

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDO MORANDINI PRADELLA

**AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DA LECTINA LIGANTE DE
MANOSE NA DEGENERAÇÃO MACULAR RELACIONADA A IDADE**

Curitiba

2014

Fernando Morandini Pradella

**AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DA LECTINA LIGANTE DE
MANOSE NA DEGENERAÇÃO MACULAR RELACIONADA A IDADE**

Projeto apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde nível Mestrado, Setor Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Iara Jose de Messias- Reason

Co-orientadores: Prof. Dr. Renato Mitsunori Nisihara e Prof. Dr. Mario Teruo Sato

Curitiba

2014

PROJETO DE PESQUISA

TÍTULO DO PROJETO:

**Avaliação da Concentração Sérica da Lectina Ligante de Manose na
Degeneração Macular Relacionada a Idade**

IDENTIFICAÇÃO DO PROJETO

Nome do aluno: Fernando Morandini Pradella

Professor Orientador: Dr. Iara Jose de Messias-Reason

Linha de Pesquisa: Investigação imunológica e molecular dos mecanismos inatos de defesa em doenças autoimunes e infecto-parasitárias

Área de concentração: Doenças do sistema imunológico

Comitê de Ética: 2609.215/2011-09

Professor Co-orientador: Dr. Renato Mitsunori Nisihara

Professor Co-orientador: Dr. Mario Teruo Sato

Pesquisador Colaborador: Alexandre Achile Grandinetti

Pesquisador Colaborador: Marcelo M Pires

Pesquisador Colaborador: Sergio Novello

Pesquisador Colaborador: Diego Schebelski

Pesquisador Colaborador: Jens C. Jensenius

Fernando Morandini Pradella

**AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DA LECTINA LIGANTE DE
MANOSE NA DEGENERAÇÃO MACULAR RELACIONADA A IDADE**

Projeto apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde nível Mestrado, Setor Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Mario Teruo Sato – Universidade Federal do Paraná

Prof. Dr. Renato Mitsunori Nisihara – Universidade Federal do Paraná

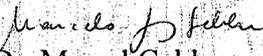
Prof. Dr. Marcelo Luiz Gehlen – Universidade Evangélica do Paraná



PARECER

Aos vinte e sete dias do mês de agosto do ano de dois mil e quatorze, a banca examinadora constituída pelos professores: Dr. Mário Teruo Sato (UFPR), Dr. Marcel Gehlen (FEPAR) e Professor Dr. Renato Mitsunori Nisihara (UFPR) – co-orientador, exarou o presente parecer sobre a dissertação elaborada por **Fernando Morandini Pradella**, aluno concluinte do **Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna - Mestrado da Universidade Federal do Paraná**, intitulada: **“DEGENERACÃO MACULAR RELACIONADA À IDADE E INFLUENCIA DA VIA DAS LECTINAS DO SISTEMA COMPLEMENTO”**. A Banca examinadora considerou que o aluno apresentou trabalho adequado para dissertação e o defendeu com segurança e propriedade nas argüições que lhe foram feitas, de modo a merecer a sua **aprovação**, sendo recomendado à Universidade Federal do Paraná que lhe seja concedido o título de **Mestre em Medicina Interna**, e a publicação de artigo em revista técnico-científica com corpo editorial, depois de incorporadas as sugestões apresentadas no decurso das argüições, cumpridas outras exigências previstas em normativas da pós-graduação.


Dr. Mário Teruo Sato


Dr. Marcel Gehlen


Dr. Renato Mitsunori Nisihara

“Lutar sempre, vencer se possível, desistir jamais”

Anônimo

A meus pais ***Flavio e Jeanete***, pela dedicação em minha criação e exemplo de que o esforço sempre trará a recompensa.

À minha noiva ***Francielle*** pela companhia em todos os momentos.

À minha irmã ***Ângela*** e cunhado ***Marco Antônio*** pelos suportes técnicos sempre necessários.

AGRADECIMENTOS

Ao professor **Renato Mitsunori Nisihara**, pelo entusiasmo nas pesquisas e imensa paciência no ensino e orientação.

Ao professor **Mario Teruo Sato**, pela insistência e incansável vontade de aprimoramento científico de seus alunos.

À **Dra. Iara T M Reason**, por sempre ampliar nossa visão do assunto tratado muito além do óbvio.

Ao colega e amigo **Alexandre Grandinetti**, fonte inestimável de conhecimento atual e científico em assuntos oftalmológicos.

