

Associação do polimorfismo *Y402H* do gene *CFH* com a resposta terapêutica ao Ranibizumabe em pacientes portadores de degeneração macular relacionada à idade neovascular

CFH Y402H polymorphism and response to intravitreal Ranibizumab in brazilian patients with neovascular age-related macular degeneration

CARLOS EDUARDO VELOSO¹; LUCIANA NEGRÃO FROTA DE ALMEIDA¹; MÁRCIO BITTAR NEHEMY¹

R E S U M O

Objetivo: investigar a associação entre polimorfismo do gene *CFH* e a resposta terapêutica ao ranibizumabe na degeneração macular relacionada à idade (DMRI) neovascular. **Métodos:** noventa e cinco pacientes foram submetidos à genotipagem para identificação do polimorfismo *rs1061170* (*Y402H*) do gene *CFH*. Pacientes portadores de DMRI neovascular receberam inicialmente três injeções intravítreas de ranibizumabe com intervalo mensal entre elas. A partir de então, foram retratados de acordo com a necessidade. Acuidade visual (AV) e espessura macular central (EMC) foram medidas antes e 1, 3, 6 e 12 meses após o início do tratamento. **Resultados:** para pacientes portadores dos genótipos *TT* e *TC*, a análise pareada da AV mostrou melhora estatisticamente significativa quando os dados obtidos em todas as visitas foram comparados com aqueles obtidos antes do início do tratamento. Para pacientes homocigotos para o alelo de risco (*CC*), não houve diferença estatisticamente significativa quando a AV obtida nas visitas 1, 3, 6 e 12 foi comparada com aquela obtida antes do início do tratamento. Para todos os genótipos, a análise pareada da EMC mostrou melhora estatisticamente significativa em todas as avaliações. **Conclusão:** pacientes portadores do genótipo *CC* apresentaram pior resposta funcional em longo prazo após o tratamento com ranibizumabe intravítreo.

Descritores: Degeneração Macular. Genética. Polimorfismo Genético. Injeções Intravítreas. Retina.

INTRODUÇÃO

A degeneração macular relacionada à idade (DMRI) é uma doença coriorretiniana progressiva que acomete a mácula, sendo considerada a principal causa de cegueira legal em países desenvolvidos e responsável por uma baixa qualidade de vida na população afetada¹⁻³. A DMRI neovascular é caracterizada pelo crescimento de uma membrana neovascular coroideana que cresce abaixo do epitélio pigmentado da retina (EPR) ou entre o EPR e a retina neurosensorial, podendo causar hemorragia ou extravasamento de fluido, com subsequente desenvolvimento de tecido cicatricial. Embora a patogênese da DMRI não seja completamente conhecida, vários estudos têm mostrado que idade avançada, tabagismo e predisposição genética são os principais determinantes da doença. Fatores de risco cardiovasculares (hipertensão arterial sistêmica e hiperlipidemia) são considerados possíveis contribuintes para o desenvolvimento da doença⁴⁻⁶. Os genes associados à DMRI podem interagir com outros genes, assim como com fatores de risco não-genéticos para produzir os diferentes quadros clínicos da doença. Estudos recentes mostraram que alguns polimorfismos

genéticos envolvendo um único nucleotídeo (single nucleotide polymorphisms – SNP) estão, de fato, associados ao desenvolvimento da DMRI. Uma alteração no gene *fator de complemento H* (*CFH*), localizado no cromossomo 1q32, representa um dos polimorfismos genéticos mais estudados na DMRI. Este polimorfismo (*rs1061170*, também denominado *T1277C* ou *Y402H*) representa a substituição de timina por citosina no nucleotídeo 1277 e provoca a consequente troca de tirosina por histidina na posição 402 da proteína *CFH*. Esta proteína atua inibindo as vias clássica e alternativa do sistema complemento. Assim, sua ausência ou baixa atividade poderia ativar este sistema, servindo como um estímulo inflamatório para o desenvolvimento da DMRI^{7,8}. Estudos recentes conduzidos por nosso grupo demonstraram que os polimorfismos *Y402H* (*rs1061170*) do gene *CFH*, *A69S* (*rs10490924*) do gene *LOC387715* e *C674T* (*rs1413711*) do gene *VEGF* estão associados a um maior risco de desenvolvimento de DMRI na população brasileira^{9,10}.

Diferenças interindividuais na resposta terapêutica são parcialmente atribuídas às variações genéticas, o que levou diversos grupos a conduzir estudos farmacogenéticos com a esperança de que, no futuro, o

1. Departamento de Oftalmologia – Universidade Federal de Minas Gerais – Brasil. Instituto da Visão – Belo Horizonte – MG.

tratamento da DMRI neovascular seja individualizado. Demonstrou-se que o efeito dos genótipos na resposta ao uso oral de suplementos nutricionais, apresenta uma associação estatisticamente significativa¹¹. Outros trabalhos avaliaram a relação entre os genótipos do gene *CFH* e a resposta à terapia fotodinâmica (photodynamictherapy – PDT), com resultados controversos¹²⁻¹⁶.

