes, utilizamos os critérios de resposta pobre ou ausência de resposta a 06 aplicações mensais de anti-VEGF. A melhor acuidade visual corrigida (MAVC) estava entre 20/400 e 20/25 pela tabela de Snellen.

4.2. Critérios de Exclusão

Para os pacientes portadores de DMRI, como critério de exclusão, tivemos aqueles que apresentassem sinais de retinopatia que não devido à degeneração macular relacionada à idade. Para os pacientes portadores de catarata senil (envelhecimento fisiológico do cristalino) que compuseram o grupo controle, seriam excluídos qualquer que tivesse sinais de retinopatia evidenciável. Também foram excluídos todos os pacientes com história de cirurgia intraocular diferente da aplicação intra-vítrea de anti-VEGF nos 6 meses prévios ao projeto proposto.

O esforço amostral inicial, isto é, o número de pacientes convocados para compor a pesquisa foi de 250 pacientes. Devido ao crivo dos critérios de inclusão, critérios de exclusão, dificuldades de armazenamento, amostras coletadas com

pequenos volumes e perdas amostras no processamento, foram selecionadas: 05 amostras de pacientes para grupo naive, 10 amostras para o grupo persistente e 10 amostras para o grupo controle. Por questões anteriores às análises (a exemplo de quantidades de peptídeos totais menor que os mínimos exigidos para cada corrida) e posteriores ao pré-processamento analítico (ex.:inadequado alinhamento das amostras entre os grupos no *sowftware* Progenesis), obteve-se o número de 5 amostras para cada grupo. Uma análise de potência estatística *a posteriori* mostrou, contudo, que 5 pacientes por fenótipo (grupo) foram suficientes para demonstrar robustez estatística, isto é, para atingir 86,4% das amostras com potência > 0,8.

4.3. Riscos e Benefícios

Apesar de ser consenso que o tratamento padrão ouro para a DMRI neovascular é a aplicação de anti-VEGF, o volume injetado intra-vítreo pode provocar aumento da pressão intra ocular (PIO). E, em sua consequência, poderia ocorrer oclusão da artéria central da retina, hipoperfusão da cabeça do nervo óptico, hipofluxo macular que culminariam em lesão retiniana com perda de camada de fibras nervosas e prognóstico visual potencialmente reservado (HUANG et al., 2008; KATAYAMA et al., 2014; SHIN et al., 2017; TSUI; CHIANG; TSAI, 2008).

De forma profilática e com o objetivo de se evitar o aumento da PIO, os médicos assistentes utilizam-se, quando consideram necessário, da paracentese estéril da câmara anterior (procedimento reconhecido pela Sociedade Brasileira de Retina e Vítreo – SBRV). A literatura médica demonstra que tal paracentese é uma técnica segura que incontestavelmente impede o aumento da PIO e protege a perfusão retiniana, sua camada de fibras nervosas e a cabeça do nervo óptico (ENDERS et al., 2017; ICHIYAMA et al., 2014; MATHALONE; ARODI-GOLAN; SAR, 2012).A análise laboratorial do humor aquoso ocorreu, portanto, apenas nestas amostras que, se não fossem armazenadas, seriam desprezadas. As paracenteses foram realizadas antes da aplicação de anti-VEGF nos pacientes com DMRI que tiveram o tratamento indicado por seus médicos assistentes.

Os pacientes do grupo de controle, antes da facectomia e após a incisão corneana de rotina para tal procedimento, tiveram o humor aquoso coletado em

recipiente estéril em equivalência à paracentese em pacientes com DMRI. Da mesma forma, também não se agregou riscos adicionais.

4.4. Preparação de Amostras

As amostras foram diluídas em solução de TEAB 0.02M e submetidas à sonicação em TipSonicador Q125 (QSonica) com intensidade a 40% do potencial em 3 ciclos de 10 seg cada. Os concentrados proteicos foram quantificados utilizando o método de Qubit™.

4.5. Quantificação de proteínas e peptídeos

A quantificação da concentração de proteínas das amostras foi realizada a partir da detecção de fluorescência pela técnica de Qubit™ (Invitrogen). Primeiramente, preparou-se o reagente fluorescente a partir da junção entre soluções de fluoróforo e tampão na proporção de 1:200. Em seguida, alíquotas de 3ul de amostra diluídas em água Milli-Q® (1:3) foram adicionadas ao reagente para atingir volume final de 200ul. As misturas foram incubadas por 15 min cada, de forma sequencial, e então analisadas no equipamento portátil Qubit™.

Após a leitura de cada amostra, a concentração final foi obtida multiplicando o valor da leitura pelo fator de diluição escolhido. O protocolo do fabricante é apresentado na figura 12.

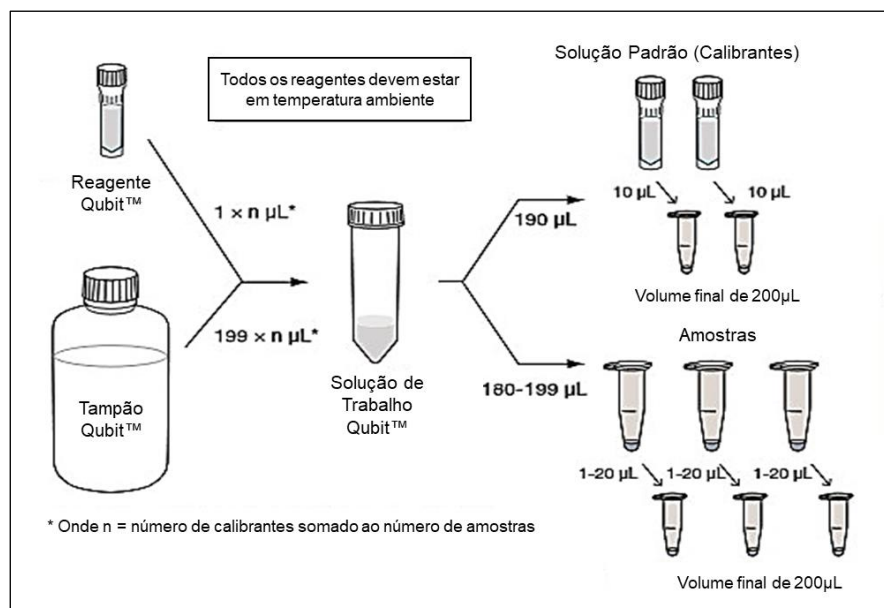


Figura 12: Quantificação por Qubit™. Instruções do fabricante acerca do procedimento para calibração e quantificação. Fonte: adaptado do fabricante (Invitrogen)

4.6. Digestão Triptica de Proteínas em Solução (Clássica)

Foram aliqüotadas $10 \mu\text{g}$ de proteína em tubos Eppendorf de baixa adsorção para proteínas e peptídeos (LoBind) para o processo de digestão. Liofilizados em concentrador rotatório *SpeedVac™* SC100 (Savant™), os extratos proteicos foram inicialmente ressuspensos em solução de TEAB 20mM, ureia 8M e DTT 50mM (pH 7,9) e incubados por 25 min a 55°C e 400rpm. Sob abrigo de luz e após resfriamento, foi adicionada solução de IAA suficiente para atingir concentração final de 14mM e incubou-se novamente por 40 min a 21°C e 400rpm. Posteriormente foi adicionada solução de DTT na concentração final de 5mM para parada da reação de alquilação.

As amostras foram então diluídas na razão 1:50 (enzima: proteínas totais) com solução de TEAB 20mM (pH 7,9), devido a intolerância da enzima tripsina a altas concentrações de ureia, já considerando a adição de solução de CaCl_2 suficiente para atingir concentração final de 1mM e a adição de tripsina (Promega)

na razão 1:50. Em seguida, as amostras foram incubadas por 13 horas a 37°C e 300rpm, e após o período de digestão, foi adicionado TFA na concentração final de 1% para evitar clivagens inespecíficas e parar a reação. Os digestos proteicos foram dessalinizados imediatamente.

4.7. Dessalinização de Peptídeos

Os peptídios trípticos foram dessalinizados em microcolunas *home-made* de fase reversa. Construídas a partir de discos Empore™ SPE (Sigma-Aldrich, USA), com partículas C18 de característica hidrofóbica, as microcolunas permitem a purificação e enriquecimento dos peptídeos a partir da retirada de sal e subsequente eluição dos mesmos.

Para o preparo das microcolunas, construídas em ponteiras P200, foram realizadas seqüências de centrifugação a 1000g por 3 min com 100µL de MeOH 100%, seguido de 100µL de solução de acetonitrila 80%(v/v) e ácido acético 0,5%(v/v), e por fim 100µL de solução de ácido acético 0,5%(v/v).

Finalmente, os digestos proteicos foram adicionados às colunas, centrifugados a 900g durante 4 min e dessalinizados duas vezes com 100µL de solução de ácido acético 0,5% (v/v) a 1000g por 3 min.

A eluição dos peptídeos foi realizada com concentrações crescentes de acetonitrila (25%, 50%, 80% e 100%), mantendo a concentração de ácido acético a 0,5% nas soluções, e centrifugações lentas de 600g durante 3 min. As frações, de 20µL (v/v) cada foram coletadas em tubos Eppendorf LoBind.

Os peptídeos eluídos foram liofilizados em concentrador rotatório *SpeedVac*™ SC100 (Savant™) e armazenados a -80°C até a quantificação, também realizada segundo a plataforma Qubit™.

4.8. Análise *label-free* por uPLC-MS/MS

As amostras foram analisadas por um sistema cromatográfico RLSC nano-UPLC Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific) acoplado a um espectrômetro de massas LTQ-Orbitrap Elite (Thermo Fisher Scientific).

Da fração de proteínas extraídas e processadas, foi injetado 1µg de peptídeos em pré-coluna *home-made* (100µm de diâmetro interno x 3cm de comprimento) com partículas esféricas de sílica revestidas por C18 ReprosilPur de 5µm e poros de 120Å (Dr. Maich GmbH) para remoção de resíduos de sais. Posteriormente, esses peptídeos foram fracionados em coluna analítica *home-made* (75µm de diâmetro interno x 24cm de comprimento) com partículas C18 ReprosilPur de 3µm e poros de 120Å (Dr. Maich GmbH). O gradiente linear de eluição entre os solventes A (ácido fórmico 0,1% em água) e B (ácido fórmico 0,1% em acetonitrila) foi composto de 2% a 35% de B durante 155 min.

Os espectros de massas foram adquiridos em modo positivo com aquisição de espectros de MS/MS dependente de dados (*Data Dependent Acquisition* – DDA). Em MS1 foram obtidos espectros em alta resolução (120000 FWHM) entre 300 – 1650 *m/z* no analisador Orbitrap. Cada varredura foi seguida por MS2 dos 20 íons mais intensos, acima do sinal mínimo requerido de 3000, no analisador *ion trap* pelo método de dissociação induzida por colisão (CID). A reanálise de íons já fragmentados foi inibida por exclusão dinâmica, favorecendo a identificação de peptídeos menos abundantes.

4.9. Análise de Dados

4.9.1. Progenesis QI

Os espectros foram processados pelo *software* Progenesis QI (<http://www.nonlinear.com/progenesis/qi>) (Nonlinear Dynamics©), onde primeiramente foram submetidos ao alinhamento do tempo de retenção cromatográfico e em seguida quantificados de acordo com a área de intensidade integrada dos picos recuperados do *extracted ion chromatogram* (XIC).

A aplicação do filtro Anova ($p \leq 0.05$) garantiu a triagem de eventos estatisticamente significativos, no intervalo de confiança de 95%. Estes tiveram seus espectros de MS2 aceitos para exportação e identificação na plataforma Peaks® Studio 7.0 (<http://www.bioinfor.com/peaks-studio>) (Bioinformatics Solutions, Inc.) obedecendo os seguintes parâmetros: proteínas com mínimo de 2 peptídeos, taxonomia *Homo sapiens*, banco de dados UniProtKB - SWISS-PROT/TrEMBL

(abril/2019), acurácia MS1 de 10ppm; acurácia MS2 de 0,5Da; até 2 locais de clivagem perdidos; carbamidometilação de cisteínas como modificação fixa; oxidação de metionina como modificação variável.

O número de proteínas, grupos de proteínas e número de peptídeos foram filtrados com FDR inferior a 1%, utilizando-se ao menos 2 peptídeos para a identificação. Além disso foram ativados os módulos de busca por modificações do banco Unimod com base em padrões de fragmentação, bem como busca de mutações pontuais.

A lista de identificações foi exportada novamente para o *software* Progenesis QI, onde aplicou-se também às identificações de proteína o filtro Anova ($p \leq 0.05$). As análises multivariadas não supervisionada tipo PCA (*Pattern Cluster Analysis*) e as de hierarquização HCA (*Hierarchical Cluster Analysis*) tipo dendograma finalizaram o refinamento de dados baseado no desenho experimental.

4.9.2 MetaboAnalyst

A fim de avaliar a representatividade das proteínas reveladas pela análise no *software* Progenesis QI em cada cenário de estudo, construiu-se um arquivo com os dados de abundância bruta correspondentes em cada amostra para processamento no *software* MetaboAnalyst 3.0® (<http://www.metaboanalyst.ca>) (XIA; WISHART, 2016). Devido ao grande número de variáveis, ocorreu transformação dos dados proteômicos em logaritmos, sendo organizados em forma de *PeakListe* inseridos no referido *software* onde primeiramente foi realizado o tratamento de dados por meio do alinhamento automático dos valores *m/z*, normalização por soma e centralização em média dividida pela raiz quadrada do desvio padrão de cada variável (escala de Pareto). Picos que apareceram em menos que 50% das amostras de cada grupo foram ignorados.

Foram realizadas análises univariadas, multivariadas, de agrupamento e de classificação. Inicialmente, o Teste t-student e Anova não paramétricos foram empregados para avaliar a significância estatística ($p < 0.05$) dos íons peptídicos adquiridos. Em sequência, a análise multivariada não supervisionada PCA permitiu observar a tendência de agrupamento das amostras.

Análises não supervisionadas de agrupamento hierárquico e não hierárquico foram realizados para revelar semelhanças entre os grupos. O dendograma baseou-se na distância euclidiana calculada pelo algoritmo Ward para minimizar perdas geradas pelo agrupamento. Já o *heatmap* utilizou correlação de Pearson calculada pelo algoritmo Ward a partir de dados gerados pelo *VIP score* (PLS-DA *imp. features*).

4.10. Anotações Funcionais

O *software* Strap (<http://www.bumc.bu.edu/cardiovascularproteomics/cpctools>), a partir de códigos do banco experimental UniProtKB, classificou e agrupou as proteínas identificadas considerando função molecular, componente celular e processo biológico – chamado de categorização por *Gene Ontology*(GO) – presentes nos bancos de dados GO, EBI *QuickGO* e UniProtKB (BHATIA et al., 2009).

O *software* Blast2go (<https://www.blast2go.com>) realizou anotações funcionais não só baseado no banco de dados GO como também NCBI (para proteínas não redundantes e dados relacionados ao gene), a partir da sequência de aminoácidos de cada proteína (GOTZ et al., 2008).

A representação de vias e as interações entre as proteínas reguladas foram avaliadas com o uso das plataforma String, permitindo a representação gráfica de tais interações. O recurso está disponível *online* e de forma gratuita no site <http://string-db.org> e a ferramenta serve ainda para destacar os enriquecimentos funcionais nas listas de proteínas fornecidas, usando o sistema de classificação funcional GO e o banco de dados KEEG (Enciclopédia de Genes e Genoma de Kioto).

Complementarmente, foram avaliadas as 30 proteínas com melhor grau de contribuição para a discriminação entre os cenários clínicos eleitas a partir do *VIP score* gerado pela análise PLS-DA *imp. Features* no *software* MetaboAnalyst, uma classificação multivariada supervisionada, não-paramétrica.

5. RESULTADOS

Os resultados foram encontrados por análises estatísticas obtidas pelos *softwares* Progenesis, MetaboAnalyst, String, Termo GO (*Gene Ontology*) e banco de dados KEGG (Enciclopédia de Genes e Genoma de Kioto) para distinção das três condições clínicas pesquisadas: (i) pacientes com Degeneração Macular Relacionada à Idade do tipo neovascular virgens de tratamento (DMRIn *naive*), (ii) pacientes com DMRIn resistentes ao tratamento padrão ouro com anticorpos contra o Fator de Crescimento Vascular e Endotelial (VEGF) e (iii) pacientes com catarata, qualificados como controles negativos de retinopatia. Os espectros obtidos permitiram caracterizar o conjunto total de proteínas detectáveis nas amostras, bem como avaliar quantitativamente aquelas que apresentaram abundância relativa significativamente diferente entre os grupos analisados (Tabela 1). A análise das proteínas identificadas forneceu ainda informações sobre os componentes que melhor distinguiram as condições clínicas da pesquisa, sendo agrupadas quanto às vias de sinalização biológica, termos GO e interações que mantiveram entre si.