Ao colega e amigo **Rafael Gioppo Ferre** pela parceria em complexos casos de retina.

Aos **residentes do Centro da Visão – UFPR** pela inestimável ajuda neste trabalho, especialmente **Diego Schebelski, Sergio Novello, Marcelo Pires e Guilherme Pagnoncelli**.

Aos funcionários do **Centro da Visão – UFPR**, em especial a **Silvete da Silva e Ismar Sauaf**, os quais sempre auxiliaram na triagem e coleta dos pacientes.

Aos colegas e oftalmologistas **Ezequiel Portella, Junior Kuczmainski e Lucas Shiokawa** pelo companheirismo e ensinamentos.

Ao **Sr. Marcos**, funcionário da imunopatologia HC-UFPR pelo manejo e catalogação de amostras sanguíneas.

Aos **pacientes e seus familiares** que concordaram e colaboraram em nossa pesquisa.

RESUMO

Introdução: A Degeneração Macular Relacionada a Idade (DMRI) é a principal causa de cegueira no ocidente em pessoas acima de 65 anos de idade. Nos EUA, estima-se que mais de 8 milhões de pacientes tenham DMRI. A idade é o principal fator de risco e com o aumento da expectativa de vida, espera-se maior número de casos nos próximos anos. A atividade inflamatória na fisiopatologia da DMRI tem sido cada vez mais estudada e cresce em importância a cada dia, com vários mecanismos propostos, com especial atenção ao sistema complemento. **Objetivos:** Avaliação do papel da lectina ligante de manose (MBL) do sistema complemento em pacientes com DMRI. **Pacientes e Métodos:** Foram avaliados 136 indivíduos (60 homens e 76 mulheres), com idade acima de 55 anos. Dentre eles, 68 eram portadores de DMRI e 68 eram controles. Esses foram pareados com os pacientes de acordo com idade, sexo, características étnicas, socioeconômicas e origem geográfica. A concentração sérica de MBL foi avaliada através do método TRIFMA. O estudo foi realizado no Centro da Visão do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná e compreendeu: consulta oftalmológica completa (exame oftalmológico, tomografia de coerência óptica com protocolo específico); coleta de sangue, análise laboratorial e estatística. **Resultados:** As concentrações de MBL não mostraram diferenças significantes quanto a etnia, idade, sexo, IMC ou tabagismo entre grupos de pacientes e controles. A mediana da MBL para os casos foi de 608 ng/mL (30 - 3415ng/mL) e controles 739 ng/mL (30 - 6039 ng/mL); $p = 0,4770$. Comparando-se DMRI exsudativa com a forma seca, observou-se menor concentração de MBL na forma exsudativa (476 ng/mL) em relação a forma seca (893 ng/mL). Entretanto, esses resultados não mostraram diferença estatisticamente significativa ($p = 0,1011$). Houve discreta diminuição, não significativa, dos níveis de MBL com o avanço da idade nos controles. **Conclusões:** Os resultados obtidos não demonstraram associação entre a concentração sérica de MBL e a DMRI ou com suas formas clínicas exsudativa e seca.

Palavras-chave: Degeneração macular relacionada a idade. Sistema complemento. MBL. Marcadores inflamatórios.

ABSTRACT

Introduction: Age Macular Degeneration (AMD) is the leading cause of blindness in the Western population over 65 years. In the U.S., more than 8 million patients have some degree of AMD. The major risk factor for AMD is the age and due to the increase in the global life expectancy, a higher number of cases are expected. The inflammatory activity in the pathophysiology of the disease has been studied for years, gaining importance in the recent years. Several mechanisms have been proposed with special attention paid to the complement system. **Objectives:** To evaluate the role of mannose-binding lectin (MBL) of complement system in AMD patients. **Patients and Methods:** A total of 136 subjects with age over 55 years were evaluated (68 patients with AMD and 68 controls). All subjects were followed up at the Vision Centre of the Hospital de Clínicas – Federal University of Paraná in Curitiba – Brazil. For all individuals complete ophthalmologic exams and optical coherence tomography using a specific protocol were performed. Blood samples were collected for MBL measurement. **Results:** There was no difference regarding ethnicity, age, gender, BMI or smoking habits between patients and controls. The median MBL levels for AMD patients was 608 ng /mL (30-3415 ng/mL –) and for the controls 739 ng/mL (30-6039 ng/mL), with no statistically significant difference ($p=0,4770$). There was no difference either when comparing exudative with dry AMD, with median MBL of 476 ng/mL in the exudative form and 893 ng/mL in the dry form ($p=0,1011$). There was no difference between men and women regarding MBL serum levels and a not significant decrease in MBL levels was observed with aging in controls. **Conclusions:** There was no association between MBL serum levels and AMD or with the exudative and dry clinical forms of AMD.