A associação entre os polimorfismos genéticos e a resposta aos agentes antifator de crescimento do endotélio vascular – VEGF (bevacizumabe e ranibizumabe) em casos de DMRI neovascular também tem sido estudada¹⁷⁻²⁷. A injeção intravítrea destas drogas antiangiogênicas foi o primeiro tratamento que resultou em melhora consistente da acuidade visual (AV) em um grande número de pacientes, representando um avanço marcante no tratamento da DMRI neovascular. Entretanto, a resposta terapêutica aos agentes anti-VEGF apresenta grandes variações na população afetada e fatores genéticos têm sido considerados parcialmente responsáveis⁶. Vários estudos avaliaram a associação entre os genótipos do gene *CFH* e a resposta terapêutica aos antiangiogênicos, sendo que alguns deles demonstraram uma relação farmacogenética positiva¹⁷⁻²⁶.

O objetivo deste trabalho é investigar, pela primeira vez na população brasileira, a associação entre o polimorfismo *rs1061170* (Y402H) do gene *CFH* e a resposta à terapia antiangiogênica com ranibizumabe em casos de DMRI neovascular.

MÉTODOS

Este estudo é parte de uma avaliação retrospectiva de dados prospectivamente obtidos de pacientes portadores de DMRI, tendo incluído a identificação do polimorfismo *rs1061170* (Y402H) do gene *CFH* e o estabelecimento de sua relação com o desenvolvimento da doença, bem como, com a resposta terapêutica aos antiangiogênicos. Os pacientes selecionados para este estudo foram informados a respeito de sua natureza e assinaram termo de consentimento baseado nas orientações da Declaração de Helsinki. O projeto foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e do Instituto da Visão.

Foram avaliados, para inclusão neste estudo, todos os pacientes portadores de DMRI, examinados entre 2008 e 2012, no Hospital São Geraldo – UFMG e no Instituto da Visão. Dentro de uma rotina usual de avaliação e tratamento, os pacientes foram inicialmente submetidos a exame oftalmológico completo, incluindo biomicroscopia, retinografia, angiografias e tomografia de coerência óptica (OCT). A angiografia com indocianina verde foi realizada em casos suspeitos de apresentarem vasculopatia polipoidal da coroide ou proliferação angiomasiosa da retina.

Os pacientes portadores de DMRI neovascular que concordaram com sua participação no estudo tiveram uma amostra de sangue coletada para a análise dos polimorfismos genéticos relacionados à doença.

Os pacientes selecionados foram submetidos a um protocolo de tratamento que incluiu a realização de três injeções intravítreas consecutivas de ranibizumabe 0,5mg/0,05mL (Lucentis®; Novartis, Basel, Suíça), com intervalo mensal entre elas. Após a terceira dose, instituiu-se um protocolo *pro re nata*, de modo que o intervalo entre as injeções poderia variar de acordo com a necessidade. As aplicações foram realizadas com o paciente localizado no bloco operatório, técnica operatória asséptica, incluindo o uso tópico profilático de iodopovidine 5%. Em pacientes fâcicos, as injeções foram realizadas a 4mm do limbo temporal e inferior e, em pseudofâcicos, a 3,5mm. Os critérios de inclusão foram: a) idade acima de 50 anos; b) diagnóstico de DMRI neovascular confirmado pelos exames complementares; c) acuidade visual melhor ou igual a 20/400 (em caso de DMRI neovascular bilateral em que ambos os olhos preencheram os critérios de inclusão, apenas o olho com pior AV foi incluído); d) pacientes que receberam tratamento inicial com três doses de ranibizumabe, com intervalo mensal entre elas e e) período de seguimento de pelo menos 12 meses. Os critérios de exclusão foram: a) tratamento prévio para DMRI neovascular; b) tratamento combinado durante o período estudado; c) casos de vasculopatia polipoidal da coroide; d) realização prévia de vitrectomia posterior e e) outras doenças oculares concomitantes capazes de afetar a AV. Os critérios de retratamento incluíram: a) persistência ou aumento de líquido intra ou sub-retiniano; b) aumento de descolamento do EPR; c) piora de pelo menos uma linha de AV e d) aparecimento de hemorragia sub-retiniana. Em todos os pacientes cujo retratamento foi necessário, também foram submetidos ao ranibizumabe intravítreo.

A resposta ao tratamento foi baseada na AV e na EMC. Os pacientes foram reavaliados mensalmente durante os primeiros três meses e a cada quatro a seis semanas nos meses subsequentes. A melhor AV corrigida e a EMC foram medidas na primeira consulta e em todas as visitas realizadas após o início do tratamento. A AV foi obtida através do exame refracional, utilizando-se a tabela de *Snellen*, de forma padronizada para todos os pacientes. Para fins estatísticos, a AV foi convertida para os valores do logaritmo do mínimo ângulo de resolução – logMAR. Para a obtenção da EMC, foi utilizada tomografia de coerência óptica de domínio espectral (Spectralis OCT® [Heidelberg Engineering, Heidelberg, Alemanha]) sendo que a medida foi baseada no subcampo central de 1mm do mapa de espessura fornecido pelo tomógrafo. A segmentação automática dos limites da retina foi utilizada, mas, em casos de erro, a correção manual foi empregada. As medidas da AV, da EMC e o tratamento com injeção intravítrea foram realizados por diferentes pesquisadores.