Tabela 1: Estatística dos Resultados	
Correspondências de espectro peptídico	85880
Sequências de peptídeos	10736
Grupos de proteínas	1536
Proteínas	2336
Proteínas (#Peptídeos únicos)	415(>2); 145(=2); 584(=1)
FDR (Correspondências de espectro-peptídico)	1.0%

Fonte: do autor (2019).

Nas amostras de humor aquoso analisadas, foi identificado um total de 2336 proteínas e 1536 grupos proteicos. Destes, 891 grupos de maneira confiável (FDR < 1%) e 85 proteínas estavam reguladas entre as condições analisadas, permitindo o agrupamento dos pacientes (PCA) e a distinção entre os três grupos da pesquisa, conforme ilustra a figura a seguir:

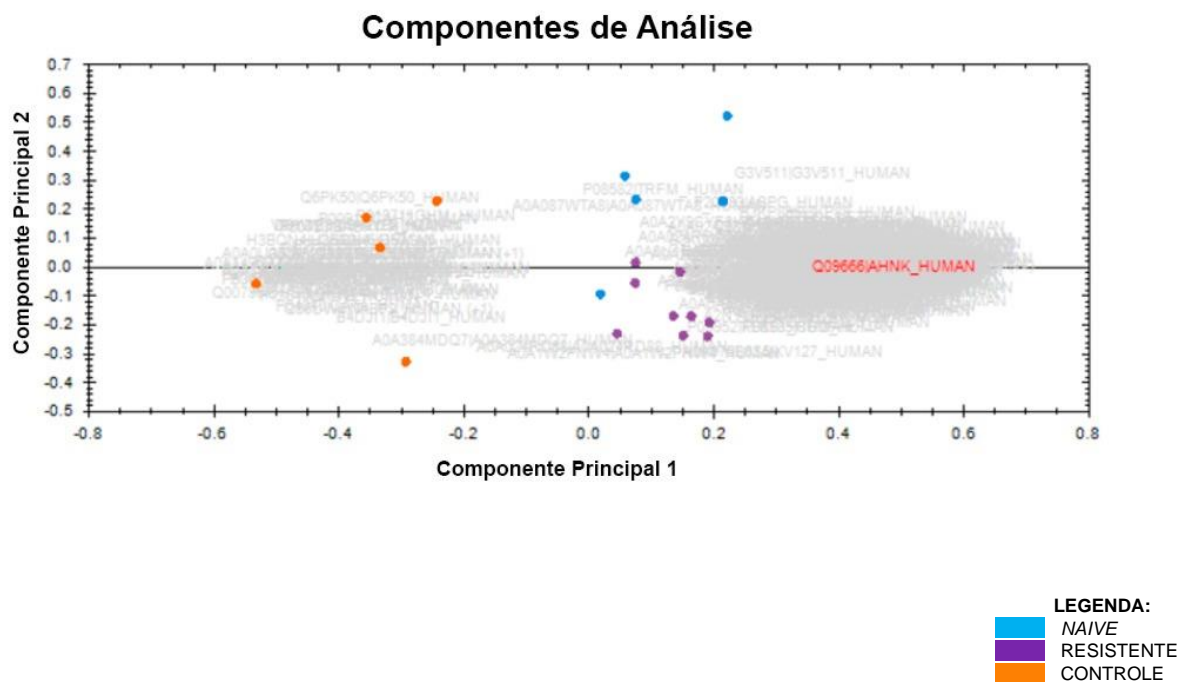


Figura 13: Análise PCA pelo software Progenesis Q1 ($p < 0.05$) apresentando os scores *plot* das proteínas reguladas no humor aquoso de pacientes do grupo DMRIn *naive*, do grupo DMRIn resistentes ao anti-VEGF e Grupo Controle. As amostras de pacientes com DMRIn *naive* são representadas em azul, as de pacientes com DMRIn resistentes ao anti-VEGF em roxo e as de pacientes controle em laranja. As proteínas são dispostas em cinza de acordo com o estado de regulação positivo e o cenário respectivo. Ocorre sobreposição espacial de replicatas na figura. Fonte: adaptado do software Progenesis Q1 (do autor, 2019).

Uma análise de potência estatística *a posteriori* mostrou que 5 (cinco) pacientes por cenário clínico foram suficientes para demonstrar robustez estatística, atingindo 86,4% das amostras com potência $> 0,8$. Tais proteínas reguladas foram agrupadas em dendogramas, isto é, gráficos hierárquicos (*clusters*) de acordo com seus perfis de abundância em cada grupo analisado, como demonstrado nas Figuras 14 e 15, respectivamente.

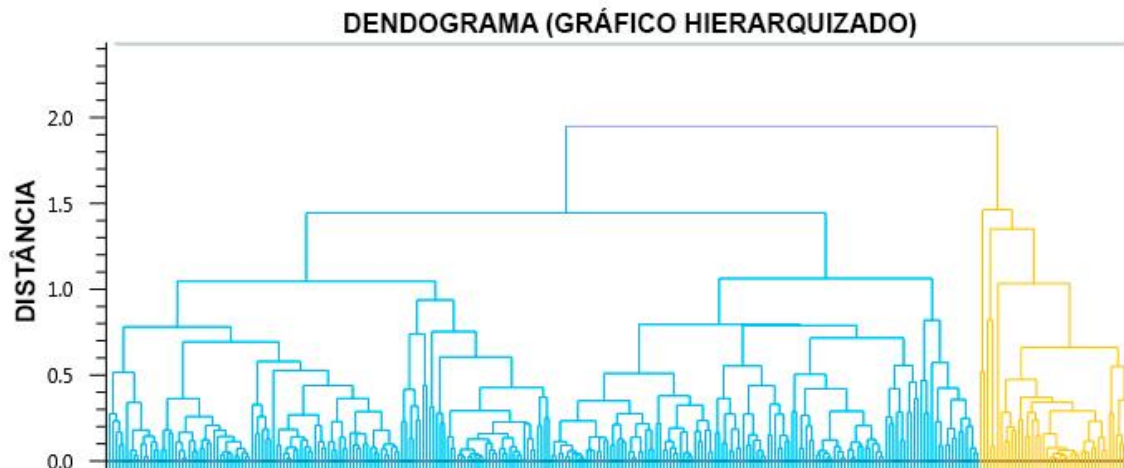


Figura 14: Gráfico hierarquizado (análise HCA) mostrando o agrupamento de proteínas de acordo com seus perfis de abundância pelo software Progenesis Q1 ($p < 0,05$). (do autor, 2019).

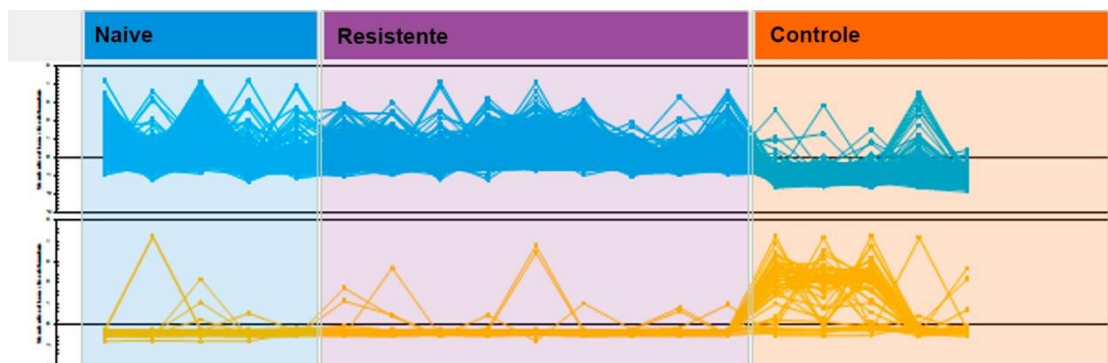


Figura 15: Perfis de abundância relativa de proteínas agrupadas. As amostras de pacientes com DMRIn *naive* são representadas em azul, as de pacientes com DMRIn resistentes ao anti-VEGF em roxo e as de pacientes controle em laranja. Cada linha da figura representa uma proteína e cada ponto no pico ou no vale, a abundância da mesma por paciente. As proteínas representadas estão com predomínio de regulação positiva nos casos de DMRIn *naive* e DMRI resistente e com predomínio de regulação negativa nos controles em (A). O oposto corre em (B). Fonte: adaptado do software Progenesis Q1 (do autor, 2019).

Como critério adicional de restringência, foram consideradas apenas as proteínas identificadas com dois ou mais peptídios para uma identificação protéica mais confiável.

Dessa forma, mediante análise estatística utilizando-se a plataforma MetaboAnalyst e realização de testes confirmatórios *post-hoc* para definição das

condições em que cada proteína encontra-se significativamente regulada, foi possível determinar por análise multivariada o *Variable Importance Projection scores* (*VIP-scores*), as trinta proteínas que melhor discriminam os grupos analisados (Figura 16).

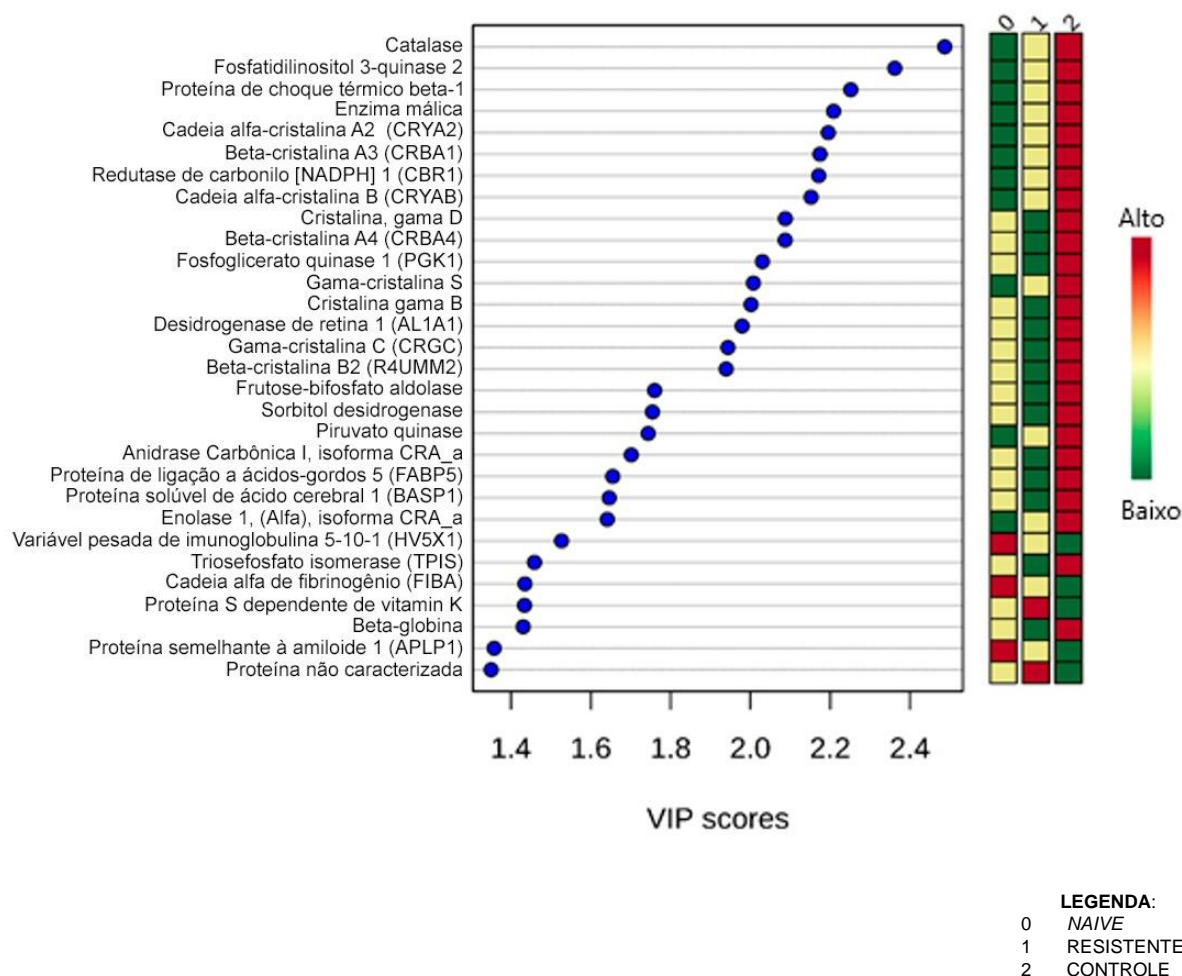


Figura 16: VIP scores das proteínas que melhor discriminam as condições clínicas analisadas (PLS-DA *imp. features*, $p < 0.05$). As caixas coloridas à direita indicam a intensidade relativa de cada proteína nos respectivos grupos. Fonte: adaptado do *software* MetaboAnalyst (do autor, 2019)

As trinta e nove proteínas abaixo (Tabela 2) permitem a discriminação dos grupos analisados e possuem correlacionadas com função visual ou com vias metabólicas direta ou indiretamente ligadas à neoangiogênese coroidal, condição essencial na patogênese da DMRI neovascular.

Tabela 2: Proteínas discriminantes selecionadas por função metabólica (anotações GO)

	PROTEÍNA	FUNÇÃO BIOLÓGICA	ANOVA (P)	MAX FOLD CHANGE	REGULAÇÃO POSITIVA	REGULAÇÃO NEGATIVA
1	Amilóide símile proteína 1 (APLP1) (F5GZ08)	- estresse oxidativo - ligação de íon de metal de transição	0.02	2.98	Naive	Controle
2	Cadeia Pesada de Imunoglobulina MU (P01871)	- resposta imune adaptativa - via de sinalização do receptor de células B - ativação da via clássica do complemento - resposta imune inata - migração de leucócitos - regulação positiva da ativação das células B	0.016	71.91	Naive	Resistente
3	Complemento C8 cadeia alfa (P07357)	- ativação do complemento	0.019	6.16	Naive	Controle
4	Ectonucleotídeo pirofosfatase / família fosfodiesterase – membro 2 (ENPP2) (E7EUF1)	- regulação da angiogênese	0.0032	6.00	Naive	Controle
5	Fator de crescimento insulina-símile proteína 7 (IGFBP-7) (Q16270)	- adesão celular - regulação do crescimento celular (receptor tirosina quinase)	0.00063	7.66	Naive	Controle
6	Fator de crescimento insulina-símile proteína 7, isoforma CRA_a (A0A024R433)	- regulação negativa da via de sinalização do receptor do fator de crescimento semelhante à insulina	0.013	7.00	Naive	Controle
7	Fator Derivado de Epitélio Pigmentar (PEDF) (P36955)	- regulação negativa da angiogênese - regulação negativa da resposta inflamatória	0.03	3.09	Naive	Controle
8	Fator do Complemento H relacionado a proteína 1 (Q03591)	- ativação do complemento - regulação da ativação do complemento	0.0048	5.86	Naive	Controle
9	Interfotorreceptor de matriz proteoglicano 1 (IMPG1) (Q17R60)	- percepção visual	0.00022	9.32	Naive	Controle
10	Lipocalina 1 (Tear prealbumin), isoforma CRA_a (LCN1) (A0A024R8D7)	- modulação do estresse oxidativo	0.024	1.98	Naive	Resistente
11	Proteína 4 Ligante de Retinol (RBP4) (P02753)	- desenvolvimento ocular - resposta ao ácido retinóico - processo metabólico do ácido retinóico - processo metabólico de retinol - transporte de retinol	0.013	1.56	Naive	Controle