Keywords: Age macular degeneration, complement system, MBL, inflammatory markers.

LISTA DE GRÁFICOS

| | |
|---|----|
| GRAFICO 1 – Concentrações de MBL sérica (ng/mL) em casos de DMRI e controles..... | 46 |
| GRAFICO 2 – Correlação entre idade e níveis de MBL nos controles e casos de DMRI..... | 47 |
| GRAFICO 3 – Estratificação de pacientes com DMRI e controles de acordo com variação nos níveis de MBL..... | 47 |
| GRAFICO 4 – Frequências absolutas de gênero em relação aos níveis de MBL em pacientes com DMRI e controles..... | 48 |
| GRAFICO 5 – Correlação entre idade e níveis de MBL na DMRI seca e exsudativa. | 49 |
| GRAFICO 6 – Comparação dos níveis de MBL sérica nos subtipos de DMRI. | 51 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| FIGURA 1 – Imunocitoquímica de uma drusa com deposição de componentes do sistema complemento..... | 23 |
| FIGURA 2 – Esquema demonstrando a classificação clínica da DMRI..... | 23 |
| FIGURA 3 – Exemplo de DMRI categoria 1 (esquerda), apresentando apenas drusas pequenas e esparsas – seta. (www.asrs.org); e categoria 2 (direita), apresentando diversas drusas pequenas e de algumas drusas de médio tamanho - seta (www.asrs.org)..... | 25 |
| FIGURA 4 – Exemplo de DMRI seca categoria 3 (direita), composta por drusas médias e grandes - seta (www.retinagallery.com) e exemplo de Atrofia Geográfica (esquerda), com extensa área de atrofia de EPR e coroide - seta (www.retinagallery.com)..... | 25 |
| FIGURA 5 – Exemplo de DMRI exsudativa ativa com MNSR em atividade (esquerda - seta) e cicatrizada com fibrose (direita)..... | 26 |
| FIGURA 6 – Vias de ativação do Sistema Complemento (adaptado de ABBAS LICHTMAN, ANDREW H., PILLAI, SHIV., 2012). | 28 |
| FIGURA 7 – Estrutura da molécula de MBL..... | 31 |
| FIGURA 8 – Gene da MBL (MBL 2) com principais polimorfismos e proteína com substituições de aminoácidos. NOTA: Cortesia Dra. Angelica Boldt (2011). | 33 |
| FIGURA 9 – Tabela de avaliação da Acuidade Visual – ETDRS “Chart 2”..... | 38 |
| FIGURA 10 – Lâmpada de fenda Topcon SL-1E, lente de 78 dioptrias Volk e Oftalmoscópio Indireto Heine EN30. | 38 |
| FIGURA 11 – Exemplo de caso de DMRI exsudativa cicatrizada (esquerda) e controle (direita) capturado pelo OCT. | 40 |
| FIGURA 12 – Angio-retinógrafo Topcon TRC50x. | 41 |

| | |
|---|----|
| FIGURA 13 – Quantificação de MBL pelo método TRIFMA (FREDERIKSEN et al., 2006)..... | 43 |
|---|----|

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| TABELA 1 – Concentrações séricas dos componentes da via das lectinas do sistema complemento. | 33 |
| TABELA 2 – Dados demográficos dos pacientes portadores de DMRI e controles.. | 45 |
| TABELA 3 – Concentrações de MBL sérica em casos de DMRI e controles..... | 46 |
| TABELA 4 – Dados demográficos de portadores de DMRI seca e exsudativa..... | 50 |
| TABELA 5 – Comparação dos níveis de MBL sérica nos subtipos de DMRI..... | 51 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