Genotipagem

Inicialmente, amostras de sangue (10mL) foram obtidas através da punção venosa realizada previamente ao exame de angiofluoresceinografia dos pacientes. O material foi imediatamente imerso em um tubo estéril contendo EDTA e mantido em temperatura ambiente. As amostras foram, em seguida, enviadas ao Laboratório de Genética da Faculdade de Medicina da UFMG. A extração do ácido desoxirribonucléico (DNA) das amostras de sangue foi realizada através de método já padronizado²⁸.

A genotipagem foi realizada através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, que envolve a utilização de um termociclador. Para sua realização, foram utilizados insumos da *Applied Biosystems: TaqMan® SNP Genotyping Assays*. As sondas utilizadas foram exclusivas para o polimorfismo estudado: *rs1061170* (Y402H) do gene *CFH*. Cada sonda possuía dois marcadores específicos para cada alelo do polimorfismo, chamados fluoróforos. O protocolo empregado para a realização da PCR foi o sugerido pelas instruções de uso do *TaqMan® Genotyping Master Mix (Applied Biosystems)*, como mostrado a seguir: 3,5µL do tampão, 0,1µL da sonda, 3,4µL de água deionizada, 1,0µL de DNA (50ng/µL), formando um volume total de 8µL. Este produto foi, então, colocado no aparelho de PCR em tempo real. As condições para realização da PCR foram: um ciclo de dez minutos a 95°C (para ativação enzimática); 50 ciclos de 15 segundos a 95°C (para a desnaturação) e 60 segundos a 60°C (para hibridização ou anelamento e extensão). Para controle de qualidade de cada placa de PCR, 10% das amostras testadas foram novamente analisadas na mesma placa. A aquisição dos dados e análise final da reação foi feita por um software específico para a discriminação alélica (*Stratagene Mx3005 – MxPro QPCR- Software, 2007*). A análise foi realizada de acordo com a proximidade de cada amostra em relação ao eixo de fluorescência.

Análise estatística

Os resultados descritivos foram obtidos utilizando frequências e porcentagens para as características das diversas variáveis categóricas, e medidas de tendência central (média e mediana), assim como medidas de dispersão

(desvio-padrão), para as variáveis contínuas. Significância estatística foi considerada para um valor $p < 0,05$.

As comparações entre uma variável quantitativa e uma variável qualitativa com duas categorias foram realizadas por meio do teste *t* de *Student*, quando a suposição de normalidade foi atendida (verificada pelo teste de Hosmer-Lemeshow) e *Mann-Whitney*, caso contrário. As variáveis quantitativas foram comparadas com três categorias a partir do teste F (ANOVA) se a suposição de normalidade foi atendida, e *Kruskal-Wallis*, caso contrário.

As comparações de proporções entre duas variáveis qualitativas binárias foram realizadas por meio do teste Qui-Quadrado com correção *Yates*. Na presença de pelo menos uma frequência esperada menor que cinco, foi utilizado o teste exato de *Fisher*. As comparações de proporções com pelo menos uma das variáveis com mais de duas categorias foram realizadas por meio do teste Qui-Quadrado de *Pearson*.

As comparações dos dados pareados (medidas de um mesmo paciente) foram realizadas por meio do teste *t* pareado quando a suposição de normalidade foi satisfeita e teste de *Wilcoxon*, caso contrário.

RESULTADOS

Um total de 601 olhos de 370 pacientes portadores de DMRI foi avaliado e 95 preencheram os critérios de inclusão. A média de idade dos 95 pacientes foi 73,9±8,5 anos (54-91 anos) e 56 (58,9%) eram mulheres. A AV média pré-tratamento foi 0,58±0,3logMAR e a EMC média pré-tratamento foi 342±90µm. AV, EMC e distribuição por sexo não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os três diferentes genótipos estudados (Tabela 1). No entanto, pacientes portadores do genótipo *TT* mostraram idade mais avançada que pacientes heterozigotos e homozigotos para o alelo de risco (*CC*) ($p=0,0248$). Reações adversas graves, locais ou sistêmicas, não foram observadas. Vinte e quatro pacientes (25,3%) eram homozigotos para o alelo de risco (*CC*), 52 (54,7%) possuíam ao menos um alelo de risco (*TC*) e 19 (20,0%) eram homozigotos para o alelo *T* (*TT*).

Tabela 1 - Achados pré-tratamento de acordo com os genótipos do gene *CFH*.