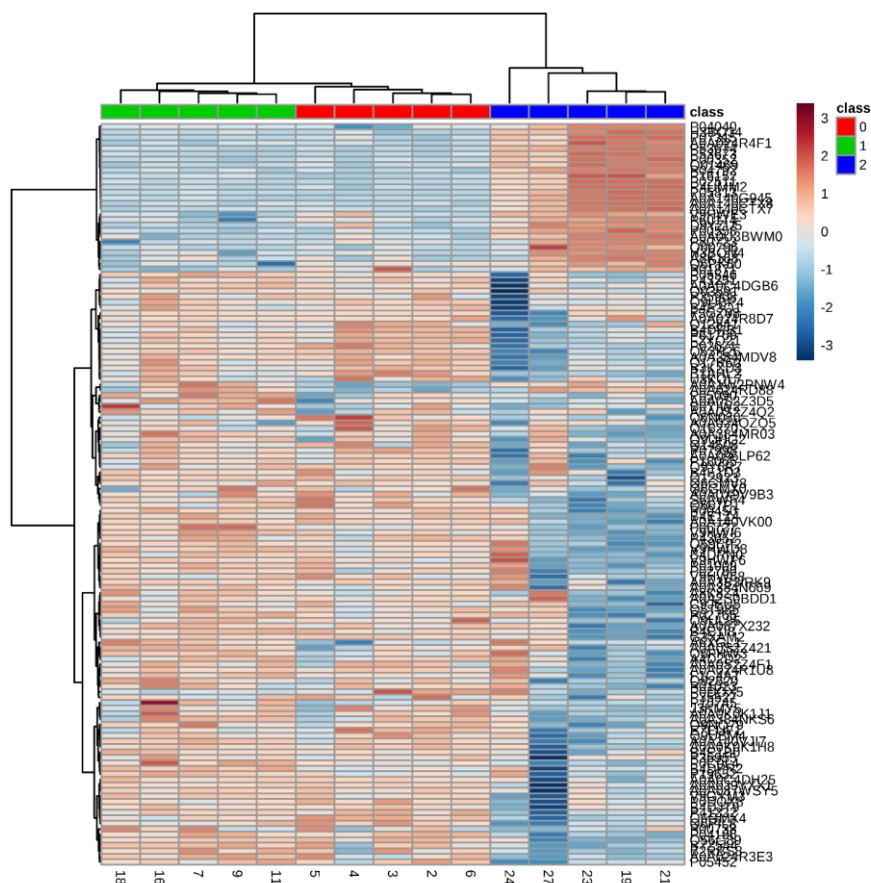
		- percepção visual				
12	Antígeno CD14 de diferenciação monocítica (F1C4A7)	- resposta inflamatória	0.00039	4.64	Resistente	Controle
13	Apolipoproteína A-I, isoforma CRA_a (A0A024R3E3)	- armazenamento de lipídios - processo biossintético de lipoproteínas - regulação negativa da atividade da lipase	0.00048	8.54	Resistente	Controle
14	Apolipoproteína A-IV (P06727)	- homeostase lipídica - transporte lipídico - remoção de radicais superóxido	0.00019	7.90	Resistente	Controle
15	Calicreína Plasmática (P03952)	- desmonte da matriz extracelular - fibrinólise - ativação do plasminogênio	0.034	3.70	Resistente	Naive
16	Clusterina (A0A384NKS6)	- resposta inflamatória - regulação do sistema do Complemento	0.00097	4.47	Resistente	Controle
17	Complemento C2 (B4DQ11)	- ativação do complemento	0.031	2.89	Resistente	Controle
18	Complemento C3 (P01024)	- ativação do complemento	0.00025	3.71	Resistente	Controle
19	Complemento C4-A (P0C0L4)	- ativação do complemento - resposta inflamatória - resposta imune inata - regulação positiva da depuração (clearance) de células apoptóticas	0.00029	5.81	Resistente	Controle
20	Complemento C7 (P10643)	- ativação do complemento	0.00043	5.12	Resistente	Controle
21	Fosfoinosítídeo Fosfolipase C (Q86YU9)	- processo catabólico lipídico	0.01	15.44	Resistente	Controle
22	Glutaciona peroxidase (GPx) (A0A087X1J7)	- resposta ao estresse oxidativo	0.032	2.29	Resistente	Controle
23	Inibidor Tecidual de Metaloproteinase 1 (TIMP1) (Q58P21)	- inibidor da atividade de metaloenzimas - regulação da angiogênese	0.0027	3.99	Resistente	Controle
24	Proteína 3 ligadora de Retinol (P10745)	- processo metabólico lipídico - processo metabólico do retinol - percepção visual	0.0023	4.87	Resistente	Controle]
25	Receptor 1 do Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGFR-1) (A0A1W2PNW4)	- via de sinalização do receptor do fator de crescimento vascular endotelial	0.0049	22.05	Resistente	Naive
26	Receptor de tirosina cinase, isoforma CRA_a (A0A024RD88)	- via de sinalização do receptor do fator de crescimento vascular endotelial	0.037	21.65	Resistente	Naive
27	Superóxido dismutase extracelular [Cu-Zn] (SOD) (P08294)	- resposta celular ao estresse oxidativo - resposta à hipoxia	0.0011	2.68	Resistente	Controle
28	Vitronectina	- regulação do	1.19x10 ⁰	5.24	Resistente	Controle

complemento
 - regulação positiva do VEGF
 - constituinte da matriz extracelular
 - adesão celular

5

29	Catalase (P04040)	- envelhecimento - resposta celular ao estímulo do fator de crescimento - resposta celular ao estresse oxidativo - regulação negativa do processo apoptótico - proteção UV	0.00046	434.28	Controle	Naive
30	Fator do Complemento B (CFB) (A0A1U9X7H5)	- ativação do complemento	0.041	29.42	Controle	Resistente
31	Cristalina Alfa Cadeia B (P02511)	- percepção visual - ligante beta amilóide - resposta à hipóxia	1.7X10 ⁻⁵	400.79	Controle	Naive
32	Cristalina Beta A4 (P53673)	- percepção visual	1.2x10 ⁻⁵	240.93	Controle	Naive
33	Cristalina Beta B1 (P53674)	- percepção visual - desenvolvimento lenticular	2.59	633.81	Controle	Naive
34	Cristalina Beta 3, Isoforma CRA_a (A0A024R1B)	- percepção visual	0.013	379.97	Controle	Naive
35	Cristalina Gama C (P0315)	- percepção visual	0.00032	199.03	Controle	Resistente
36	Enolase 1 (A0A024R4F1)	- via glicolítica - estimulação auto-imune	0.0032	25.44	Controle	Resistente
37	Cristalina Beta 2 (R4UMM2)	- percepção visual	0.00014	141.67	Controle	Naive
38	Metalotioneína – 1G (P13640)	- resposta celular ao estímulo do fator de crescimento vascular e endotelial - regulação negativa do crescimento	0.0011	Infinito	Controle	Naive
39	Ubiquitina hidrolase carboxi-terminal (V9HW74)	- resposta à isquemia - processo catabólico de proteína dependente de ubiquitina	0.017	2830.46	Controle	Naive

A correlação entre condições por perfis de abundância para o conjunto completo de proteínas foi realizado pelo programa Progenesis. Destacou-se o conjunto de 135 proteínas com menor p-valor (Anova) e as 30 proteínas apontadas pela análise *VIP score* (Figura 17).

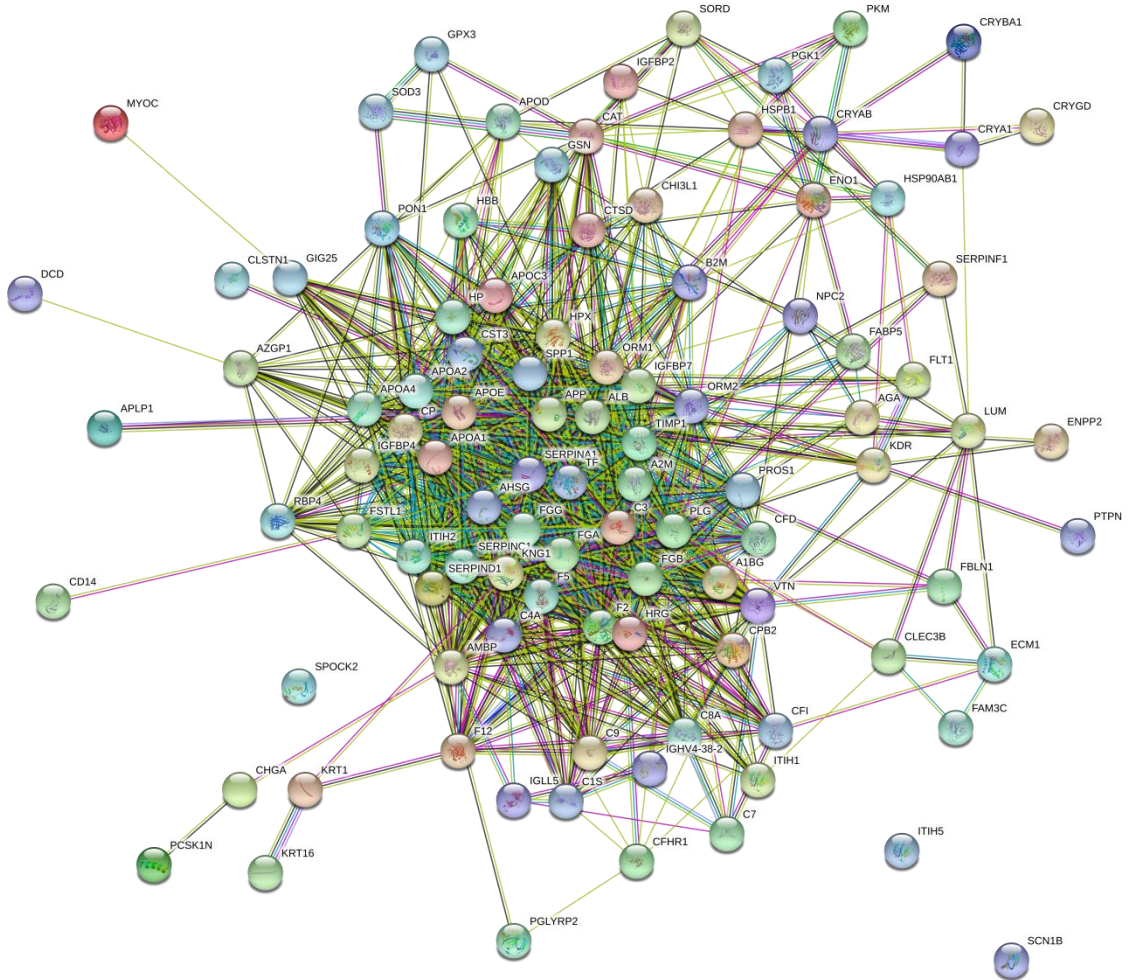


LEGENDA:
 0 NAIVE
 1 RESISTENTE
 2 CONTROLE

Figura 17: Análise HCA por agrupamento em *heatmap* das proteínas discriminantes indicadas pela análise PLS-DA (*imp. features*, $p < 0.05$). A intensidade relativa de cada proteína é apresentada para cada amostra analisada segundo a coloração indicada na escala lateral. As amostras, por sua vez, são agrupadas de acordo com o respectivo cenário. Fonte: adaptado do *software* MetaboAnalyst (do autor, 2019).

Redes biológicas são informações complexas, conhecidas matematicamente como grafos, que podem ser definidas como um conjunto de elementos (denominados nós) que estão conectados entre si por uma série de ligações (arestas). Os elementos protéicos encontrados nesta pesquisa foram agrupadas em vias moleculares pelas plataformas String e BlastKoala ($FDR < 0.02$) e representados nas referidas redes onde os nós simulam proteínas e as arestas, as relações metabólicas que elas mantêm entre si (Figura 18).

(A)



(C)

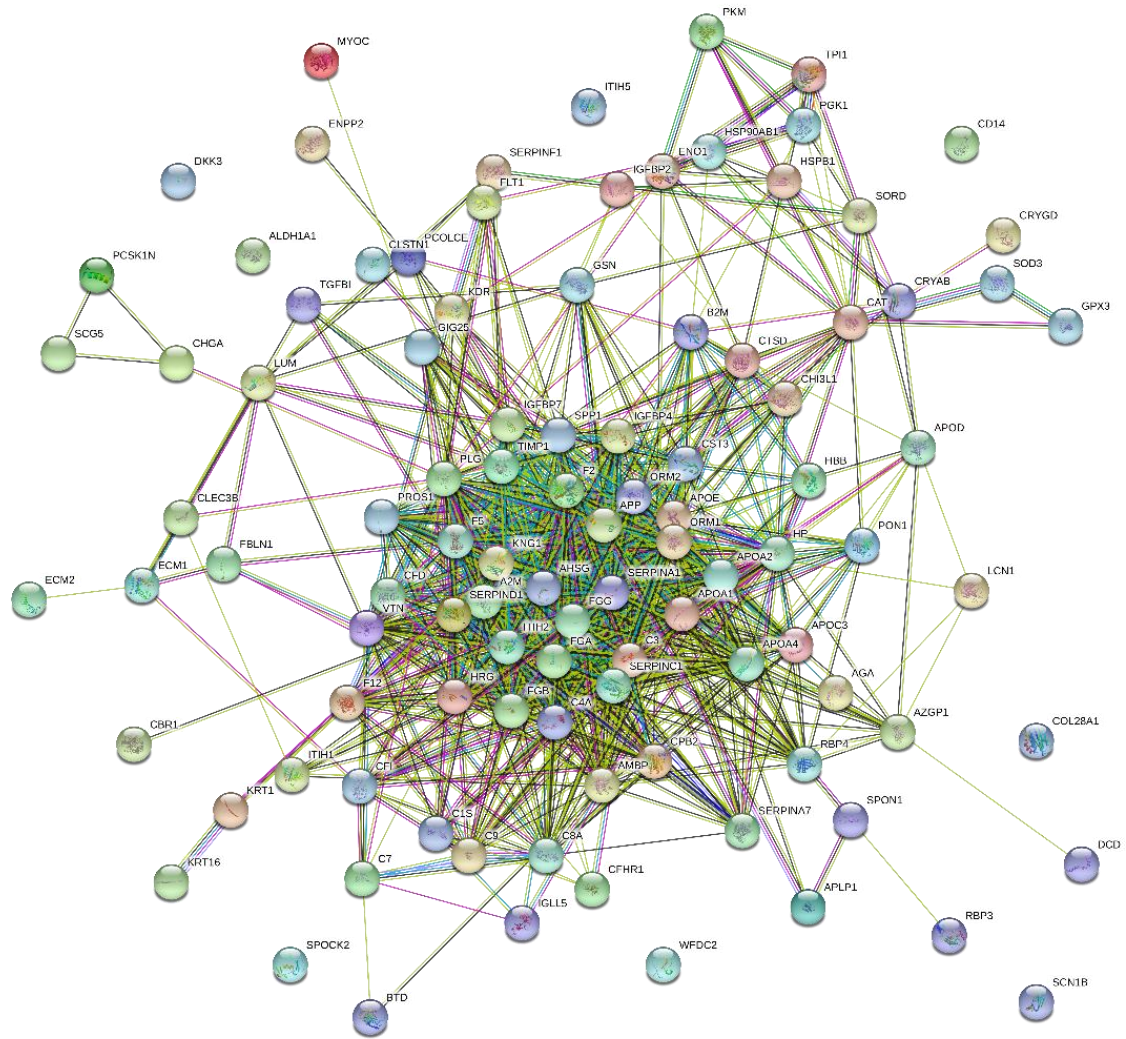


Figura 18: Rede e Análise de Enriquecimento. Vias metabólicas do termo GO detectadas como reguladas pelas plataformas String. (A) Vias de desregulação da homeostase. (B) Vias de desregulação lipídica. (C) Vias de desregulação do HIF-1 (isquemia). As ligações entre as proteínas representam interações, conforme o padrão do programa String.

6. DISCUSSÃO

A degeneração macular relacionada à idade (DMRI) é tradicionalmente classificada em duas formas: seca e neovascular. Trabalhos de metanálise projetam para o ano de 2020 um total de 196 milhões de pessoas com algum estágio de DMRI, aumentando para 288 milhões em 2040 (Figura 19) (WONG et al., 2014). Trata-se de uma doença crônico-degenerativa da retina, sendo líder entre as causas de perda de visão central. É responsável por aproximadamente 50% de todos os casos de cegueira central entre os idosos nos países ocidentais e, após os 55 anos de idade, as taxas de incidência quadruplicam a cada década de vida (ZHOU et al., 2018). No Brasil, entretanto, ainda é pouco divulgada e não se tem dados epidemiológicos atualizados e que contemplem todo território nacional.

A baixa acuidade visual final da DMRI se deve às lesões dos fotorreceptores maculares e epitélio pigmentar da retina (EPR), cujos resíduos se acumulam em forma de drusas predominantemente entre o EPR e a membrana de Bruch. Especificamente, as drusas são depósitos extracelulares compostas predominantemente por proteínas, lipídios, minerais e detritos celulares (GAO et al., 2015; WANG et al., 2010), cuja concentração na região central da retina (mácula) corresponde ao sinal clínico clássico encontrado ao exame do fundo de olho em DMRI. Apesar do fato de que, em estágios iniciais, geralmente não estarem associadas à perda apreciável de visão, o número e o tamanho das drusas servem como sinais de progressão da doença. Ou seja, as drusas duras, pequenas e em número reduzido podem estar associadas ao processo fisiológico de envelhecimento, enquanto o aumento em número e tamanho destes depósitos extracelulares implicam na progressão da DMRI (GAO et al., 2015; KASSOFF et al., 2001), conforme visualizado no Quadro 4.