| | |
|---------|---|
| ABCA1 | ATP-Binding cassette sub-family A member 1 (Membro 1 da subfamília A do cartucho de ligação de ATP) |
| AREDS | Age-Related Eye Disease Study |
| ARMS2 | Age-related maculopathy susceptibility 2 gene (Gene da maculopatia relacionada a idade 2) |
| CETP | Cholesterol Ester Transfer Protein (Proteína de transferência do ester de colesterol) |
| COL10A1 | Collagen type X alpha 1 (Colágeno tipo 10 alfa 1) |
| COL8A1 | Collagen type VII alpha 1 (Colágeno tipo 8 alfa 1) |
| CRD | Domínio de reconhecimento de carboidrato |
| DAF | Decay Accelerating Factor (Fator de aceleração de decaimento) |
| DM | Diabetes <i>Mellitus</i> |
| DMRI | Degeneração Macular Relacionada a Idade |
| DP | Desvio-Padrão |
| EP | Erro-Padrão |
| EPR | Epitélio Pigmentado da Retina |
| FRK | Fyn-related kinase (Quinase relacionada a “Fyn” – tipo de proteína-quinase de oncogenes) |
| HAS | Hipertensão Arterial Sistêmica |
| HDL | High Density Lipoprotein (Lipoproteína de Alta Densidade) |
| HLA | Human Leukocyte Antigen (antígeno leucocitário humano) |
| HtrA1 | High temperature requirement serine peptidase 1 (Serino peptidase de alta temperatura 1) |
| IC | Intervalo de Confiança |

| | |
|---------|---|
| IL | Interleucina |
| IMC | Índice de massa corpórea |
| LES | Lúpus Eritematoso Sistêmico |
| LIPC | Lipase member C (Componente C da Lipase Hepática) |
| MASP | MBL Associated Serine Proteinase (Serino-proteinase Associada a MBL) |
| MBL | Mannose Binding Lectin (Lectina Ligante de Manose) |
| MHC | Major Histocompatibility Complex (complexo principal de histocompatibilidade) |
| OCT | Optical Coherence Tomography (Tomografia de Coerência Óptica) |
| PAMP | Pathogen-Associated Molecular Patterns (Padrões Moleculares Associados a Patógenos) |
| PLEKHA1 | Pleckstrin Homology Domain family A member 1 |
| RAP | Risco Atribuível na População |
| SNP | Single Nucleotide Polymorphism (polimorfismo de nucleotídeo simples) |
| TBS | Tris-buffered saline |
| TIMP3 | Tissue metalloproteinase inhibitor 3 (Inibidor tecidual da metaloproteinase 3) |
| TRIFMA | Time-resolved immunofluorometric assay |
| VEGF | Vascular Endotelial Growth Factor (Fator de Crescimento Endotelial Vascular) |
| Y402H | Variante Y402 do fator H |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| LISTA DE GRÁFICOS | 9 |
| LISTA DE FIGURAS | 10 |
| LISTA DE TABELAS | 12 |
| LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS..... | 13 |
| SUMÁRIO..... | 15 |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 17 |
| 1.1 OBJETIVO GERAL | 21 |
| 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 21 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 22 |
| 2.1 DEGENERAÇÃO MACULAR RELACIONADA A IDADE..... | 22 |
| 2.1.1 DEFINIÇÃO | 22 |
| 2.1.2 DMRI NÃO EXSUDATIVA (“SECA”) | 24 |
| 2.1.3 DMRI EXSUDATIVA..... | 26 |
| 2.1.4 EPIDEMIOLOGIA | 26 |
| 2.2 SISTEMA COMPLEMENTO | 27 |
| 2.3 SISTEMA COMPLEMENTO NA DMRI | 28 |
| 2.3.1 MBL – LECTINA LIGANTE DE MANOSE | 30 |
| 3 PACIENTES E MÉTODOS | 34 |
| 3.1 SELEÇÃO DE PACIENTES | 34 |
| 3.2 COLETA DE DADOS | 37 |
| 3.3 EXAME DE BIOMICROSCOPIA E FUNDO DE OLHO..... | 38 |
| 3.4 TOMOGRAFIA DE COERÊNCIA ÓPTICA (OCT) | 39 |
| 3.5 ANGIOGRAFIA FLUORESCEINICA..... | 40 |
| 3.6 COLETA DE SANGUE..... | 41 |
| 3.7 QUANTIFICAÇÃO DA MBL SÉRICA..... | 42 |

| | |
|----------------------------|-----------|
| 4 RESULTADOS | 44 |
| 5 DISCUSSÃO | 52 |
| 6 CONCLUSOES | 57 |
| 7 REFERÊNCIAS | 58 |
| ANEXOS..... | 65 |

1 INTRODUÇÃO

A degeneração macular relacionada a idade (DMRI) é uma doença de etiologia multifatorial, com prevalência e morbidade crescentes e significativas. Os primeiros estudos datam dos anos 80 e desde então, atenção crescente tem sido dada a esta doença. Embora o componente hereditário (poligênico) seja um dos principais fatores de risco para desenvolvimento da doença (SILVESTRI, 1997), (ZHAO et al., 2013); essa é de caráter multifatorial. Entre os fatores envolvidos, destacam-se a idade (principal), etnia, genética e história familiar, exposição a luz (principalmente solar), aumento de índice de massa corpórea (IMC) e tabagismo. Mais recentemente, tem-se demonstrado ainda, importante participação do processo inflamatório na DMRI (DONOSO et al., 2014).