	Genótipos			Valor-p
	<i>TT</i> (n=19)	<i>TC</i> (n=52)	<i>CC</i> (n = 24)	
Idade*	78,4 ± 4,5 (78)	73,1 ± 9,8 (75)	72,0 ± 6,4 (72)	0,0248***
Masculino/Feminino	6 / 13	24 / 28	9 / 15	0,4993**
AV* - logMAR	0,63 ± 0,3 (0,8)	0,57 ± 0,3 (0,5)	0,53 ± 0,4 (0,4)	0,3788***
EMC* - µm	351 ± 89 (332)	326 ± 74 (305,5)	372 ± 116 (337)	0,3372***

AV: acuidade visual; EMC: espessura macular central; logMAR: logaritmo do mínimo ângulo de resolução;

*: média ± desvio-padrão (mediana);

** : teste do Qui-quadrado;

***: teste de *Kruskal-Wallis*

Para os 95 pacientes incluídos, análise pareada da AV mostrou melhora estatisticamente significativa quando a AV obtida nas visitas 1, 3, 6 e 12 foi comparada com aquela medida antes do início do tratamento (Tabela 2). Para pacientes portadores dos genótipos *TT* e *TC*, a análise pareada da AV também mostrou resultado estatisticamente significativo. Entretanto, pacientes homocigotos para o alelo de risco (*CC*) não apresentaram melhora estatisticamente significativa da AV quando os resultados obtidos nas visitas 1, 3, 6 e 12 foram comparados com o obtido na avaliação pré-tratamento.

Para o total de 95 pacientes e para cada um dos genótipos individualmente analisados, as comparações pareadas da EMC mostraram melhora estatisticamente significativa quando os valores medidos nas visitas 1, 3, 6 e

12 foram comparados com aqueles registrados antes do início do tratamento (Tabela 3).

O número médio de injeções intravítreas realizado entre o terceiro e o 12º mês de tratamento foi $1,6 \pm 0,8$ (mediana: 2,0) para pacientes homocigotos para o alelo *T*; $2,5 \pm 1,7$ (mediana: 2,0) para pacientes heterocigotos (*TC*) e $3,0 \pm 2,3$ (mediana: 3,0) para pacientes portadores do genótipo *CC* ($p=0,05$; teste de Kruskal-Wallis).

DISCUSSÃO

Atualmente, sabe-se que fatores genéticos desempenham um papel crucial na patogênese da DMRI. A influência desses fatores na resposta às diferentes modali-

Tabela 2 - Comparação da acuidade visual média, de acordo com os genótipos do gene *CFH*, entre o período pré-tratamento e as visitas 1, 3, 6 e 12 após o início do tratamento.

	Pré-tratamento	1 mês	3 meses	6 meses	12 meses
Genótipo <i>TT</i> (n = 19)					
AV* - logMAR	0,63 ± 0,3 (0,8)	0,57 ± 0,3 (0,6)	0,54 ± 0,3 (0,5)	0,46 ± 0,3 (0,4)	0,44 ± 0,3 (0,3)
Valor-p		0,03**	0,02**	0,02**	0,01**
Genótipo <i>TC</i> (n = 52)					
AV* - logMAR	0,57 ± 0,3 (0,5)	0,49 ± 0,3 (0,4)	0,46 ± 0,4 (0,4)	0,50 ± 0,4 (0,5)	0,57 ± 0,5 (0,5)
Valor-p		0,004**	0,0007**	0,009**	0,03**
Genótipo <i>CC</i> (n = 24)					
AV* - logMAR	0,53 ± 0,4 (0,4)	0,61 ± 0,7 (0,3)	0,57 ± 0,6 (0,25)	0,61 ± 0,7 (0,3)	0,52 ± 0,6 (0,3)
Valor-p		0,76**	0,38**	0,85**	0,45**
Genótipos <i>CC</i> , <i>CT</i> e <i>TT</i>					
AV* - logMAR	0,58 ± 0,3 (0,5)	0,54 ± 0,4 (0,4)	0,51 ± 0,4 (0,4)	0,52 ± 0,4 (0,4)	0,53 ± 0,5 (0,4)
Valor-p		0,0019	<0,0001	0,0023	0,0017

AV: acuidade visual; logMAR: logaritmo do mínimo ângulo de resolução;

*: média ± desvio-padrão (mediana);

** : teste de Wilcoxon.

Tabela 3 - Comparação da espessura macular central média, de acordo com os genótipos do gene *CFH* entre o período pré-tratamento e as visitas 1, 3, 6 e 12 após o início do tratamento.