Categorias de Elegibilidade para o DMRI (Classificação)

Categoria do DMRI	Primeiro Olho*			Segundo Olho
	Tamanho da Drusa+	Área da Drusa+	Pigmentos anormais++	
1 (ausência de DMRI)	Nenhum ou pequeno (<63 µm)	<125 µm de diâmetro circular(≅ 5-15 drusas pequenas)	Nenhum	Igual ao primeiro olho
2 (DMRI inicial)	Pequeno (<63 µm) ou intermediário (≥63, <125 µm) ou não requerido se anormalidades pigmentares presentes	≥ 125 µm de diâmetro circular (sobre 1/150 de área de disco) Ao menos 1 drusa	Ausente ou presente, mas AG ausente	Igual ao primeiro olho ou categoria 1
3ª (DMRI intermediária)	Intermediário (≥63, <125µm) ou largo (≥125 µm) ou não requerido, se Atrofia Geográfica(AG)+ presente	≥360 µm de círculo de diâmetro (sobre 1/16 de área de disco) se drusas macias indistintas estão presentes (≅ 20 drusas intermediárias) ≥656 µm diâmetro circular(sobre 1/5 de área de disco), se drusas macias indistintas estão ausentes(≅ 65 drusas intermediárias) Ao menos 1 drusa	Ausente ou presente, mas AG central+ ausente	Igual ao primeiro olho ou categoria 1 ou 2
3b (DMRI intermediária)	Primeiro olho igual a categoria 3ª			Acuidade Visual (AV)<20/32 não devido a DMRI ou desqualificação unocular estar presente]] DMRI avançado]]#
4ª (DMRI avançada)	Primeiro olho igual a categoria 1, 2 ou 3a			
4b (DMRI avançada)	Primeiro olho igual a categoria 1, 2 ou 3a			AV<20/32 devido ao DMRI, mas o DMRI avançado# não está presente§

*Deve ter AV≥20/32, DMRI não avançado e nenhuma lesão desqualificante.

+ Drusa e AG (Atrofia Geográfica) são avaliados dentro de 2 discos de diâmetros (3000 µm) do centro da mácula.

++ Anormalidades pigmentares (aumento de pigmentação ou despigmentação) com 1 disco de diâmetro do centro da mácula.

§ Olho não elegível para evento de AV

]] Olho não elegível para evento de DMRI

A AG (Atrofia Geográfica) envolve o centro da mácula ou sinais de neovascularização coroidal (presença abaixo do epitélio pigmentar da retina ou da retina sensorial do fluido, sangue, fibrovascular ou tecido fibroso)

Quadro 4: Categorias de Elegibilidade para o DMRI (classificação). Fonte: adaptado de KASSOFF et al., 2001.

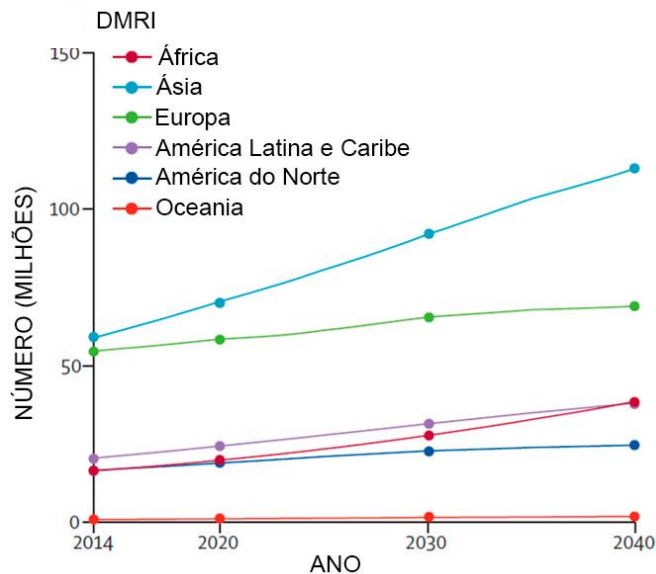


Figura 19: Prevalência de DMRI. Projeção do número de pessoas com DMRI (seca e neovascular) por região em 2014, 2020, 2030 e 2040. Fonte: adaptado de WONG et. al., 2014.

O tratamento padrão-ouro atualmente utilizado para a DMRI neovascular é com anticorpos contra o fator de crescimento vascular e endotelial (anti-VEGF) (CHAKRAVARTHY et al., 2012; GAO et al., 2018; GROUP et al., 2011; HEIER et al., 2012). Tem-se descrito na literatura vários tipos fatores de crescimento vascular e endotelial (VEGFs) que vai do VEGF-A até o VEGF-E, passando pelo fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento placentário (PLGF). É o VEGF-A, porém, o protótipo associado à DMRI neovascular (ÁVILA; GARCIA; ISAAC, 2015; HOLMES; ZACHARY, 2005).

O bevacizumabe (Avastin®; Genentech, US) consiste em um anticorpo monoclonal que se liga a todas as isoformas de VEGF. Trata-se, porém, de uma droga inicialmente desenvolvida para o tratamento de neoplasias, com destaque para metástases colorretais (ÁVILA; GARCIA; ISAAC, 2015; FERRARA; HILLAN; NOVOTNY, 2005). Inclusive por questões de custos, está sendo utilizada nos casos de DMRI neovascular, mesmo sem constar na bula (medicamento *off-label*) (SCHMID et al., 2014).

O ranibizumabe (Lucentis®; Genentech, US) é um anticorpo monoclonal de fragmento Fab, recombinante e modificado que neutraliza todas as isoformas do VEGF-A (ROSENFELD et al., 2006). Sua eficácia e segurança foram estabelecidas

por inúmeros ensaios clínicos, sendo os estudos pivotais ANCHOR, MARINA e PIER (ABRAHAM; YUE; WILSON, 2010; BROWN et al., 2006; REGILLO, 2008).

O aflibercepte (Eylia®; VEGF Trap; Bayer AG, Leverkusen, Germany; Regeneron, Tarrytown, NY, US) é uma proteína receptora recombinante de VEGF solúvel que possui uma alta afinidade, aparentemente maior que os outros dois medicamentos anteriormente citados, pelo VEGF-A e ainda pelo fator de crescimento placentário (PLGF) (ÁVILA; GARCIA; ISAAC, 2015; HOLASH et al., 2002; PONGSACHAREONNONT et al., 2018). Os estudos clássicos VIEW 1 e VIEW 2 mostraram não-inferioridade e equivalência clínica entre o aflibercepte com o ranibizumabe no tratamento de DMRI neovascular (HEIER et al., 2012).

O tratamento clássico da DMRI adota protocolos de anti-VEGF ditos fixos ou variáveis. Os primeiros são algoritmos utilizados em estudos iniciais e mais rígidos na aplicação de algum dos anti-VEGF anteriormente descritos. Os últimos seguem um acompanhamento mais flexível onde ou se avalia a necessidade de tratamento nas consultas mensais (“Pro Re Nata”, “PRN”) ou se programa uma estratégia mais espaçada das injeções de anti-VEGF após o controle da doença (“Treat and Extend”, “TAE”) (ÁVILA; GARCIA; ISAAC, 2015).

Existem trabalhos que demonstram a equivalência na eficácia entre estas estratégias, com a característica de considerar a terapia variável mais afeita ao mundo real na medida em que geralmente diminui o número de injeções e de visitas dos pacientes ao consultório médico, reduzindo os custos e lhes sendo mais conveniente (ARNOLD et al., 2015; STEWART, 2015).

Não existem trabalhos nacionais atualizados, mas para efeito comparativo, o valor total do tratamento por paciente ao longo da vida com as principais medicações liberadas pela ANVISA no Brasil (ranibizumabe e aflibercepte) varia entre 33 e 48 mil dólares (HERNANDEZ et al., 2018). Trata-se de uma terapia de alto custo que, no entanto, cerca de 25% dos pacientes mantêm atividade da doença apesar do tratamento preconizado (EHLKEN et al., 2014). E mais, como uma parcela considerável dos pacientes são diagnosticados já com fibrose subretiniana, além do tratamento precoce com maior eficácia, um diagnóstico também precoce seria fundamental para um prognóstico visual satisfatório destes pacientes.

Diante disto, vias patogênicas alternativas adicionais estão sendo continuamente estudadas para se encontrar uma terapia mais eficaz, em especial

para a parcela de pacientes com resistência ao tratamento atual. Sendo assim, as vias da neoangiogênese na DMRI neovascular já foram correlacionadas com vias do estresse oxidativo, ativação do sistema do complemento, ativação do sistema imune e metabolismo lipídico (AMBATI; ATKINSON; GELFAND, 2013; REZAR-DREINDL et al., 2016; VOLZ; PAULY, 2015).

O presente estudo utilizou-se de uma técnica de alto desempenho, a espectrometria de massas, o que permitiu, em diminuta quantidade de amostras líquidas e mesmo com apenas 0,5 ml de humor aquoso obtidos via paracentese de câmara anterior e menos que 1 µg de proteínas totais por amostra, a identificação de 2336 proteínas em pacientes com DMRI e em seus controles (catarata). Foram 185 as proteínas que estavam reguladas entre as condições analisadas que permitiram o agrupamento de replicatas e a distinção entre os três grupos da pesquisa e 34 proteínas respeitaram o crivo de terem suas funções biológicas descritas e potencialmente correlacionadas com fisiopatogênese da DMRI neovascular (Tabela3).

Tabela 3: Proteínas discriminantes selecionadas por função metabólica relacionadas à fisiopatogênese da DMRI			
PROTEÍNA	FUNÇÃO	REGULADA POSITIVAMENTE	REGULADA NEGATIVAMENTE
FUNÇÃO VISUAL			
Cristalina Alfa Cadeia B (P02511)	- percepção visual - ligante beta amilóide - resposta à hipóxia	Controle	<i>Naive</i>
Cristalina Beta A4 (P53673)	- percepção visual	Controle	<i>Naive</i>
Cristalina Beta B1 (P53674)	- percepção visual - desenvolvimento lenticular	Controle	<i>Naive</i>
Cristalina Beta 2	- percepção visual	Controle	Naive
Cristalina Beta 3, IsoformaCRA_a	- percepção visual	Controle	Naive
Cristalina Gama C (P0315)	- percepção visual	Controle	Resistente
Interfotoreceptor matriz de proteoglicano 1 (IMPG1)	- percepção visual	<i>Naive</i>	<i>Controle</i>
METABOLISMO LIPÍDICO			
Apolipoproteína A-I, isoformaCRA_a	- armazenamento de lipídios - processo biossintético de lipoproteínas - regulação negativa da atividade da lipase	Resistente	Controle

Apolipoproteína A-IV	- homeostase lipídica - transporte lipídico - remoção de radicais superóxido	Resistente	Controle
Fosfoinosítideo Fosfolipase C	- processo catabólico lipídico	Resistente	Controle
Proteína 3 ligante de Retinol (RBP-3)	- processo metabólico lipídico - percepção visual	Resistente	Controle

ESTRESSE

OXIDATIVO

Amilóide símile proteína 1 (APLP1)	- estresse oxidativo - ligação de íon de metal de transição	Naive	Controle
Catalase (CAT)	- resposta celular ao estresse oxidativo - regulação negativa do processo apoptótico	Controle	Naive
Enolase 1	- estimulação auto-imune	Controle	Resistente
Glutathiona peroxidase (GPx)	- resposta ao estresse oxidativo	Resistente	Controle
Lipocalina 1 (Tear prealbumin), isoforma CRA_a (LCN1)	- modulação do estresse oxidativo	Naive	Resistente
Superóxido dismutase extracelular [Cu-Zn] (SOD)	- resposta celular ao estresse oxidativo - resposta à hipóxia	Resistente	Controle

ATIVAÇÃO DO SISTEMA DO COMPLEMENTO

Cadeia Pesada de Imunoglobulina um	- resposta imune adaptativa - via de sinalização do receptor de células B - ativação da via clássica do complemento - resposta imune inata - migração de leucócitos - regulação positiva da ativação das células B	Naive	Resistente
CFB	- ativação do complemento	Controle	Resistente
Clusterina	- resposta inflamatória - regulação do sistema do Complemento	Resistente	Controle
Complemento C2	- ativação do complemento	Resistente	Controle
Complemento C3	- ativação do complemento	Resistente	Controle
Complemento C4-A	- ativação do complemento - regulação positiva da depuração (clearance) de células apoptóticas	Resistente	Controle
Complemento C7	- ativação do complemento	Resistente	Controle
Complemento C8 cadeia alfa	- ativação do complemento	Naive	Controle
Fator do Complemento H relacionado a proteína 1	- ativação do complemento - regulação da ativação do complemento	Naive	Controle

Vitronectina	- regulação do complemento - regulação positiva do VEGF - constituinte da matriz extracelular - adesão celular	Resistente	Controle
---------------------	---	------------	----------

INFLAMAÇÃO

Antígeno CD14 de diferenciação monocítica	- resposta inflamatória	Resistente	Controle
Cadeia Pesada de Imunoglobulina "MU"	- resposta imune adaptativa - via de sinalização do receptor de células B - ativação da via clássica do complemento - resposta imune inata - migração de leucócitos - regulação positiva da ativação das células B	<i>Naive</i>	Resistente
Calicreína Plasmática (KLKB1)	- regulação inflamatória - desmontagem da matriz extracelular - fibrinólise - ativação do plasminogênio	Resistente	<i>Naive</i>
Clusterina	- resposta inflamatória - regulação do sistema do Complemento	Resistente	Controle
Enolase 1	- estimulação auto-imune	Controle	Resistente
Fator Derivado de Epitélio Pigmentar (PEDF)	- regulação negativa da angiogênese - regulação negativa da resposta inflamatória	<i>Naive</i>	<i>Controle</i>

ANGIOGÊNESE

Ectonucleotídeo pirofosfatase / família fosfodiesterase – membro 2 (ENPP2)	- regulação da angiogênese	<i>Naive</i>	<i>Controle</i>
Fator de crescimento insulina-símile proteína 7 (IGFBP-7)	- regulação do crescimento celular	<i>Naive</i>	<i>Controle</i>
Fator de crescimento insulina-símile proteína 7, isoforma CRA_a	- regulação negativa da via de sinalização do receptor do fator de crescimento semelhante à insulina	<i>Naive</i>	<i>Controle</i>
Fator Derivado de Epitélio Pigmentar (PEDF)	- regulação negativa da angiogênese - regulação negativa da resposta inflamatória	<i>Naive</i>	<i>Controle</i>
Inibidor Tecidual de Metaloproteinase 1 (TIMP1)	- regulação da angiogênese	Resistente	<i>Controle</i>
Metalotioneína – 1G	- resposta celular ao estímulo do fator de crescimento vascular e endotelial - regulação negativa do crescimento	<i>Controle</i>	<i>Naive</i>
Receptor 1 do Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGFR-1)	- via de sinalização do receptor do fator de crescimento vascular endotelial - regulação da angiogênese	Resistente	<i>Naive</i>
Receptor de tirosina cinase, isoforma CRA_a (KDR)	- via de sinalização do receptor do fator de crescimento vascular endotelial	Resistente	<i>Naive</i>

Vitronectina	- regulação do complemento - regulação positiva do VEGF - constituinte da matriz extracelular - adesão celular	Resistente	Controle
Ubiquitina hidrolase carboxi-terminal	- resposta à isquemia	Controle	<i>Naive</i>

*A repetição de proteínas se deve por algumas possuírem mais de uma das funções selecionadas. Proteínas com significância estatística (Anova $p < 0.005$) comparando os grupos *naive*, resistente e controle entre si. Fonte: do autor (2019).

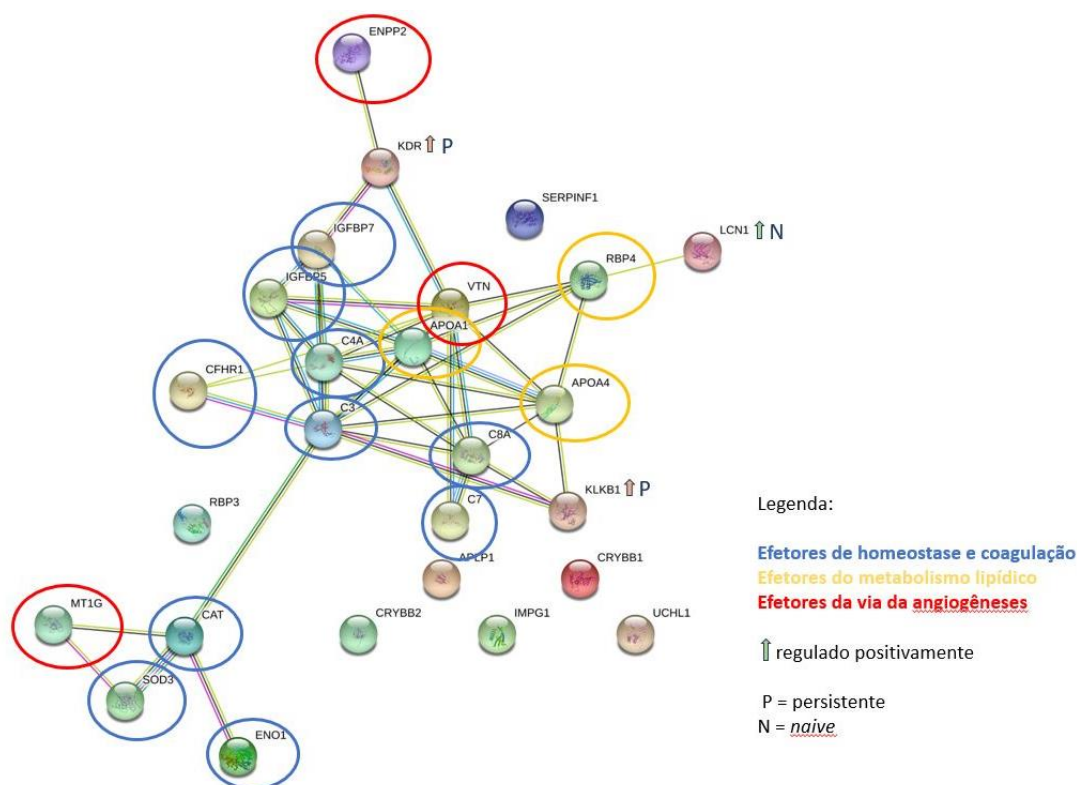


Figura 20: Agrupamento das proteínas selecionadas em vias moleculares/processos biológicos. As ligações entre as proteínas representam interações, conforme o padrão do programa String. Fonte: do autor, 2019.