O impacto socioeconômico e emocional da DMRI é grande, uma vez que diminui significativamente a capacidade de leitura, direção e todas as atividades que necessitam de foco acurado da visão (BOK, 2005). A DMRI constitui a principal causa de cegueira legal no mundo ocidental, em faixas etárias superiores a 50 anos (KLEIN; ROWLAND; HARRIS, 1995). Somente nos Estados Unidos da América (EUA), 9,20% da população maior de 40 anos de idade apresentam alguma forma de DMRI (KLEIN; CHOU, 2011). Na França, a DMRI é a principal causa de cegueira na população acima de 55 anos, afetando até 8,50% dessa população (LE TIEN, 2008). Sua prevalência aumenta com a idade afetando cerca de 8,5 a 27,9% da população francesa acima de 75 anos (SOUBRANE; HADDAD; COSCAS, 2002). Espera-se que o número de indivíduos afetados pela DMRI deva aumentar em 50% até 2020 devido ao aumento da expectativa de vida (DONOSO et al., 2006). Alterações sistêmicas diversas como doença vascular, aterosclerose e até doenças infecciosas tem sido associadas à DMRI (KLEIN et al., 1999; MILLER et al., 2004). Além disso, algumas medicações anti-hipertensivas (vasodilatadores) também foram associadas a DMRI (KLEIN; MYERS; KLEIN, 2014).

No Brasil não há estatística oficial sobre a prevalência de DMRI. Em metanálise recente a partir de 149 estudos, apenas 39 foram considerados confiáveis (utilizando protocolos de imagem e triagem), dos quais somente um foi da América Latina. No entanto, esse estudo refere-se somente a um grupo específico de ascendência oriental de Londrina – PR (WONG et al., 2014); (OGUIDO, 2004), o qual apresentou 8,01% de alguma forma de DMRI nos indivíduos maiores de 40

anos. Outro estudo, realizado em Veranópolis – RS, apresentou prevalência de 31,50% de DMRI em adultos maiores de 80 anos daquela localidade (ROMANI, 2005); porém esse estudo não foi incluído na metanálise por não satisfazer os critérios de inclusão.

Com base nos dados preliminares do censo IBGE 2010 em Curitiba (“IBGE 2010”), aproximadamente 285 mil habitantes são maiores de 55 anos, sendo a prevalência de DMRI estimada em 17 a 28 mil casos (todas formas de DMRI) ou 6 a 10%. Prevalência esta calculada a partir de dados mundiais – Europa e Estados Unidos - pois não há estatística oficial no Brasil.

Alguns processos biológicos e patológicos dispõem de marcadores que podem ser objetivamente aferidos. São particularmente úteis quando tais marcadores precedem o processo patológico, tornando-se assim um fator de risco mensurável de alterações em tecidos não acessíveis normalmente. Um exemplo são os marcadores de doença cardiovascular, tais como a pressão arterial, níveis de colesterol e índice de massa corporal (IMC).

A idade avançada é um fator de risco conhecido para desenvolvimento de DMRI. Estudos demonstram que alterações que ocorrem com o avançar da idade predispoem ao dano oxidativo do epitélio pigmentar da retina (EPR) e da coriocapilar. Essas alterações incluem diminuição no nível plasmático de glutathione, vitaminas C e E e atividade da catalase. Ainda observa-se incremento nos níveis de lipofuscina no EPR e peroxidação lipídica (ZARBIN, 2004).

Nos últimos anos, o papel crítico da inflamação no desenvolvimento e progressão da DMRI vem sendo elucidado (ANDERSON et al., 2002); (HAGEMAN et al., 2001). Vários mediadores inflamatórios foram identificados em lesões de DMRI, assim como na circulação. Dados inconclusivos apontam para a proteína C reativa (marcador de resposta inflamatória inespecífica) e também para a interleucina-6 (IL-6). Alguns pesquisadores sugerem que a proteína C reativa possa ter papel direto no desenvolvimento e progressão da DMRI por sua habilidade em induzir ativação do sistema complemento (SEDDON et al., 2005). Outros grupos porém, demonstraram não haver tal associação (KLEIN et al., 2005).