	Pré-tratamento	1 mês	3 meses	6 meses	12 meses
Genótipo <i>TT</i> (n = 19)					
EMC* - µm	351 ± 89 (332)	298 ± 68 (315)	268 ± 64 (239)	272 ± 48 (272)	261 ± 52 (262)
Valor-p		0,0013**	0,0004**	0,0017**	0,0002**
Genótipo <i>TC</i> (n = 52)					
EMC* - µm	326 ± 74 (305,5)	286 ± 65 (286,5)	280 ± 63 (281)	287 ± 72 (275)	276 ± 69 (250,5)
Valor-p		<0,0001**	<0,0001**	0,0004**	<0,0001**
Genótipo <i>CC</i> (n = 24)					
EMC* - µm	372 ± 116 (337)	344 ± 100 (331)	324 ± 101 (299,5)	286 ± 110 (265)	298 ± 129 (263,5)
Valor-p		0,0126**	0,0053**	<0,0001**	0,0001**
Genótipos <i>CC</i> , <i>CT</i> e <i>TT</i>					
EMC* - µm	342 ± 90 (325)	303 ± 78 (296)	289 ± 77 (281)	284 ± 80 (281)	279 ± 86 (258)
Valor-p		<0,0001**	<0,0001**	<0,0001**	<0,0001**

EMC: espessura macular central;

*: média ± desvio-padrão (mediana);

** : teste de Wilcoxon.

dades de tratamento da DMRI, incluindo antioxidantes orais, PDT e agentes anti-VEGF, também tem sido estudada¹¹⁻²⁷. A maioria dos estudos tem avaliado o efeito do polimorfismo *rs1061170* (Y402H) do gene *CFH* na resposta terapêutica.

Estudos têm avaliado a relação entre o polimorfismo *rs1061170* (Y402H) do gene *CFH* e a resposta terapêutica aos agentes anti-VEGF bevacizumabe e ranibizumabe, com resultados distintos¹⁷⁻²⁶. Brantley *et al.* avaliaram pacientes submetidos a injeções intravítreas de bevacizumabe a cada seis semanas até que não houvesse mais sinais de neovascularização em atividade¹⁷. Verificaram que, após um período de seis meses, a AV foi pior em pacientes portadores do genótipo de risco (CC). Lee *et al.* investigaram se o polimorfismo *rs1061170* (Y402H) do gene *CFH* apresentava efeito no tratamento da DMRI neovascular com ranibizumabe¹⁸. Os pacientes foram submetidos a uma injeção intravítrea inicial e tratamento subsequente foi realizado de acordo com a necessidade. Não foi encontrada diferença na AV final após o tratamento com ranibizumabe entre os diferentes genótipos do *CFH*. No entanto, após nove meses de seguimento, pacientes homocigotos para o alelo de risco receberam aproximadamente uma injeção intravítrea a mais do que os demais. Nischler *et al.* avaliaram prospectivamente portadores de DMRI tratados com bevacizumabe intravítreo a cada seis semanas até que não houvesse mais sinais de neovascularização em atividade¹⁹. Homocigotos para o alelo de risco apresentaram pior resposta funcional ao tratamento. Para a EMC, todos os genótipos apresentaram melhora estatisticamente significativa. Imai *et al.* encontraram uma associação entre o polimorfismo *rs1061170* (Y402H) do gene *CFH* e a melhora da AV após uma injeção intravítrea de bevacizumabe²⁰. Heterocigotos apresentaram pior resposta com um e três meses após o tratamento. Smailhodzic *et al.* estudaram o polimorfismo *rs1061170* (Y402H) do gene *CFH* e encontraram uma piora significativa da AV após o tratamento com ranibizumabe em portadores dos seis alelos de risco dos genes *CFH*, *LOC387715* e *VEGF*²¹. Estes pacientes demonstraram uma perda média de dez letras na tabela do *Early Treatment Diabetic Retinopathy Study* (ETDRS) após o tratamento, enquanto os demais pacientes tiveram melhora na AV. Kloeckener-Gruissem *et al.* avaliaram a influência do polimorfismo *rs1061170* (Y402H) do gene *CFH* em pacientes submetidos inicialmente a uma injeção intravítrea de ranibizumabe²². Injeções subsequentes foram realizadas apenas se sinais de atividade estivessem presentes. Após 12 meses de seguimento, homocigotos para o alelo de risco (CC) apresentaram pior resposta terapêutica. McKibbin *et al.*²³ analisaram pacientes caucasianos tratados com ranibizumabe e acompanhados por 6 meses. Em relação ao polimorfismo *rs1061170* (Y402H) do gene *CFH*, verificou-se uma tendência a uma resposta mais favorável em portadores do genótipo de risco. Menghini *et al.* estudaram olhos tratados com ranibizumabe e verificaram que o genótipo *CT* estava associado a uma resposta funcional mais favorável ao final de 12 e 24 meses²⁴. Yamashiro *et*

al. também investigaram o papel do polimorfismo *rs1061170* (Y402H) do gene *CFH* em pacientes submetidos ao ranibizumabe intravítreo e seguidos por mais de um ano após o tratamento, não tendo sido observada associação entre o perfil genético e a resposta terapêutica²⁵. O maior estudo realizado até o momento envolveu participantes do *Comparison of AMD Treatment Trials* (CATT), que recrutou pacientes de 43 instituições diferentes. Os pacientes foram genotipados para os seguintes SNP: *rs1061170* (CFH), *rs10490924* (ARMS2), *rs11200638* (HTRA1) e *rs2230199* (C3). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os genótipos quanto à resposta terapêutica. Os alelos de risco não estiveram associados à AV final, à resposta anatômica ou ao número necessário de injeções intravítreas. A falta de associação ocorreu tanto para pacientes submetidos ao ranibizumabe quanto ao bevacizumabe e foram independentes do regime terapêutico empregado²⁶.