O privilégio imune do olho é fator protetor da função e homeostase ocular (AMBATI; ATKINSON; GELFAND, 2013). Este privilégio imunológico é caracterizado pela tolerância a antígenos estranhos ao olho, devido principalmente à expressão de fatores imunossupressores endógenos e à ausência de linfáticos intra-oculares funcionais (MOROHOSHI et al., 2009; STREILEIN, 1995). No entanto, a introdução de sinais inflamatórios estranhos ou fatores endógenos (alguns ainda desconhecidos) evoca uma resposta imune inata local (AMBATI; ATKINSON; GELFAND, 2013). Assim, em estado de homeostase, as inúmeras vias da cascata do complemento, do metabolismo lipídico e da inflamação funcionam harmonicamente

para manter a função ocular; entretanto, a desregulação destas vias e o estresse oxidativo tão comum na região macular podem estimular a degeneração retiniana, desenvolvendo todo processo fisiopatogênico da DMRI com potencial progressão neovascular coroidal (AMBATI; ATKINSON; GELFAND, 2013; PARK; CONNOR; LAMBRIS, 2019; REZAR-DREINDL et al., 2016; VOLZ; PAULY, 2015). A Figura 20 demonstra a interação que as proteínas selecionadas apresentam entre si e com as vias principais e acessórias adicionais da angiogênese coroidal, anteriormente mencionadas.

A função visual não se restringe aos olhos. O ser humano interpreta as imagens no córtex occipital cerebral, no entanto, a homeostase ocular é imprescindível para a sensação visual fisiológica e várias espécies proteicas estão envolvidas neste processo. As cristalinas são exemplos de proteínas muito abundantes e solúveis nos tecidos oculares e são as principais componentes do cristalino, o tecido mais rico em proteínas do corpo. A literatura já demonstra, contudo, outras importantes funções das cristalinas relacionadas com o trato neurossensorial do olho, com destaque para a regulação de astrócitos, remodelação de vasos retinianos (SINHA et al., 2008), regulação da apoptose (MA et al., 2011) e depuração dos segmentos externos dos fotorreceptores pelo EPR (VALAPALA et al., 2014a). Em DMRI neovascular, trabalhos já demonstraram inúmeros auto-anticorpos e complexos imunes contra alfa e beta cristalina, na retina e coróide, envolvidos em um processo de inflamação crônica ocular (MOROHOSHI et al., 2012a). As α -cristalinas são expressas em citosol e mitocôndrias de células do EPR, protegendo-as do estresse oxidativo. Funcionam ainda como moduladores da angiogênese, do VEGF e as proteínas chaperonas derivadas de α -cristalinas também funcionam como inibidores da morte celular induzida por oxidação (KANNAN; SREEKUMAR; HINTON, 2016). As proteínas beta cristalinas e o Interfotoreceptor matriz de proteoglicano 1 (IMPG1) também estão envolvidos na percepção visual que estavam reguladas entre as condições analisadas e também permitiram o agrupamento de replicatas e a distinção entre os três grupos da pesquisa. A literatura ainda carece de estudos que correlacionem estas proteínas com a fisiopatogênese da DMRI de forma consistente. A proteína 4 ligante de retinol (RBP-4), além de ter anotações GO envolvendo a percepção visual e o metabolismo

do retinol, também já foi retratada em um potencial tratamento da DMRI atrófica e da Doença de Stargardt (CIOFFI et al., 2015).

As drusas correspondem a um acúmulo de detritos celulares incluindo proteínas, minerais e lipídios entre a membrana de Bruch e o EPR (WANG et al., 2010). E o acúmulo lipídico neste sítio é considerado um acontecimento precoce na fisiopatogênese da DMRI (Curcio et al., 2001; Curcio et al., 2005a; Chen et al., 2010; Conley et al., 2005; Neale et al., 2010). O acúmulo de lipoproteínas na membrana de Bruch em si não é condição suficiente para formar as drusas, são também necessários efeitos da oxidação lipídica e ativação de vias inflamatórias. Assim, em pacientes senis, lipoproteínas e lipídios oxidados são como um gatilho precoce da fisiopatogênese da DMRI, em especial pelo ambiente macular favorável ao estresse oxidativo devido à exposição constante à luz, à elevada atividade metabólica macular, ao alto fluxo sanguíneo, ao acúmulo patológico de lipoproteínase à capacidade antioxidante reduzida do EPR envelhecido (HANDA et al., 2017; JUN et al., 2019).

Apesar da patogênese das drusas não ser completamente elucidada, Thompson et al. (2015) propõem um novo mecanismo para sua formação e crescimento. Utilizando espectrometria de massas por imagem e cristalografia de raios X, os pesquisadores confirmaram a presença de fosfato de cálcio (HAP) em esférulas ocas contendo colesterol em todos os depósitos sub-EPR na mácula e periferia. Por imunohistoquímica, comprovaram que inúmeras proteínas como fator do complemento H, vitronectina e beta amiloide revestiam tais esférulas. Ou seja, a produção e secreção de lipídeos e lipoproteínas contendo colesterol, secretados pelo menos em parte pelo EPR (JOHNSON et al., 2011), são recrutados e retidos na membrana de Bruch envelhecida (CURCIO et al., 2009; RUDOLF; CURCIO, 2009) que sequencialmente, em um processo de oligomerização auto-dirigida, facilita deposições adicionais proteicas levando, em última instância, à formação e crescimento das drusas (JUN et al., 2019). Outros estudos fazem ainda uma analogia entre oxidação de lipoproteínas na membrana de Bruch com o evento da aterosclerose (HANDA et al., 2017; JUN et al., 2019; NEWSOME et al., 1987; TYL HEWITT; NAKAZAWA; NEWSOME, 1989; ZARBIN, 2004).

As drusas funcionam como uma barreira entre os coriocapilares e os fotorreceptores, limitando a oxigenação e o suporte nutricional dos cones e

bastonetes e, por conseguinte, a hipóxia e isquemia geradas configuram-se como agentes fundamentais na fisiopatogênese da DMRI (CARLO et al., 2015). O sistema ubiquitina-proteossoma é um dos principais componentes responsáveis pela degradação de proteínas danificadas ou desnecessárias ao metabolismo celular produzidas pela heterofagia dos segmentos externos dos fotorreceptores (BLASIAK et al., 2019). A ubiquitina hidrolase carboxi-terminal foi encontrada regulada positivamente nos controles e negativamente no grupo com DMRI virgens de tratamento. Tal achado vai de encontro a pesquisadores como Gleen e colaboradores (2012) que encontraram a ubiquitina hidrolase carboxi-terminal regulada positivamente em pacientes com DMRI e disfunção do EPR (GLEEN et al., 2012)

A presente pesquisa encontrou nas amostras de humor aquoso analisadas, inúmeras proteínas frequentemente associadas a partículas lipoproteicas, incluindo fator de complemento H, proteína amilóide-similar 1 e vitronectina que foram destacadas por Thompson et al. (2015) na fisiopatogênese da DMRI. Assim como as duas primeiras, a vitronectina apresentou uma análise estatisticamente significativa para diferenciação entre os grupos analisados, estando neste caso regulada positivamente no grupo resistente e negativamente no grupo controle. As descrições GO correlacionam ainda a vitronectina como constituinte da matriz extracelular, com regulação do complemento, regulação positiva do VEGF e adesão celular. Encontraram-se ainda as isoformas A-I e A-IV da apolipoproteína reguladas positivamente em pacientes com DMRI resistente, corroborando com achados de Levy e colaboradores (2015) que demonstraram que a apolipoproteína consiste em um fator promotor da sobrevivência de fagócitos mononucleares sub-retinianos e, portanto, estimulador da inflamação crônica na DMRI (LEVY et al., 2015). Fosfoinosítídeo fosfolipase C e Proteína 3 ligante de Retinol (RBP-3) que apresentam anotações GO relacionados a metabolismo lipídico também foram encontradas nas amostras analisadas reguladas positivamente no grupo resistente e negativamente no grupo controle. Morohoshi e colaboradores (2012b) identificaram anticorpos anti-retinianos contra RBP-3 em pacientes com DMRI neovascular (MOROHOSHI et al., 2012b).

Já foi extensamente documentada a associação entre estresse oxidativo e afecções relacionadas à idade, a exemplo da doença de Alzheimer, doença de

Parkinson, aterosclerose, certos tipos de câncer e DMRI (DENTCHEV et al., 2003; DONG et al., 2009; HOLLYFIELD et al., 2008). Para efeito comparativo, a retina tem o maior consumo de oxigênio por grama de tecido no corpo humano, sendo juntamente com o EPR extremamente suscetível a dano provocado pelo estresse oxidativo (HERNÁNDEZ-ZIMBRÓN et al., 2018). Quando esses fatores são combinados no tempo, a carga oxidativa pode acumular-se rapidamente e, eventualmente, superar a capacidade anti-oxidante do olho, tendo como evidência deste desequilíbrio a grande quantidade de proteínas oxidadas, lipídios e fatores relacionados à inflamação constituindo as drusas (BLASIAK, 2011). A heterofagia dos fotorreceptores pelas células do EPR é uma fonte constante de ácidos graxos poliinsaturados gerando um ambiente rico em espécies reativas de oxigênio (ERO) (CATALA, 2011) que pode induzir a modificação oxidativa de fosfolipídios. Todo este ambiente de exposição a ERO induz reconhecimento imunológico com dano inflamatório principalmente, por meio da ativação da cascata do complemento (HERNÁNDEZ-ZIMBRÓN et al., 2018; SHAW et al., 2012).

O presente estudo encontrou na análise proteômica do humor aquoso proteína amiloide, catalase (CAT), enolase, glutatona peroxidase (GPx), lipocalina e superóxido dismutase (SOD) reguladas entre os cenários, que permitiram o agrupamento dos pacientes por seu perfil global de proteínas nos três cenários analisados. Também foi possível observar correlação das anotações GO destas proteínas às alterações de funcionalidade causadas pelo estresse oxidativo presentes na DMRI.

A retina contém um considerável número de agentes antioxidantes nos fotorreceptores e EPR, principalmente na porção central da retina a exemplo de enzimas como a superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx) e catalase (CAT) (MROWICKA et al., 2017). As duas primeiras foram encontradas em concentração aumentada nos casos de DMRI resistentes ao anti-VEGF, entretanto, a catalase esteve com regulação positiva no grupo controle neste estudo experimental em questão. Esta enzima por estar regulada positivamente no controle pode indicar que estes pacientes sem retinopatia estão em homeostase com relação ao seu metabolismo de oxirredução, contrastando com a diminuição encontrada nos outros cenários *naïve* e persistente.

A proteína amiloide, já muito conhecida na fisiopatologia da doença de Alzheimer (KASIM et al., 2019), é também um importante componente das drusas (LEE et al., 2019; OHNO-MATSUI, 2011) e foi encontrada no presente estudo regulada negativamente no grupo controle, sem DMRI. A lipocalina 1 (LCN 1) que já fora caracterizada como um protetor do estresse oxidativo potencialmente provocado por produtos da peroxidação lipídica (LECHNER; WOJNAR; REDL, 2001; YAO et al., 2013) foi encontrada regulada positivamente em pacientes com DMRI *naive* e negativamente em DMRI resistentes ao anti-VEGF nesta pesquisa.

Enzima chave da via glicolítica, também encontrada na atrofia geográfica, na atrofia neovascular da DMRI (ADAMUS et al., 2014; JOACHIM et al., 2007; MOROHOSHI et al., 2012b) e com anotações GO envolvidas com estresse oxidativo, a enolase foi regulada positivamente no grupo controle e negativamente no grupo resistente. É comum a descrição sobre a estimulação auto-imune da enolase por vários autores, uma característica peculiar para a DMRI, tanto que Adamus e colaboradores (2014) já avaliaram a prevalência de autoanticorpos anti-retinianos contra a enolase em diferentes estágios da degeneração macular relacionada à idade (ADAMUS et al., 2014).

Como parte do sistema imune inato, o sistema do complemento desempenha um papel crucial na manutenção da vigilância imunológica e da homeostase no microambiente ocular (AMBATI; ATKINSON; GELFAND, 2013; MARKIEWSKI; LAMBRIS, 2007). Ao longo dos anos, os fotorreceptores e as células do EPR da retina são expostos a inúmeros ativadores imunológicos inatos, de tal forma que a regulação rigorosa da imunidade é imprescindível para prevenir eventos inflamatórios deletérios. Contudo, a desregulação do sistema do complemento pode, potencialmente, levar à inflamação ocular crônica, o que contribui para a perda de visão na DMRI. Uma das primeiras indicações que o sistema complemento está envolvido na progressão da DMRI foi encontrar os subprodutos do complemento (fator H) nas drusas (HAGEMAN et al., 2001). O fator C3 é um componente central das três vias do complemento e mudanças funcionais neste fator afetam diretamente toda a cascata (RICKLIN et al., 2016). Na presente pesquisa, houve o aumento de C3, C2, C4, C7 encontrados em pacientes com DMRI resistentes ao anti-VEGF, tendo assim correspondência com o descrito na literatura (GRASSMANN et al., 2016; LU et al., 2018; VOLZ; PAULY, 2015). Já o fator C8, por sua vez, foi

encontrado regulado positivamente no grupo de DMRI neovascular virgem de tratamento. Conforme relatado por Lu et al. (2018), o fator B do complemento (CFB) foi encontrado em maior concentração nos pacientes controles, sem retinopatia, funcionando potencialmente como fator preventivo para DMRI (LU et al., 2018).

A clusterina, segundo as anotações GO observadas, está envolvida em processos inflamatórios e da cascata do complemento. Entretanto, também pode desempenhar um papel protetor na resposta ao ambiente de oxirredução (estresse oxidativo) das células do EPR humano, o que contribui para a sobrevivência celular por meio da via PI3K / Akt, uma via de sinalização intracelular importante na regulação do ciclo celular. Portanto, a clusterina pode ser considerada um fator preventivo da DMRI que, ao ser encontrada em maior intensidade relativa nos pacientes com DMRI resistentes nesta pesquisa, denota que a referida via permanece ativa no tentame de se restabelecer a homeostase local. Assim como a proteína amiloide, a clusterina também já foi descrita na fisiopatogênese da doença de Alzheimer (DHIMAN et al., 2019). A cadeia pesada de imunoglobulina *Mu*, por sua vez, apesar de suas anotações GO correlacionarem-na com resposta imune e ativação do complemento, foi um marcador encontrado nesta pesquisa, onde não se observou na literatura associação descrita com DMRI.

Como anteriormente comentado, a literatura já demonstra que o envelhecimento do EPR em combinação com a desregulação imunológica desempenham um papel importante na quebra da homeostase ocular na DMRI, visto que, as vias inflamatórias contribuem para a formação de drusas, disfunção das células do EPR e morte de fotorreceptores (STANTON; WRIGHT, 2014). Inúmeros trabalhos ratificam a relação direta que os o sistema do complemento tem com a progressão da degeneração retiniana (ZHAO; WONG, 2012). Entretanto, a resposta imune adaptativa que leva à ativação e regulação de citocinas inflamatórias das células B e T ainda não teve sua correlação completamente elucidada (CAMELO, 2014; LIU et al., 2011).

Além das proteínas, já comentadas na ativação do complemento (clusterina, cadeia pesada de imunoglobulina *Mu*) que também apresentam correlação com inflamação em suas descrições funcionais GO, esta pesquisa encontrou a caliceína plasmática e o antígeno CD14 de diferenciação monocítica com intensidade relativa aumentada no grupo de DMRI resistente. O sistema de caliceína-cinina plasmático

(KKS) desempenha um papel importante na fisiologia humana. Engloba o fator de coagulação XII (FXII), o complexo de pré-caliceína (PK) e o quininogênio de alto peso molecular (HK). Por estar envolvido na formação de HK ativado (um peptídeo angiogênico) e de bradicinina (um peptídeo pró-inflamatório e potente vasodilatador), o KKS já foi descrito na patogênese de inúmeros processos inflamatórios e angiogênicos (BRYANT; SHARIAT-MADAR, 2009). No entanto, a literatura carece de estudos demonstrando uma correlação entre tal sistema e a DMRI.