Em relação a IL-6, os dados também são discordantes. Enquanto alguns descrevem associação entre níveis de IL-6 e a progressão da DMRI (SEDDON et al., 2004), outros referem não haver tal associação (KLEIN et al., 2005).

Nos últimos anos, atenção especial vem sendo dada ao fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), pois sabe-se que tal molécula desempenha importante papel na DMRI e é passível de tratamento com anticorpo monoclonal anti-VEGFs. Foram descritos níveis significativamente aumentados de VEGF no soro de pacientes com DMRI exsudativa em comparação com pacientes de DMRI seca, sugerindo que tais níveis podem ser um importante marcador de gravidade de doença (TSAI et al., 2006).

A formação de drusas, lesões iniciais características da DMRI, são provavelmente resultado de uma resposta inflamatória localizada (JOHNSON et al., 2001a). Este conceito provem da observação de que vários componentes do sistema complemento e outras proteínas envolvidas nos processos imunológicos e inflamatórios encontram-se na composição das drusas (KLEIN et al., 2003). Como exemplo, podemos citar a proteína amiloide (proteína de fase aguda do componente inflamatório em placas da doença de Alzheimer) também encontrada nas drusas (ANDERSON et al., 2004). Ainda, há outras proteínas envolvidas na modulação da resposta inflamatória, tais como vitronectina, apolipoproteínas B e E e o receptor 1 do complemento (CR1) que podem desempenhar um papel no desenvolvimento da drusa e conseqüentemente na DMRI (ZARBIN, 2004).

A inflamação também parece ser importante na evolução para a forma mais grave (exsudativa ou neovascular) de DMRI. A ativação precoce de monócitos e a presença de células de inflamação crônica tais como linfócitos na superfície externa da membrana de Bruch foram descritas em formas neovasculares de DMRI (MILLER et al., 2004). Tais células inflamatórias danificam a membrana de Bruch liberando enzimas proteolíticas, agentes oxidantes e radicais tóxicos do oxigênio (PENFOLD et al., 2001).

Essas observações foram obtidas em modelos experimentais nos quais células inflamatórias induziram neovascularização de coróide. Um recrutamento anormal de macrófagos foi associado com a produção de VEGF pelo EPR, o que pode estar envolvido na angiogênese aberrante (APTE et al., 2006). Observou-se ainda uma redução em tamanho e extravasamento de membranas neovasculares subretinianas (MNSR) induzidas por laser após depleção experimental de macrófagos (ESPINOSA-HEIDMANN et al., 2003; SAKURAI et al., 2003).

Uma série de eventos adjuvantes ao dano oxidativo como a produção de uma matriz extracelular anormal, derivada do EPR e fotorreceptores, que altera a difusão de nutrientes para a retina e coroide, promove perpetuação do processo.

Recentemente um número crescente de relatos vêm indicando componentes do sistema complemento como fatores de risco para DMRI. As evidências mais consistentes se referem ao fator H e fator B, componentes essenciais da via alternativa (AUGUSTIN; KIRCHHOF, 2009; EDWARDS et al., 2005; GOLD et al., 2006; HAINES et al., 2005).

Considerando o fato de que a composição da drusa – lesão básica da DMRI discutida adiante – possui alta concentração de diferentes componentes do sistema complemento, pode-se supor a participação de outras vias além da alternativa na gênese da DMRI (NISHIHARA, 2009; TSUTSUMI et al., 2001). O sistema complemento é ativado através de três vias interdependentes e necessárias para seu funcionamento: a via clássica, alternativa e das lectinas. Um estudo aferindo a resistência transepitelial em monocamadas de células do EPR tanto de ratos quanto de embriões humanos mostrou que, somente ao se adicionar componentes das vias alternativa e das lectinas conjuntamente, a atividade lítica celular era iniciada, fato que não ocorria somente com a via alternativa (JOSEPH et al., 2013). Esses achados sugerem que participação da via das lectinas na gênese ou piora da DMRI.