Em nosso estudo, os três genótipos estudados não apresentaram diferenças em relação às seguintes variáveis estudadas antes do início do tratamento: sexo, AV e EMC, evidenciando, portanto, que a amostra estava bem balanceada. Entretanto, pacientes homocigotos para o alelo *T* apresentaram idade mais avançada ($p=0,0248$), sugerindo que pacientes portadores do alelo de risco possam desenvolver a doença mais precocemente. No entanto, o tamanho da amostra não permite conclusões a respeito desta possível associação. Além disso, o presente estudo não foi desenhado com este objetivo, de forma que outros trabalhos devem ser conduzidos para investigar fatores de risco eventualmente associados à ocorrência mais precoce de DMRI. Portadores de vasculopatia polipoidal da coróide foram excluídos do nosso estudo, já que esta entidade clínica possui características diversas da DMRI típica, incluindo uma pior resposta às drogas anti-VEGF^{29,30}. Neste estudo, todos os pacientes foram submetidos a um protocolo que envolveu a aplicação de três injeções intravítreas, realizadas com intervalo mensal, seguida por tratamento de acordo com a necessidade, protocolo este previamente já sugerido³¹. Foi demonstrado, em nosso estudo, que pacientes portadores do genótipo *CC* apresentaram uma pior resposta funcional à terapia com ranibizumabe após um ano de seguimento.

Consideramos que análise da resposta terapêutica logo após o primeiro e o terceiro mês de tratamento é de especial importância, já que ela engloba pacientes que receberam o mesmo número de injeções, independentemente do perfil genético. Após esta dose de ataque inicial, torna-se mais difícil a análise dos resultados, já que um esquema de tratamento *pro re nata* passa a ser adotado. Neste caso, tanto a resposta terapêutica quanto o número de tratamentos precisam ser analisados, já que olhos que não respondem bem ao tratamento geralmente necessitam ser submetidos a um maior número de injeções. O presente estudo mostrou que o número médio de injeções intravítreas foi maior para os pacientes homocigotos para o alelo *C*. Como o tratamento empregado envolveu uma

dose inicial de três injeções consecutivas seguida por uma fase de manutenção, com a aplicação de injeções apenas quando necessário, os resultados podem não ser aplicáveis a pacientes tratados com injeções mensais fixas. É possível que, para pacientes tratados com regime fixo de injeções intravítreas mensais, mesmo os casos mais resistentes possam ter um prognóstico visual final semelhante ao de pacientes que inicialmente apresentam uma boa resposta terapêutica. Assim, a identificação de uma possível associação entre polimorfismos genéticos e a resposta ao tratamento pode ser útil, na medida em que é capaz de identificar indivíduos mais refratários ao tratamento e que, conseqüentemente, podem ser tratados através de injeções mensais regulares, ao invés de um esquema *pro re nata*. De outro modo, a avaliação do perfil genético pode ser capaz de identificar indivíduos cuja resposta terapêutica seja tão favorável, que o tratamento pode envolver um maior intervalo entre a aplicação das injeções intravítreas.

A maioria dos estudos farmacogenéticos envolvendo o tratamento da DMRI neovascular incluiu um número limitado de pacientes e utilizou diferentes esquemas terapêuticos, com drogas distintas. Isto pode explicar, ao menos em parte, as diferenças observadas entre os estudos. Deve-se enfatizar que este é o primeiro estudo farmacogenético em DMRI realizado no Brasil até o mo-

mento. Embora nosso estudo também apresente algumas limitações, incluindo o tamanho da amostra, foi demonstrado uma correlação significativa entre o polimorfismo estudado do gene *CFH* e a resposta ao tratamento da DMRI neovascular, sendo que o alelo de risco está associado a um pior prognóstico funcional. Este achado está de acordo com resultados de alguns dos estudos já publicados. Uma futura avaliação da interação entre fatores ambientais, polimorfismos do gene *CFH* e outros polimorfismos genéticos serão importantes para a melhor compreensão das diferentes respostas terapêuticas observadas nos portadores de DMRI.

É possível que alguns polimorfismos genéticos possam, de fato, influenciar o resultado da terapia antiangiogênica e levar, no futuro, a um tratamento personalizado da DMRI neovascular. Um maior entendimento dos fatores prognósticos antes do início do tratamento tem o potencial de reduzir efeitos colaterais, diminuir custos e melhorar a qualidade de vida dos pacientes, já que um novo critério para a escolha do melhor tratamento e do regime terapêutico mais apropriado passa a ser instituído. O estudo da farmacogenética na DMRI permitirá que, em um futuro próximo, o tratamento desta doença possa ser escolhido ou modificado de acordo com o perfil genético dos pacientes.