Guo et al, (2004) e Ali et al (2005) correlacionaram, mesmo que indiretamente, o antígeno CD14 com a apolipoproteína E (APOE), a principal lipoproteína encontrada na retina (ALI et al., 2005; ANDERSON et al., 2001; GUO; LADU; VAN ELDIK, 2004) que desempenha papel crucial no transporte lipídico local (LEVY et al., 2015). Sendo assim, além de sabidamente participar da via inflamatória, o antígeno CD14 também responde por participação da via do metabolismo lipídico na patogênese da DMRI.

As células do epitélio pigmentar da retina são uma importante fonte de proteínas inibidoras da angiogênese. O comprometimento da função do EPR é, portanto, um evento precoce e crucial que influencia e impulsiona a neovascularização coroidal (DAWSON et al., 1999; FARNOODIAN et al., 2017). O fator derivado do epitélio pigmentar (PEDF), muito conhecido por sua participação na supressão da angiogênese e também com anotações GO demonstrando regulação negativa da resposta inflamatória, foi encontrado com intensidade negativa no grupo controle desta pesquisa (catarata). Ou seja, infere-se que em ambientes com homeostase retiniana mantida como nos pacientes com catarata sem retinopatia, a necessidade de produção de fatores inibidores da inflamação e angiogênese (como o PEDF) é pequena.

No contexto da DMRI, a neovascularização macular é via final da degeneração retiniana. Ou seja, trata-se de uma doença multifatorial resultante de uma desregulação da homeostase ocular envolvendo, dentre outros, o envelhecimento, a alteração do metabolismo lipídico, o estresse oxidativo e a ativação de vias inflamatórias (AMBATI; ATKINSON; GELFAND, 2013; REZAR-DREINDL et al., 2016; VOLZ; PAULY, 2015). Inúmeras proteínas estão descritas na patogênese e progressão da angiogênese deste tipo de degeneração retiniana e destacaram-se neste referido estudo o fator de crescimento insulina semelhante proteína 7

(IGFBP-7) e o fator derivado do epitélio pigmentar (PEDF), regulados negativamente em pacientes sem retinopatia. Infere-se, portanto, que estes fatores reguladores negativos da angiogênese tiveram estímulo positivo de produção, de fato, predominantemente em pacientes com DMRI e não nos controles. A Ectonucleotídeo pirofosfatase foi regulada positivamente no grupo DMRI *naive* neste estudo experimental, no entanto, apesar de ter anotação GO em regulação da neoangiogênese, a literatura é pobre ao correlacioná-la com DMRI.

A penetração da neovascularização coroidal através da membrana de Bruch é estimulada mediante a produção de metaloproteinases (MMPs), que são enzimas que digerem proteínas da matriz extracelular (JULIE M. ROSENTHAL, MD; MARK W. JOHNSON; W.K., 2013). Inibidores das MMPs chamados de TIMPs agem como fatores inibidores da angiogênese (QI et al., 2003). Neste estudo experimental, encontrou-se TIMP-1 regulada positivamente no grupo persistente, correlação pouco esclarecida na literatura.

A metalotioneína - 1G consiste em uma metaloproteína rica em cisteína de baixo peso molecular. Em mamíferos, tem múltiplos papéis, como a desintoxicação de metais pesados, a regulação da homeostase essencial do metal e a proteção contra o estresse oxidativo. Tal proteína esteve regulada positivamente no grupo controle nesta pesquisa, o que condiz com a literatura que a correlaciona com neuroproteção retiniana (ITO; TANAKA; HARA, 2013).

A fosforilação das proteína cinases é um mecanismo importantena proliferação e diferenciação de células endoteliais, uma vez que a atividade de receptores da tirosina quinase é um pré-requisito para a vasculogênese e a angiogênese(NG et al., 2017).O receptor do fator de crescimento vascular e endotelial (VEGF), por sua vez e por certo, é peça chave na patogênese da neovascularização coroidal da DMRI. Encontrou-se um receptor do tipo III de tirosina cinase e o receptor 1 do VGEF (VEGFR1) regulados positivamente no grupo resistente e negativamente no grupo DMRI *naive* no presente estudo.

Especificamente no contexto de resistência, pode-se também fazer um corte para analisar apenas os pacientes com DMRI deste estudo. Encontraram-se, com significância estatística e capacidade discriminativa, 2 (duas) proteínas reguladas positivamente no grupo virgem de tratamento (*naive*) e negativamente no grupo resistente ao anti-VEGF. Em 3 (três) outras proteínas ocorreu o oposto (Tabelas 2 e

3). De fato, a cadeia pesada de imunoglobulina *Mu* mostra-se regulada positivamente no grupo *naive* e negativamente no grupo resistente. A mesma condição se repete com lipocalina, em relação à anterior, uma proteína que já demonstra correlação com DMRI com maior consistência na literatura. Segundo Ghosh et al. (2017), a lipocalina funciona como um marcador de DMRI inicial, particularmente quando a depuração (*clearance*) mediada por lisossomos no RPE está comprometida, o que contribui com a indução de uma resposta inflamatória crônica. Tal hipótese também já fora demonstrada em modelo animal de DMRI (VALAPALA et al., 2014b).

No que se refere às 3 (três) proteínas reguladas positivamente no grupo resistente e negativamente no grupo *naive*, como já mencionado, a literatura demonstra que uma está diretamente ligada à processo inflamatório (caliceína plasmática) e duas com o VEGF (receptor de tirosina cinase, isoforma CRA_a e o receptor 1 do Fator de Crescimento Vascular Endotelial). Ao se caracterizar uma lenta perda de eficácia do medicamento (anti-VEGF) ao longo do tempo, alguns autores introduziram o novo conceito de resistência no contexto da DMRIn. Fala-se de tolerância à medicação quando seu efeito pode ser melhorado se a dosagem for aumentada ou administrada em um menor intervalo de tempo (BINDER, 2016). Esta diferença no número de receptores em pacientes resistentes, além de ajudar a entender a dificuldade de controlar a membrana neovascular subretiniana, pode ainda corroborar com a explicação da tolerância patológica que alguns pacientes desenvolvem ao tratamento padrão-ouro da DMRIn. Ou seja, como o receptor 1 do Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGFR-1) está regulado positivamente nos pacientes do grupo resistente, tal diferenciação pode explicar, ao menos em parte, a persistência de atividade de doença mesmo com uso de anti-VEGF em pacientes com DMRIn.

Ao se perceber que importante parcela da população com DMRIn tratada permanece com a doença em atividade, compreende-se a necessidade de celeridade na consolidação de vias alternativas que atuam na neoangiogênese final da DMRI. Diante de uma doença crônica, é comum que a estratégia mais eficaz para se garantir boa visão aos pacientes seja a quebra da sua história natural com o intuito de prevenir as formas mais avançadas. Pesquisas recentes buscam meios terapêuticos utilizando-se de vias adicionais na fisiopatogênese da DMRI. Estudos já

avaliam a segurança e eficácia do lapalizumabe, um inibidor do fator D do complemento que regularia negativamente a cascata da inflamação e, por fim, a progressão da doença (DMRI). Outros estudos se debruçam sobre a importância da redução do nível de vitamina A processada no ciclo visual (emixustat), a eficácia da inibição multialvo da tirosina quinase (pazopanibe) e se a inibição conjunta do VEGF e do fator de crescimento derivado de plaquetas (squalamina) são estratégias viáveis para complementar a terapêutica da DMRI (ÁVILA; GARCIA; ISAAC, 2015; BHAGAT; ZARBIN, 2015; JACK et al., 2015; KEFAUVER, 2014; ZEITZ; JOUSSEN, 2017). As proteínas encontradas e selecionadas neste estudo podem também contribuir para este fim.

E diante da avaliação do grau de contribuição das proteínas reguladas na diferenciação dos cenários aqui apresentados, nota-se que a maioria com maior importância nos cenários (*VIP score* 1,4 – 2.0) encontram-se no grupo controle. Sugere-se, portanto, avaliações adicionais sob o crivo do potencial destas moléculas, para definição de potenciais biomarcadores estratégicos na DMRI. De certo, as pesquisas necessitam de complementação, haja vista se encontrar, incluindo este estudo, proteínas reguladas e ainda não caracterizadas, mas que possuem significância estatística na diferenciação dos grupos analisados.

As trinta e nove proteínas encontradas neste estudo são potencialmente importantes para o entendimento da fisiopatologia da DMRI. As já com descrições correlacionando-as com DMRI e mesmo as ainda sem descrições na literatura, podem fazer parte de um perfil molecular específico para cada condição estudada. Abrem-se perspectivas de termos, além de uma classificação clínica dos estágios da DMRI, um perfil proteico específico com a vantagem das modificações moleculares precederem as manifestações clínicas. As expectativas podem ser inicialmente por aquelas proteínas mais estratégicas, quer por regulação positiva e maiores intensidades relativas (*fold change / VIP score*), maior facilidade de mensuração em matriz sérica (auto-anticorpos) ou por representatividade em cada uma das vias adicionais da neovascularização coroidal, descritas nesta pesquisa. Assim, destacam-se as proteínas cristalinas tanto alfa, quanto beta ou gama envolvidas em função visual, a exemplo da cristalina alfa cadeia B (P02511), cristalina beta 2 (R4UMM2) e cristalina gama C (P07315). Na via do metabolismo lipídico enfatizam-se a apolipoproteína A-I, isoformaCRA_a (A0A024R3E3) que tem correlação com a

formação de drusas, a fosfoinositídeo fosfolipase C (Q86YU9) com o maior *fold change* e a proteína 3 ligante de retinol (P10745) pela potencial documentação sérica por auto-anticorpo. Na via do estresse oxidativo, tem-se a catalase (P04040) como a proteína com maior intensidade relativa (maior *VIP score* entre todas as proteínas discriminantes encontradas). Na via da ativação do complemento, tivemos uniformidade com as descrições da literatura, com o grupo de pacientes com DMRIn demonstrando, de forma geral, aumento relativo em comparação ao grupo controle. Todas as proteínas encontradas nesta pesquisa e envolvidas nesta via podem ser potenciais candidatas a biomarcadores. Já na via inflamatória, destaca-se a enolase 1 (A0A024R4F1) que está entre as trinta proteínas com maior capacidade discriminativa das condições analisadas (*VIP score*). E na via angiogênica, por fim, até por necessidade de maiores estudos pelas inconsistências em comparação com dados da literatura, destaca-se o inibidor tecidual de metaloproteinases (TIMP, Q58P21) e, por estar no cerne da fisiopatogênese vigente da neovascularização coroidal, o receptor 1 do fator de crescimento vascular e epitelial (VEGFR1, A0A1W2PNW4).

7. CONCLUSÃO

O presente estudo caracterizou o perfil global proteico em humor aquoso de pacientes com DMRI, em comparação aos indivíduos controles, ratificando o potencial da espectrometria de massas e de tal matriz biológica na prospecção de possíveis biomarcadores na Oftalmologia.

A diferenciação do proteoma de cada cenário biológico possibilitou ainda encontrar um perfil de proteínas discriminatórias para cada grupo: pacientes com DMRI virgens de tratamento (*naive*), pacientes com DMRI neovascular resistentes ao anti-VEGF e pacientes controles sem retinopatia ou doenças sistêmicas.

Foram identificadas 2336 proteínas, *in vivo*, das quais 185 estavam diferentemente reguladas e permitiram a diferenciação das condições clínicas entre si. Trinta e nove destas proteínas permitiram ainda correlacionar os grupos analisados com o metabolismo lipídico, o estresse oxidativo, o sistema do complemento, vias inflamatórias e da angiogênese. Assim, ratifica-se a participação de vias adicionais na fisiopatogênese da neovascularização macular, que em um futuro próximo podem corroborar potencialmente com o diagnóstico, prognóstico e/ou terapêutica da DMRI neovascular.

Grande parte das proteínas envolvidas na fisiopatogênese da Degeneração Macular Relacionada à Idade encontradas neste estudo teve correspondência na literatura. Ainda foram documentadas proteínas inéditas que também podem servir como potenciais novos biomarcadores da DMRI neovascular. Para tal, maiores estudos prospectivos e de validação ainda são necessários para avaliar a capacidade diagnóstica e prognóstica das classes proteicas observadas em desequilíbrio.

8. REFERÊNCIAS

ABRAHAM, P.; YUE, H.; WILSON, L. Randomized, double-masked, sham-controlled trial of ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration: PIER study year 2. **American Journal of Ophthalmology**, 2010.

ADAMUS, G. et al. Prevalence of anti-retinal autoantibodies in different stages of Age-related macular degeneration. **BMC Ophthalmology**, v. 14, n. 154, p. 1–14, 2014.

AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 422, p. 198–207, 2003.

AHRENS, C. H. et al. Generating and navigating proteome maps using mass spectrometry. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 11, p. 789–801, 2010.

ALI, K. et al. Apolipoprotein E suppresses the type I inflammatory response in vivo. **Circulation Research**, v. 97, p. 922–927, 2005.

AMARO, M. H. et al. Tratamento da degeneração macular relacionada à idade com neovascularização de coróide extrafoveal. Análise de uma série de casos e revisão de literatura 1. v. 70, n. 4, p. 261–267, 2011.

AMBATI, J.; ATKINSON, J. P.; GELFAND, B. D. Immunology of age-related macular degeneration. **Nat Rev Immunol**, v. 13, n. 9, p. 438–451, 2013.

ANDERSON, D. H. et al. Local cellular sources of apolipoprotein E in the human retina and retinal pigmented epithelium: Implications for the process of drusen formation. **American Journal of Ophthalmology**, v. 131, p. 767–781, 2001.

ANDERSON, D. H. et al. Characterization of β amyloid assemblies in drusen: The

deposits associated with aging and age-related macular degeneration. **Experimental Eye Research**, v. 78, n. 2, p. 243–256, 2004.

ARNOLD, J. J. et al. Two-year outcomes of “treat and extend” intravitreal therapy for neovascular age-related macular degeneration. **Ophthalmology**, 2015.

ÁVILA, M. P. DE; GARCIA, J. M. B. DE B.; ISAAC, D. L. C. Degeneração macular relacionada à idade: presente e futuro. **e-oftalmo.cbo. Revista Digital de Oftalmologia.**, v. 1, 2015.

BHAGAT, N.; ZARBIN, M. **Recent Innovations in Medical and Surgical RetinaAsia-Pacific journal of ophthalmology (Philadelphia, Pa.)**, 2015.

BINDER, S. Loss of reactivity in intravitreal anti-VEGF therapy: Tachyphylaxis or tolerance? **British Journal of Ophthalmology**, p. 1–2, 2016.

BLASIAK, J. Implications of altered iron homeostasis for age-related macular degeneration. **Frontiers in Bioscience**, v. 16, n. 1, p. 1551–1559, 2011.

BLASIAK, J. et al. Interplay between Autophagy and the Ubiquitin-Proteasome System and Its Role in the Pathogenesis of Age-Related Macular Degeneration. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 1, p. 210, 2019.

BOWREY, H. E. et al. Imaging mass spectrometry of the visual system: Advancing the molecular understanding of retina degenerations. **Proteomics - Clinical Applications**, v. 10, n. 4, p. 391–402, 2016.

BRANDL, C. et al. Epidemiologie der altersbedingten MakuladegenerationEpidemiology of age-related macular degeneration. **Der Ophthalmologe**, v. 113, n. 9, p. 735–745, 2016.

BROWN, C. N. et al. Metabolomics and age-related macular degeneration. **Metabolites**, v. 9, n. 1, 2019.

BROWN, D. M. et al. Ranibizumab versus Verteporfin Photodynamic Therapy for Neovascular Age-Related Macular Degeneration: Two-Year Results of the ANCHOR Study. **Ophthalmology**, 2006.

BRYANT, J. W.; SHARIAT-MADAR, Z. Human plasma kallikrein-kinin system: Physiological and biochemical parameters. v. 7, p. 234–250, 2009.

BUTLER, D. Crossing the Valley of Death. **Nature**, v. 453, n. 12, p. 840–842, 2008.

CAMELO, S. Potential Sources and Roles of Adaptive Immunity in Age-Related Macular Degeneration: Shall We Rename AMD into Autoimmune Macular Disease? **Autoimmune Diseases**, v. 2014, p. 1–11, 2014.

CAMPOCHIARO, P. A. Ocular neovascularization. v. 91, n. 3, p. 311–321, 2013.

CAMPOCHIARO, P. A. Molecular pathogenesis of retinal and choroidal vascular diseases. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 49, p. 67–81, 2015.

CARLO, TALISA E. DE et al. A review of optical coherence tomography angiography. **International Journal of Retina and Vitreous**, v. 1, n. 5, p. 373–385, 2015.