1.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar as concentrações séricas de MBL em pacientes com Degeneração Macular Relacionada a Idade

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar possível relação das concentrações séricas de MBL com a presença e a gravidade de DMRI.
- Avaliar se há variação de níveis séricos de MBL com relação a idade, etnia e sexo em pacientes com DMRI.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DEGENERAÇÃO MACULAR RELACIONADA A IDADE

2.1.1 DEFINIÇÃO

A DMRI é uma doença que causa lesão de fotorreceptores, epitélio pigmentar da retina (EPR) e coriocapilar de forma irreversível, com consequente baixa de visão. Sua etiologia é multifatorial, incluindo idade, etnia, tabagismo, aumento de IMC, exposição a luz, fatores genéticos e inflamatórios. A lesão básica da DMRI é a drusa. Esta é composta por depósitos extracelulares que se acumulam abaixo do EPR, ao nível da membrana de Bruch. A membrana de Bruch consiste em uma camada elástica colágena que mantém os vasos sanguíneos da coroide em sua posição normal, sendo mais fina na região macular (CHONG et al., 2005), fato este que poderia explicar a predileção na formação de drusas pela região macular da retina. A modulação no desenvolvimento destas lesões poderia ser usada como estratégia no tratamento ou prevenção da DMRI. Estudos imunocitoquímicos mostram deposição de componentes diversos como proteína amiloide, vitronectina, inibidor tecidual de metaloproteinase 3 nas drusas (CRABB et al., 2002; HAGEMAN, 2001). A composição da drusa encontra-se ilustrada na figura 1.

A DMRI pode ser classificada em duas formas principais: seca e exsudativa. Dentro destas formas, podemos ainda subdividir a seca em categorias 1, 2, 3 e atrofia geográfica; e a exsudativa em formas ativa (neovascularização de coroide) e cicatrizada ou fibrosada. Figura 2.

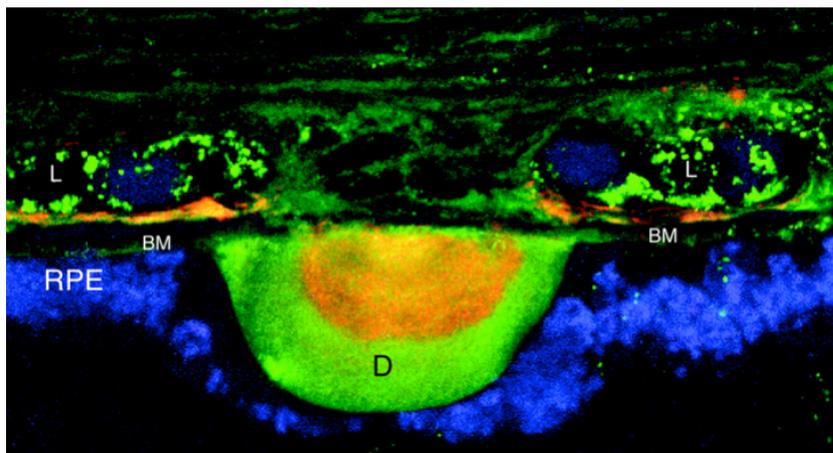


FIGURA 1 – Imunocitoquímica de uma drusa com deposição de componentes do sistema complemento.

NOTA: Imagem de Patrick Johnson e Kellen Betts (Universidade da Califórnia), retirado de (BOK, 2005).

NOTA 2: Legendas representam D (drusa), RPE (Epitélio Pigmentado da Retina), BM (membrana de Bruch), L (lúmen vascular). Substância em verde = Fator H; em laranja = C5b-9 ou MAC (complexo de ataque a membrana).