A B S T R A C T

Objective: To investigate the association between CFH gene polymorphism and response to ranibizumab in Brazilian patients with neovascular age-related macular degeneration (AMD). **Methods:** 95 patients were genotyped for the CFH rs1061170 (Y402H) single nucleotide polymorphism. Patients with neovascular AMD initially received three monthly intravitreal ranibizumab injections and were retreated as needed. Visual acuity (VA) and central retinal thickness (CRT) were measured before treatment and 1, 3, 6, and 12 months post-treatment. **Results:** For patients with the TT and TC genotypes, paired comparisons of VA showed a statistically significant improvement when the data obtained at all visits were compared with baseline. Patients homozygous for the risk genotype (CC) did not show a statistically significant improvement when VA obtained at visits 1, 3, 6 and 12 were compared with baseline. For all genotypes, paired comparisons of CRT showed a statistically significant improvement when the data obtained at visits 1, 3, 6 and 12 were compared with baseline. **Conclusion:** Patients with the CC genotype showed poorer long-term functional response to intravitreal ranibizumab.

Key words: Macular Degeneration. Genetics. Polymorphism. Intravitreal Injections. Retina.

REFERÊNCIAS

1. Veloso CER, Almeida LNF, De Marco LA, Vianna RNG, Nehemy MB. Importance of genetic polymorphisms in the response to age-related macular degeneration treatment. *Rev bras oftalmol.* 2012;71(3):194-8.
2. Congdon N, O'Colmain B, Klaver CC, Klein R, Muñoz B, Friedman DS, et al. Causes and prevalence of visual impairment among adults in the United States. *Arch Ophthalmol.* 2004;122(4):477-85.
3. Brown G, Brown MM. Let us wake the nation on the treatment for age-related macular degeneration. *Curr Opin Ophthalmol.* 2010;21(3):169-71.
4. Scholl HP, Fleckenstein M, Charbel Issa P, Keilhauer C, Holz FG, Weber BH. An update on the genetics of age-related macular degeneration. *Mol Vis.* 2007;13:196-205.
5. Klein R, Cruickshanks KJ, Nash SD, Krantz EM, Nieto FJ, Huang GH, et al. The prevalence of age-related macular degeneration and associated risk factors. *Arch Ophthalmol.* 2010;128(6):750-8.
6. Priya RR, Chew EY, Swaroop A. Genetic studies of age-related macular degeneration: lessons, challenges, and opportunities for disease management. *Ophthalmology.* 2012;119(12):2526-36.
7. Schaumberg DA, Hankinson SE, Guo Q, Rimm E, Hunter DJ. A prospective study of 2 major age-related macular degeneration susceptibility alleles and interactions with modifiable risk factors. *Arch Ophthalmol.* 2007;125(1):55-62.
8. Shuler RK Jr, Hauser MA, Caldwell J, Gallins P, Schmidt S, Scott WK, et al. Neovascular age-related macular degeneration and its association with LOC387715 and complement factor H polymorphism. *Arch Ophthalmol.* 2007;125(1):63-7.
9. Almeida LN, Melilo-Carolino R, Veloso CE, Pereira PA, Bastos-Rodrigues L, Sarubi H, et al. Association analysis of CFH and ARMS2