CARNEIRO, A. V. Sintomas e sinais 2017. **Rev Port Med Geral Fam**, v. 33, p. 10–13, 2017.

CATALA, A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids in the vertebrate retina. **Frontiers in Bioscience**, v. '3, p. 52–60, 2011.

CATHERMAN, A. D.; SKINNER, O. S.; KELLEHER, N. L. Top Down proteomics: Facts and perspectives. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 445, n. 4, p. 683–693, 2014.

CEHOFSKI, L. J. et al. Analytical platforms in vitreoretinal proteomics. **Bioanalysis**,

v. 6, n. 22, p. 3051–3066, 2014.

CEHOFSKI, L. J.; HONORÉ, B.; VORUM, H. A review: Proteomics in retinal artery occlusion, retinal vein occlusion, diabetic retinopathy and acquired macular disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 5, 2017.

CHAKRAVARTHY, U. et al. Clinical risk factors for age-related macular degeneration: A systematic review and meta-analysis. **BMC Ophthalmology**, v. 10, n. 1, 2010.

CHAKRAVARTHY, U. et al. Ranibizumab versus bevacizumab to treat neovascular age-related macular degeneration: One-year findings from the IVAN randomized trial. **Ophthalmology**, v. 119, n. 7, p. 1399–1411, 2012.

CHANNA, R. et al. Regression of Choroidal Neovascularization Results in Macular Atrophy in Anti-Vascular Endothelial Growth Factor-Treated Eyes. **AMERICAN JOURNAL OF OPHTHALMOLOGY**, v. 159, n. 1, p. 9- 19.e2, 2015.

CIOFFI, C. L. et al. Bicyclic [3.3.0]-Octahydrocyclopenta[c]pyrrolo Antagonists of Retinol Binding Protein 4: Potential Treatment of Atrophic Age- Related Macular Degeneration and Stargardt Disease. **J Autism Dev Disord**, v. 58, n. 15, p. 5864–5888, 2015.

CURCIO, C. A. et al. **Aging, age-related macular degeneration, and the response-to-retention of apolipoprotein B-containing lipoproteins** *Progress in Retinal and Eye Research*, 2009.

DAMICO, F. M. Angiogênese e doenças da retina. **Arquivos brasileiros de oftalmologia**, v. 70, n. 3, p. 547–553, 2007.

DAWSON, D. W. et al. Pigment Epithelium-Derived. **science**, v. 285, n. July, p. 245–248, 1999.

DENTCHEV, T. et al. Amyloid-beta is found in drusen from some age-related macular degeneration retinas, but not in drusen from normal retinas. **Molecular vision**, v. 9, p. 184–190, 2003.

DHIMAN, K. et al. **Cerebrospinal fluid biomarkers for understanding multiple aspects of Alzheimer's disease pathogenesis**. [s.l.] Springer International Publishing, 2019. v. 76

DONG, A. et al. Oxidative stress promotes ocular neovascularization. **Journal of Cellular Physiology**, v. 219, n. 3, p. 544–552, 2009.

DOR, M. et al. Investigation of the global protein content from healthy human tears. **Experimental Eye Research**, v. 179, p. 64–74, 2019.

EHLKEN, C. et al. Switch of anti-VEGF agents is an option for nonresponders in the treatment of AMD. **Eye (Basingstoke)**, v. 28, n. 5, p. 538–545, 2014.

ENDERS, P. et al. Retinal Nerve Fiber Loss in Anti-VEGF Therapy for Age-Related Macular Degeneration Can Be Decreased by Anterior Chamber Paracentesis. v. 237, p. 111–118, 2017.

FAILLA, C. M.; CARBO, M.; MOREA, V. Positive and negative regulation of angiogenesis by soluble vascular endothelial growth factor receptor-1. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 5, 2018.

FARNOODIAN, M. et al. Negative regulators of angiogenesis: important targets for treatment of exudative AMD. **Clinical Science**, v. 131, n. 15, p. 1763–1780, 2017.

FERRARA, N.; HILLAN, K. J.; NOVOTNY, W. **Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy** **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2005.

FLAXMAN, S. R. et al. Global causes of blindness and distance vision impairment

1990–2020: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Global Health**, v. 5, n. 12, p. e1221–e1234, 2017.

FRITSCHÉ, L. G. et al. A Subgroup of Age-Related Macular Degeneration is Associated With Mono-Allelic Sequence Variants in the ABCA4 Gene. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 53, n. 4, p. 2112–2118, 2012.

FUENTES-ARDERIU, X. What is a biomarker? It's time for a renewed definition. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 51, n. 9, p. 1689–1690, 2013.

FUNKE, S. et al. The potential impact of recent insights into proteomic changes associated with glaucoma. **Expert Review of Proteomics**, v. 14, n. 4, p. 311–334, 2017.

GAO, J. et al. NLRP3 Inflammasome: Activation and Regulation in Age-Related Macular Degeneration. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, p. 1–11, 2015.

GAO, Y. et al. Anti-VEGF Monotherapy Versus Photodynamic Therapy and Anti-VEGF Combination Treatment for Neovascular. v. 59, n. 10, p. 4307–4317, 2018.

GLEEN, J. V. et al. Proteomic profiling of human retinal pigment epithelium exposed to an advanced glycation-modified substrate. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.**, v. 250, n. 3, p. 349–359, 2012.

GRASSMANN, F. et al. Multiallelic copy number variation in the complement component 4A (C4A) gene is associated with late-stage age-related macular degeneration (AMD). **Journal of Neuroinflammation**, v. 13, n. 1, p. 1–9, 2016.

GROUP, C. R. et al. Ranibizumab and Bevacizumab for Neovascular Age-Related Macular Degeneration. **New England Journal of Medicine**, v. 364, p. 1897–1908, 2011.

GSTAIGER, M.; AEBERSOLD, R. Applying mass spectrometry-based proteomics to

genetics, genomics and network biology. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, n. 9, p. 617–627, 2009.

GUO, L.; LADU, M. J.; VAN ELDIK, L. J. A dual role for apolipoprotein e in neuroinflammation: anti- and pro-inflammatory activity. **Journal of molecular neuroscience : MN**, v. 23, p. 205–212, 2004.

HAGEMAN, G. S. et al. Vitronectin is a constituent of ocular drusen and the vitronectin gene is expressed in human retinal pigmented epithelial cells. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 13, p. 477–484, 1999.

HAGEMAN, G. S. et al. **An integrated hypothesis that considers drusen as biomarkers of immune-mediated processes at the RPE-Bruch's membrane interface in aging and age-related macular degeneration** *Progress in Retinal and Eye Research*, 2001.

HANDA, J. T. et al. Lipids, Oxidized Lipids, Oxidation-specific Epitopes, and Age-related Macular Degeneration. **Biochim Biophys Acta**, v. 1862, n. 4, p. 430–440, 2017.

HEIER, J. S. et al. Intravitreal aflibercept (VEGF trap-eye) in wet age-related macular degeneration. **Ophthalmology**, v. 119, n. 12, p. 2537–2548, 2012.

HEIN, M. Y. et al. Proteomic Analysis of Cellular Systems. **Handbook of Systems Biology**, p. 3–25, 2012.

HERNÁNDEZ-ZIMBRÓN, L. F. et al. Age-Related Macular Degeneration: New Paradigms for Treatment and Management of AMD. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, p. 1–14, 2018.

HERNANDEZ, L. et al. Intravitreal Aflibercept Versus Ranibizumab for Wet Age-Related Macular Degeneration: A Cost-effectiveness Analysis. **Journal of Managed**

Care & Specialty Pharmacy, v. 24, n. 7, p. 608–616, 2018.

HOLASH, J. et al. VEGF-Trap: A VEGF blocker with potent antitumor effects. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2002.

HOLLYFIELD, J. G. et al. Oxidative damage-induced inflammation initiates age-related macular degeneration. **Nature Medicine**, v. 14, n. 2, p. 194–198, 2008.

HOLMES, D. I.; ZACHARY, I. The VEGF family - angiogenic factors in health and disease. **Genome Biol.**, v. 6, n. 1465- 6914 (Electronic), p. 209, 2005.

HUANG, W.-C. et al. Necessity of Paracentesis Before or After Intravitreal Injection of Bevacizumab. **ARCHOPHTHALMOL**, v. 126, n. 9, p. 2008–2009, 2008.

HUSSAIN, R. M. et al. Pharmacotherapy of retinal disease with visual cycle modulators. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 19, n. 5, p. 471–481, 2018.

ICHIYAMA, Y. et al. Anterior Chamber Paracentesis Might Prevent Sustained Intraocular Pressure Elevation after Intravitreal Injections of Ranibizumab for Age-Related Macular Degeneration. v. 2192, p. 234–238, 2014.

IMRIE, C.; TATHAM, A. J. Glaucoma: the patient's perspective. **British Journal of General Practice**, v. 66, n. 646, p. e371–e373, 2016.

IONESCU, I. C. et al. Overexpression of Tear Inflammatory Cytokines as Additional Finding in Keratoconus Patients and Their First Degree Family Members. **Mediators of Inflammation**, v. 2018, p. 1–9, 2018.

ITO, Y.; TANAKA, H.; HARA, H. The potential roles of metallothionein as a therapeutic target for cerebral ischemia and retinal diseases. **Curr Pharm Biotechnol.**, v. 14, n. 4, p. 400–407, 2013.

JACK, L. S. et al. Emixustat and larpalizumab: Potential therapeutic options for

geographic atrophy. **Developments in Ophthalmology**, 2015.

JOACHIM, S. C. et al. **Analysis of IgG antibody patterns against retinal antigens and antibodies to α -crystallin, GFAP, and α -enolase in sera of patients with “wet” age-related macular degeneration** *Graefe’s Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 2007.

JOHNSON, L. V. et al. Cell culture model that mimics drusen formation and triggers complement activation associated with age-related macular degeneration. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 45, p. 18277-18282, 2011.

JULIE M. ROSENTHAL, MD; MARK W. JOHNSON, M.; W.K. Negative Regulators of Angiogenesis, Ocular Vascular Homeostasis, and Pathogenesis and Treatment of Exudative AMD. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 13, n. 4, p. 471–486, 2013.

JULIEN, S. et al. Zinc deficiency leads to lipofuscin accumulation in the retinal pigment epithelium of pigmented rats. **PLoS ONE**, v. 6, n. 12, 2011.

JUN, S. et al. The impact of lipids, lipid oxidation, and inflammation on AMD, and the potential role of miRNAs on lipid metabolism in the RPE. **Experimental Eye Research**, v. 181, p. 346–355, 2019.

KADONOSONO, K. et al. Expression of matrix metalloproteinase-7 in choroidal neovascular membranes in age-related macular degeneration. **American Journal of Ophthalmology**, v. 28, n. 3, p. 382–384, 1999.

KANNAN, R.; SREEKUMAR, P. G.; HINTON, D. R. Alpha Crystallins in the Retinal Pigment Epithelium and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Age-Related Macular Degeneration. v. 1860, n. 100, p. 258–268, 2016.

KARTHIKKEYAN, G. et al. Human Optic Nerve: An Enhanced Proteomic Expression Profile. **OMICS: A Journal of Integrative Biology**, v. 22, n. 10, p. 642–652, 2018.

KASIM, J. K. et al. Three Decades of Amyloid Beta Synthesis: Challenges and Advances. **Frontiers in Chemistry**, v. 7, n. July, p. 1–25, 2019.

KASSOFF, A. et al. 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**, v. 119, n. 10, p. 1417–1436, 2001.

KATAYAMA, B. Y. N. Y. et al. Comparison of acetazolamide, brimonidine, and anterior chamber paracentesis for ocular hypertension control after initial intravitreal bevacizumab injection: A randomized clinical trial. **Journal of Glaucoma**, 2014.

KAUPPINEN, A. et al. Inflammation and its role in age-related macular degeneration. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 9, p. 1765–1786, 2016.

KEFAUVER, S. C. Emixustat hydrochloride: Retinoid isomerohydrolase (RPE65) inhibitor treatment of age-related macular degeneration. **Drugs of the Future**, 2014.

KELLY, B. D. et al. Cell Type-Specific Regulation of Angiogenic Growth Factor Gene Expression and Induction of Angiogenesis in Nonischemic Tissue by a Constitutively Active Form of Hypoxia-Inducible Factor 1. **Circulation Research**, v. 93, n. 11, p. 1074–1081, 2003.

KUIPER, J. J. W. et al. An Ocular Protein Triad Can Classify Four Complex Retinal Diseases. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1–9, 2017.

KURIHARA, T. et al. Targeted deletion of Vegfa in adult mice induces vision loss. **Journal of Clinical Investigation**, 2012.

LAUDE, A. et al. Intravitreal therapy for neovascular age-related macular degeneration and inter-individual variations in vitreous pharmacokinetics. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 29, n. 6, p. 466–475, 2010.

LAUWEN, S. et al. Omics biomarkers in ophthalmology. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 58, n. 6, p. BIO88–BIO98, 2017.

LECHNER, M.; WOJNAR, P.; REDL, B. Human tear lipocalin acts as an oxidative-stress-induced scavenger of potentially harmful lipid peroxidation products in a cell culture system. v. 356, p. 129–135, 2001.

LEE, C. S. et al. Associations between recent and established ophthalmic conditions and risk of Alzheimer's disease. **Alzheimer's and Dementia**, 2019.

LEVY, O. et al. Apolipoprotein E promotes subretinal mononuclear phagocyte survival and chronic inflammation in age-related macular degeneration. **EMBO Molecular Medicine**, v. 7, n. 2, p. 211–226, 2015.

LIMA E SILVA, R. et al. The SDF-1/CXCR4 ligand/receptor pair is an important contributor to several types of ocular neovascularization. **The FASEB Journal**, v. 21, n. 12, p. 3219–3230, 2007.

LINDBLOM, P. et al. Endothelial PDGF-B retention is required for proper investment of pericytes in the microvessel wall. p. 1835–1840, 2003.

LIU, B. et al. Complement component C5a Promotes Expression of IL-22 and IL-17 from Human T cells and its Implication in Age-related Macular Degeneration. **Journal of Translational Medicine**, v. 9, n. 1, 2011.

LONG, D. et al. VEGF/VEGFR2 blockade does not cause retinal atrophy in AMD-relevant models. **JCI Insight**, v. 3, n. 10, p. 1–14, 2018.

LU, F. et al. Association Between Complement Factor C2/C3/CFB/CFH Polymorphisms and Age-Related Macular Degeneration: A Meta-Analysis. **Genetic Testing and Molecular Biomarkers**, v. 22, n. 9, p. 526–540, 2018.

MA, B. et al. β A3/A1-Crystallin controls anoikis-mediated cell death in astrocytes by

modulating PI3K/AKT/mTOR and ERK survival pathways through the PKD/Bit1-signaling axis. **Cell Death and Disease**, v. 2, n. 10, p. 1–12, 2011.

MANTON, K. G. The global impact of noncommunicable diseases: estimates and projections. **World health statistics quarterly. Rapport trimestriel de statistiques sanitaires mondiales**, v. 41, n. 3–4, p. 255–66, 1988.

MARKIEWSKI, M. M.; LAMBRIS, J. D. The role of complement in inflammatory diseases from behind the scenes into the spotlight. **American Journal of Pathology**, v. 171, p. 715–727, 2007.

MATHALONE, N.; ARODI-GOLAN, A.; SAR, S. Sustained elevation of intraocular pressure after intravitreal injections of bevacizumab in eyes with neovascular age-related macular degeneration. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol (2012)**, v. 250, p. 1435–1440, 2012.

MISHUR, R. J.; REA, S. L. **Applications of mass spectrometry to metabolomics and metabonomics: Detection of biomarkers of aging and of age-related diseases** *Mass Spectrometry Reviews*, 2012.

MORENO-GARCÍA, A. et al. An overview of the role of lipofuscin in age-related neurodegeneration. **Frontiers in Neuroscience**, v. 12, n. JUL, p. 1–13, 2018.

MOROHOSHI, K. et al. Autoimmunity in retinal degeneration: Autoimmune retinopathy and age-related macular degeneration. **Journal of Autoimmunity**, v. 33, p. 247–254, 2009.

MOROHOSHI, K. et al. Serum autoantibody biomarkers for age-related macular degeneration and possible regulators of neovascularization. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 92, n. 1, p. 64–73, 2012a.

MOROHOSHI, K. et al. Identification of anti-retinal antibodies in patients with age-related macular degeneration. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 93, p.

193–199, 2012b.

MROWICKA, M. et al. Analysis of antioxidative factors related to AMD risk development in the polish patients. **Acta Ophthalmologica**, v. 95, n. 5, p. 530–536, 2017.

MURTHY, K. R. et al. A Comprehensive Proteomics Analysis of the Human Iris Tissue: Ready to Embrace Postgenomics Precision Medicine in Ophthalmology? **OMICS: A Journal of Integrative Biology**, v. 20, n. 9, p. 510–519, 2016.