- gene polymorphisms in a Brazilian cohort with age-related macular degeneration. *Ophthalmic Res.* 2013;50(2):117-22.
10. Almeida LN, Melillo-Carolino R, Veloso CE, Pereira PA, Miranda DM, De Marco LA, et al. Homozygosity for the +674C>T polymorphism on VEGF gene is associated with age-related macular degeneration in a Brazilian cohort. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2012;250(2):185-9.
 11. Klein ML, Francis PJ, Rosner B, Reynolds R, Hamon SC, Schultz DW, et al. CFH and LOC387715/ARMS2 genotypes and treatment with antioxidants and zinc for age-related macular degeneration. *Ophthalmology.* 2008;115(6):1019-25.
 12. Goverdhan SV, Hannan S, Newsom RB, Luff AJ, Griffiths H, Lotery AJ. An analysis of the CFH Y402H genotype in AMD patients and controls from the UK, and response to PDT treatment. *Eye.* 2008;22(6):849-54.
 13. Brantley MA Jr, Edelstein SL, King JM, Plotzke MR, Apte RS, Kymes SM, et al. Association of complement factor H and LOC387715 genotypes with response of exudative age-related macular degeneration to photodynamic therapy. *Eye.* 2009;23(3):626-31.
 14. Feng X, Xiao J, Longville B, Tan AX, Wu XN, Cooper MN, et al. Complement factor H Y402H and C-reactive protein polymorphism and photodynamic therapy response in age-related macular degeneration. *Ophthalmology.* 2009;116(10):1908-12.
 15. Seitsonen SP, Jarvela IE, Meri S, Tommila PV, Ranta PH, Immonen IJ. The effect of complement factor H Y402H polymorphism on the outcome of photodynamic therapy in age-related macular degeneration. *Eur J Ophthalmol.* 2007;17(6):943-9.
 16. Tsuchihashi T, Mori K, Horie-Inoue K, Gehlbach PL, Kabasawa S, Takita H, et al. Complement factor H and high-temperature requirement A-1 genotypes and treatment response of age-related macular degeneration. *Ophthalmology.* 2011;118(1):93-100.
 17. Brantley MA Jr, Fang AM, King JM, Tewari A, Kymes SM, Shiels A. Association of complement factor H and LOC387715 genotypes with response of exudative age-related macular degeneration to intravitreal bevacizumab. *Ophthalmology.* 2007;114(12):2168-73.
 18. Lee AY, Raya AK, Kymes SM, Shiels A, Brantley MA Jr. Pharmacogenetics of complement factor H (Y402H) and treatment of exudative age-related macular degeneration with ranibizumab. *Br J Ophthalmol.* 2009;93(5):610-3.
 19. Nischler C, Oberkofler H, Ortner C, Paikl D, Riha W, Lang N, et al. Complement factor H Y402H gene polymorphism and response to intravitreal bevacizumab in exudative age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmol.* 2011;89(4):e344-9.
 20. Imai D, Mori K, Horie-Inoue K, Gehlbach PL, Awata T, Inoue S, et al. CFH, VEGF, and PEDF genotypes and the response to intravitreal injection of bevacizumab for the treatment of age-related macular degeneration. *J Ocul Biol Dis Infor.* 2010;3(2):53-9.
 21. Smailhodzic D, Muether PS, Chen J, Kwestro A, Zhang AY, Omar A, et al. Cumulative effect of risk alleles in CFH, ARMS2, and VEGFA on the response to ranibizumab treatment in age-related macular degeneration. *Ophthalmology.* 2012;119(11):2304-11.
 22. Kloeckener-Gruissem B, Barthelmes D, Labs S, Schindler C, Kurz-Levin M, Michels S, et al. Genetic association with response to intravitreal ranibizumab in patients with neovascular AMD. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(7):4694-702.
 23. McKibbin M, Ali M, Bansal S, Baxter PD, West K, Williams G, et al. CFH, VEGF and HTRA1 promoter genotype may influence the response to intravitreal ranibizumab therapy for neovascular age-related macular degeneration. *Br J Ophthalmol.* 2012;96(2):208-12.
 24. Menghini M, Kloeckener-Gruissem B, Fleischhauer J, Kurz-Levin MM, Sutter FK, Berger W, et al. Impact of loading phase, initial response and CFH genotype on the long-term outcome of treatment for neovascular age-related macular degeneration. *PLoS One.* 2012;7(7):e42014.
 25. Yamashiro K, Tomita K, Tsujikawa A, Nakata I, Akagi-Kurashige Y, Miyake M, et al. Factors associated with the response of age-related macular degeneration to intravitreal ranibizumab treatment. *Am J Ophthalmol.* 2012;154(1):125-36.
 26. Hagstrom SA, Ying GS, Pauer GJ, Sturgill-Short GM, Huang J, Callanan DG, et al. Pharmacogenetics for genes associated with age-related macular degeneration in the Comparison of AMD Treatments Trials (CATT). *Ophthalmology.* 2013;120(3):593-9.
 27. Veloso CE, de Almeida LN, Recchia FM, Pelayes D, Nehemy MB. VEGF gene polymorphism and response to intravitreal ranibizumab in neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmic Res.* 2014;51(1):1-8.
 28. Lahiri DK, Nurnberger Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res.* 1991;19(19):5444.
 29. Lai TY, Chan WM, Liu DT, Luk FO, Lam DS. Intravitreal bevacizumab (Avastin) with or without photodynamic therapy for the treatment of polypoidal choroidal vasculopathy. *Br J Ophthalmol.* 2008;92(5):661-6.
 30. Mitamura Y, Kitahashi M, Kubota-Taniai M, Yamamoto S. Comparison of intravitreal bevacizumab to photodynamic therapy for polypoidal choroidal vasculopathy: short-term results. *Indian J Ophthalmol.* 2010;58(4):291-6.
 31. Fung AE, Lalwani GA, Rosenfeld PJ, Dubovy SR, Michels S, Feuer WJ, et al. An optical coherence tomography-guided, variable dosing regimen with intravitreal ranibizumab (Lucentis) for neovascular age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol.* 2007;143(4):566-83.

Recebido em 29/11/2013

Aceito para publicação em 07/02/2014

Conflito de interesse: nenhum.

Fonte de financiamento: nenhuma.

Endereço para correspondência:

Carlos Eduardo dos Reis Veloso

E-mail: cerveloso@hotmail.com