NEWSOME, D. A. et al. Detection of specific extracellular matrix molecules in drusen, Bruch's membrane, and ciliary body. **American Journal of Ophthalmology**, v. 104, p. 373–381, 1987.

NG, D. S. et al. Elevated angiopoietin 2 in aqueous of patients with neovascular age related macular degeneration correlates with disease severity at presentation. **Scientific Reports**, v. 7, n. March, p. 1–6, 2017.

NITA, M. et al. Age-related macular degeneration and changes in the extracellular matrix. **Medical Science Monitor**, v. 20, p. 1003–1016, 2014.

NOWAK, J. Z. Age-related macular degeneration (AMD): pathogenesis and therapy. **Pharmacological Reports**, v. 58, p. 353–363, 2006.

O'REILLY, M. S. Angiostatin: An endogenous inhibitor of angiogenesis and of tumor growth. **Cell**, v. 88, p. 273–294, 1997.

OHNO-MATSUI, K. **Parallel findings in age-related macular degeneration and Alzheimer's disease** *Progress in Retinal and Eye Research*, 2011.

PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, v. 405, p. 837–846, 2000.

PARK, D. H.; CONNOR, K. M.; LAMBRIS, J. D. The Challenges and Promise of Complement Therapeutics for Ocular Diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. May, p. 1–14, 2019.

PETITCLERC, E. et al. New Functions for Non-collagenous Domains of Human Collagen Type IV. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 11, p. 8051–8061, 2000.

PONGSACHAREONNONT, P. et al. Neovascular age-related macular degeneration: Intraocular inflammatory cytokines in the poor responder to ranibizumab treatment. **Clinical Ophthalmology**, v. 12, p. 1877–1885, 2018.

PRATIMA, N. A.; GADIKAR, R. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry and Its Applications: A Brief Review. **Archives of Organic and Inorganic Chemical Sciences**, v. 1, n. 1, p. 26–34, 2018.

QI, J. H. et al. A novel function for tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3): Inhibition of angiogenesis by blockage of VEGF binding to VEGF receptor-2. **Nature Medicine**, v. 9, n. 4, p. 407–415, 2003.

R., A. et al. Incidence of late-stage age-related macular degeneration in American whites: Systematic review and meta-analysis. **American Journal of Ophthalmology**, p. 83–93, 2015.

REGILLO, B. Y. C. MACULA FEATURE STORY MARINA and ANCHOR: An Overview of the Safety Data. **Retina**, n. April, p. 70–73, 2008.

REZAR-DREINDL, S. et al. The intraocular cytokine profile and therapeutic response in persistent neovascular age-related macular degeneration. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 57, n. 10, p. 4144–4150, 2016.

REZAR-DREINDL, S. et al. Effect of intravitreal dexamethasone implant on intraocular cytokines and chemokines in eyes with retinal vein occlusion. **Acta**

Ophthalmologica, v. 95, n. 2, p. e119–e127, 2017.

RICKLIN, D. et al. **Complement component C3 – The “Swiss Army Knife” of innate immunity and host defense** **Immunological Reviews**, 2016.

RINSKY, B. et al. Characterizing the effect of supplements on the phenotype of cultured macrophages from patients with age-related macular degeneration. **Molecular vision**, v. 23, n. February, p. 889–899, 2017.

ROHOWETZ, L. J.; KRAUS, J. G.; KOULEN, P. Reactive oxygen species-mediated damage of retinal neurons: Drug development targets for therapies of chronic neurodegeneration of the retina. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 11, 2018.

ROODHOOFT, J. M. J. Leading causes of blindness worldwide. **Bulletin de la Societe belge d’ophtalmologie**, n. 283, p. 19–25, 2002.

ROSENFELD, P. J. et al. Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. **N England Journal Medicine**, v. 355, n. 14, p. 1419–1431, 2006.

RUBIO, D. M. et al. Defining Translational Research: Implications for Training. **Acad Med**, v. 85, n. 3, p. 470–475, 2010.

RUDNICKA, A. R. et al. Age and gender variations in age-related macular degeneration prevalence in populations of European ancestry: A meta-analysis. **Ophthalmology**, v. 119, n. 3, p. 571–580, 2012.

RUDOLF, M.; CURCIO, C. A. Esterified cholesterol is highly localized to Bruch’s membrane, as revealed by lipid histochemistry in whole mounts of human choroid. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 57, n. 8, p. 731–739, 2009.

SCHMID, M. K. et al. Efficacy and adverse events of aflibercept, ranibizumab and bevacizumab in age-related macular degeneration: A trade-off analysis. **British**

Journal of Ophthalmology, p. 1–6, 2014.

SCHRAMM, E. C. et al. Genetic variants in the complement system predisposing to age-related macular degeneration: A review. **Molecular Immunology**, v. 61, n. 2, p. 118–125, 2014.

SCHUBERT, O. T. et al. Quantitative proteomics: Challenges and opportunities in basic and applied research. **Nature Protocols**, v. 12, n. 7, p. 1289–1294, 2017.

SEMENZA, G. L. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. v. 88, p. 1474–1480, 2000.

SHAW, P. X. et al. Complement factor H genotypes impact risk of age-related macular degeneration by interaction with oxidized phospholipids. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 34, p. 13757–13762, 2012.

SHIN, H. J. et al. Intravitreal Anti – Vascular Endothelial Growth Factor Therapy and Retinal Nerve Fiber Layer Loss in Eyes. **IOVS**, v. 57, n. 4, p. 1798–1806, 2017.

SINHA, D. et al. β A3/A1-crystallin in astroglial cells regulates retinal vascular remodeling during development. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 37, n. 1, p. 85–95, 2008.

SIQUEIRA, R. C. Pesquisa translacional na oftalmologia: O caminho para a medicina personalizada. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 71, n. 5, p. 338–342, 2012.

SPAIDE, R. F.; SORENSON, J.; MARANAN, L. Photodynamic therapy with verteporfin combined with intravitreal injection of triamcinolone acetonide for choroidal neovascularization. **Retina**, v. 112, n. 6, p. 301–304, 2005.

STANTON, C. M.; WRIGHT, A. F. Inflammatory biomarkers for AMD. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, p. 251–257, 2014.

STEIN-STREILEIN, J. **Immune regulation and the eye***Trends in Immunology*, 2008.

STEWART, M. Individualized Treatment of Neovascular Age-Related Macular Degeneration: What are Patients Gaining? Or Losing? **Journal of Clinical Medicine**, v. 4, n. 5, p. 1079–1101, 2015.

STREILEIN, J. W. Immunological non-responsiveness and acquisition of tolerance in relation to immune privilege in the eye. **Eye (Basingstoke)**, v. 9, p. 236–240, 1995.

STREILEIN, J. W. Ocular immune privilege: Therapeutic opportunities from an experiment of nature. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 11, p. 879–889, 2003.

STRIMBU, K.; TAVEL, J. A. What are Biomarkers? **Curr Opin HIV AIDS**, v. 5, n. 6, p. 463–466, 2010.

TAN, A. C. S. et al. Calcified nodules in retinal drusen are associated with disease progression in age-related macular degeneration. **Science Translational Medicine**, v. 10, n. 466, p. eaat4544, 2018.

TAYLOR, A. W. Ocular immunosuppressive microenvironment. **Chemical Immunology and Allergy**, v. 92, p. 71–95, 2007.

THOMPSON, R. B. et al. Identification of hydroxyapatite spherules provides new insight into subretinal pigment epithelial deposit formation in the aging eye. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, p. 1565–1570, 2015.

TOKARZ, P.; KAARNIRANTA, K.; BLASIAK, J. Role of antioxidant enzymes and small molecular weight antioxidants in the pathogenesis of age-related macular degeneration (AMD). **Biogerontology**, v. 14, n. 5, p. 461–482, 2013.

TSUI, Y.; CHIANG, C.; TSAI, Y. Paracentesis before intravitreal injection of bevacizumab. **Canadian Journal of Ophthalmology**, v. 43, n. 2, p. 239, 2008.

TYL HEWITT, A.; NAKAZAWA, K.; NEWSOME, D. A. Analysis of newly synthesized Bruch's membrane proteoglycans. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 30, p. 478–486, 1989.

UMEDA, N. et al. Suppression and Regression of Choroidal Neovascularization by Systemic Administration of an 5beta1 Integrin Antagonist. **Molecular Pharmacology**, 2006.

VALAPALA, M. et al. Lysosomal-mediated waste clearance in retinal pigment epithelial cells is regulated by CRYBA1/ β 3/A1-crystallin via V-ATPase-MTORC1 signaling. **Autophagy**, v. 10, n. 3, p. 480–496, 2014a.

VALAPALA, M. et al. Increased Lipocalin-2 in the retinal pigment epithelium of Cryba1 cKO mice is associated with a chronic inflammatory response. **Aging Cell**, v. 13, n. 6, p. 1091–1094, 2014b.

VAN LEEUWEN, E. M. et al. A new perspective on lipid research in age-related macular degeneration. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 67, n. January, p. 56–86, 2018.

VAN WEEL, C.; SCHELLEVIS, F. G. Comorbidity and guidelines: Conflicting interests. **Lancet**, v. 367, n. 9510, p. 550–551, 2006.

VELEZ, G. et al. Personalized Proteomics for Precision Health: Identifying Biomarkers of Vitreoretinal Disease. **Translational Vision Science & Technology**, v. 7, n. 5, p. 12, 2018.

VOLZ, C.; PAULY, D. Antibody therapies and their challenges in the treatment of age-related macular degeneration. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 95, p. 158–172, 2015.

WANG, L. et al. Abundant lipid and protein components of drusen. **PLoS ONE**, v. 5,

n. 4, p. 1–12, 2010.

WEINREB, R. N.; AUNG, T.; MEDEIROS, F. A. The Pathophysiology and Treatment of Glaucoma: A Review on the topics open-angle glaucoma and angle-closure glaucoma. From the 4334 HHS Public Access. **Jama**, v. 311, n. 18, p. 1901–1911, 2014.

WONG, W. L. et al. Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: A systematic review and meta-analysis. **The Lancet Global Health**, v. 2, n. 2, p. e106–e116, 2014.

YAMAMOTO, I.; PORTINHO. Sistema Complemento: Ativação, Regulação E Deficiências Congênitas E Adquiridas. **Associação Brasileira de Medicina**, v. 47, n. 1, p. 41–51, 2001.

YAO, J. et al. Proteomic analysis of the aqueous humor in patients with wet age-related macular degeneration. **Proteomics - Clinical Applications**, p. 550–560, 2013.

YATES, J. R. Recent technical advances in proteomics [version 1 ; peer review : 2 approved] Referee Status : **F1000 Research**, v. 8, p. 1–8, 2019.

YOSHIDA, T. et al. The potential role of amyloid [beta] in the pathogenesis of age-related macul ... **Library**, v. 115, n. 10, p. 2793–2800, 2005.

YUAN, X. et al. Quantitative Proteomics: Comparison of the Macular Bruch Membrane/Choroid Complex from Age-related Macular Degeneration and Normal Eyes. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 9, n. 6, p. 1031–1046, 2010.

ZARBIN, M. A. **Current Concepts in the Pathogenesis of Age-Related Macular Degeneration** **Archives of Ophthalmology**, 2004.

ZARBIN, M. A.; ROSENFELD, P. J. Pathway-based therapies for age-related

macular degeneration: An integrated survey of emerging treatment alternatives. **Retina**, v. 30, n. 9, p. 1350–1367, 2010.

ZEITZ, O.; JOUSSEN, A. M. Eye Drops Instead of Intravitreal Injections? the Dream of Treating Macular Diseases by Topically Administered Drugs. **Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde**, 2017.

ZHAO, L.; WONG, W. T. Microglia in the Outer Retina and their Relevance to Pathogenesis of Age-Related Macular Degeneration (AMD) Wenxin. **Adv Exp Med Biol**, v. 723, p. 37–42, 2012.

ZHOU, H. et al. Association between sunlight exposure and risk of age-related macular degeneration: A meta-analysis. **BMC Ophthalmology**, v. 18, n. 331, p. 1–8, 2018.

ZHOU, R.; CASPI, R. R. Ocular immune privilege. **F1000 Biology Report**, v. 2, n. 10, 2010.

9. MATERIAL COMPLEMENTAR

ANEXO A: Parecer da Sociedade Brasileira de Retina e Vítreo (SBRV) sobre paracentese de câmara anterior.



São Paulo, 19 de abril de 2017.

Prezado Dr. Bruno Nobre Lins Coronado,

A paracentese estéril de câmara anterior faz parte do procedimento e pode ser necessária de acordo com a avaliação do cirurgião responsável pela administração do tratamento quimioterápico intraocular via intravítrea com antiangiogênico (Anti-VEGF).

Atenciosamente,

Acácio Muralha Neto

Presidente, SBRV

ANEXO B: Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Oftalmológico de Brasília/Plataforma Brasil, com CAAE 64921317.1.0000.5667.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Perfil molecular de pacientes com Degeneração Macular Relacionada à Idade do tipo Neovascular (DMRI_n) tolerantes ao anti-VEGF.

Pesquisador: BRUNO NOBRE LINS CORONADO

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 64921317.1.0000.5667

Instituição Proponente: CBV CENTRO BRASILEIRO DA VISAO LTDA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Envio de Relatório Parcial

Detalhe:

Justificativa: PREZADOS,

Data do Envio: 13/03/2019

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.268.052

Apresentação da Notificação:

Apresentação do relatório parcial.

Objetivo da Notificação:

Relatório parcial.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não se aplica.

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

Relatórios satisfatório, foram apresentados os dados quantitativos e qualitativos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não se aplica.

Endereço: Av. L2 Sul Quadra: 307 Módulo: G

Bairro: ASA SUL

CEP: 70.200-670

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3442-4136

E-mail: cephob@hobr.com.br



HOSPITAL OFTALMOLÓGICO
DE BRASÍLIA - HOB



Continuação do Parecer: 2.288.043

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Recurso do Parecer	recurso.pdf	07/08/2017 10:44:04		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	07/08/2017 10:41:25	BRUNO NOBRE LINS CORONADO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoDetalhado.docx	07/08/2017 10:31:32	BRUNO NOBRE LINS CORONADO	Aceito
Cronograma	ATUALIZACAOCronograma.docx	07/08/2017 10:30:32	BRUNO NOBRE LINS CORONADO	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	RecursoParecerCEPHOB.docx	07/08/2017 10:27:12	BRUNO NOBRE LINS CORONADO	Aceito
Recurso do Parecer	recurso.pdf	24/05/2017 19:39:26		Aceito
Outros	ParecerSBRV.pdf	24/05/2017 19:38:55	BRUNO NOBRE LINS CORONADO	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_856596.pdf	14/02/2017 08:03:22		Aceito
Orçamento	OrçamentoESPECTROMETRIA.docx	14/02/2017 07:59:12	BRUNO NOBRE LINS CORONADO	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	DeclaracaoMANUSEIO.pdf	14/02/2017 07:58:00	BRUNO NOBRE LINS CORONADO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DeclaracaoINFRAESTRUTURA.pdf	14/02/2017 07:55:36	BRUNO NOBRE LINS CORONADO	Aceito
Folha de Rosto	folhaDERosto.pdf	14/02/2017 07:49:09	BRUNO NOBRE LINS CORONADO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BRASILIA, 20 de Setembro de 2017

Assinado por:
DALVANI BATISTA TELES DA SILVA
(Coordenador)

Endereço: Av. L2 Sul Quadra: 307 Módulo: G
Bairro: ASA SUL CEP: 70.200-670
UF: DF Município: BRASILIA
Telefone: (61)3442-4136 E-mail: cephot@hobr.com.br

Página 06 de 06

ANEXO C: Modelo de tabela de acuidade visual (Snellen). Adaptado de Kaiser, 2009.

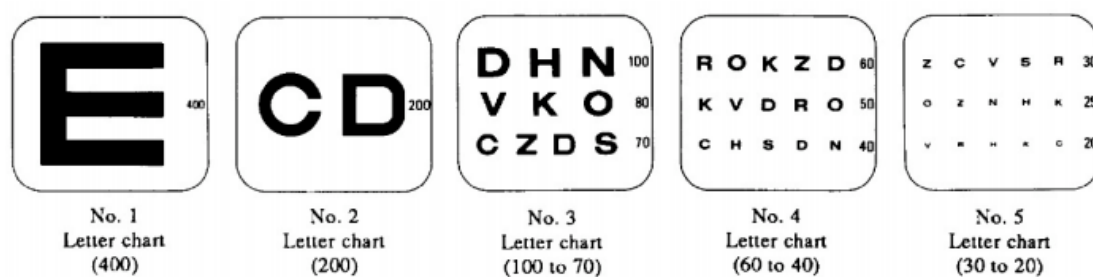


FIGURE 1

Snellen projection charts used by the Nikon Chart Projector NP-3S.