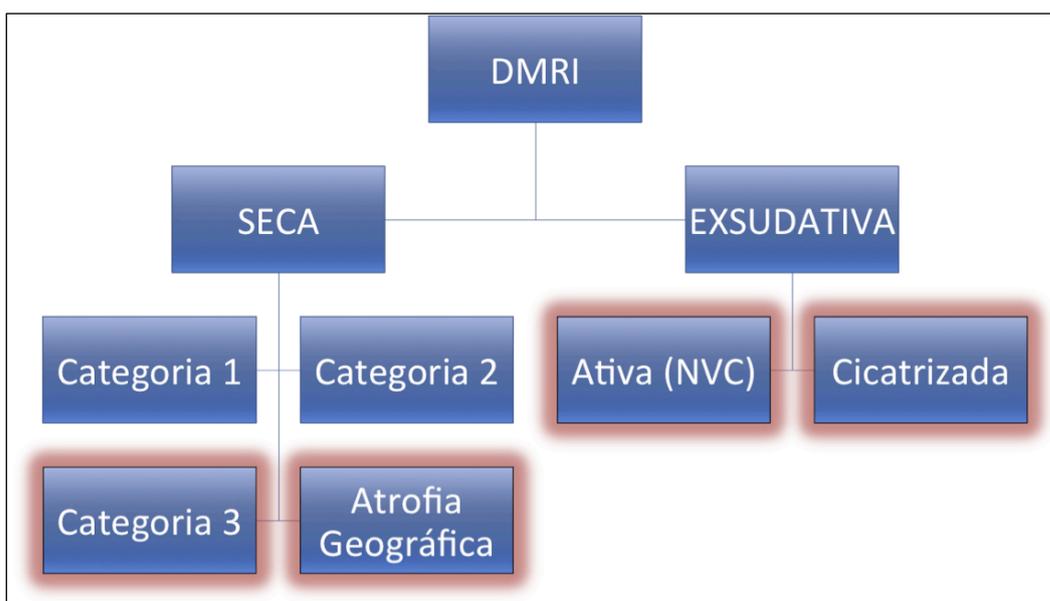


FIGURA 2 – Esquema demonstrando a classificação clínica da DMRI.

NOTA: NVC = Neovascularização de coroide.

Dentro desta classificação, as formas que normalmente causam baixa efetiva de acuidade visual são a atrofia geográfica e ambas formas da exsudativa. Inclusive, estas formas podem ser consideradas DMRI tardia (“late AMD”), enquanto as demais formas como DMRI inicial (“early AMD”) (KLEIN et al., 2011). A definição de cada uma das formas esta descrita a seguir.

2.1.2 DMRI NÃO EXSUDATIVA (“SECA”)

A forma seca é a forma mais prevalente de DMRI, representando cerca de 80-90% dos casos. É caracterizada pela presença das drusas entre o EPR e a membrana de Bruch na região macular. Pode progredir para disfunção e morte de células da monocamada do EPR e conseqüente atrofia geográfica. Apesar da maior prevalência, corresponde somente a 20% dos casos de cegueira por DMRI (HO, 2011).

A categoria 1 da DMRI seca corresponde a apenas algumas pequenas drusas maculares, menores de $62 \mu\text{m}$. Figura 3.

Já a categoria 2 da DMRI seca consiste em diversas pequenas drusas (mais de 20) ou algumas médias de $63 - 124 \mu\text{m}$. Figura 3.

A categoria 3 da DMRI seca é caracterizada por diversas drusas médias (mais de 2) ou ao menos uma drusa grande, maior que $125 \mu\text{m}$. Figura 4.

A atrofia geográfica que ocorre na DMRI seca, apresenta diminuição efetiva de fotorreceptores com afinamento bem-delimitado de EPR e coroide. Figura 4.

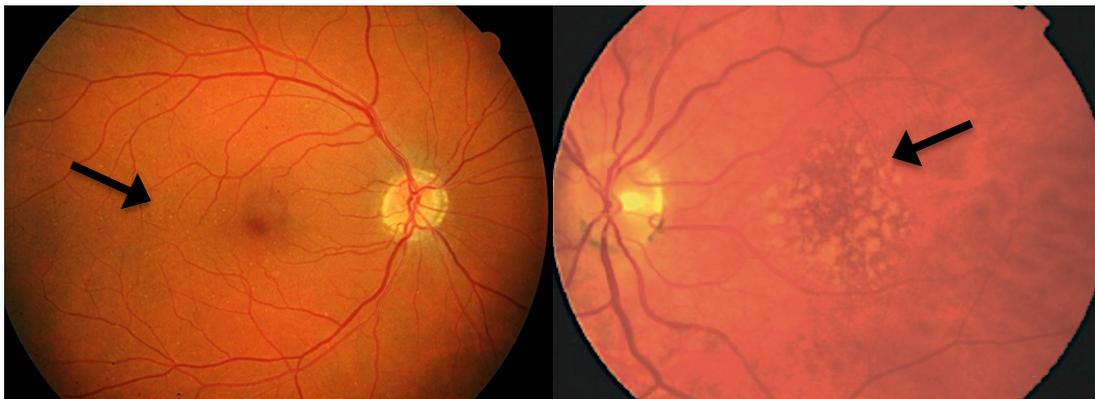


FIGURA 3 – Exemplo de DMRI categoria 1 (esquerda), apresentando apenas drusas pequenas e esparsas – seta. (www.asrs.org); e categoria 2 (direita), apresentando diversas drusas pequenas e de algumas drusas de médio tamanho - seta (www.asrs.org).

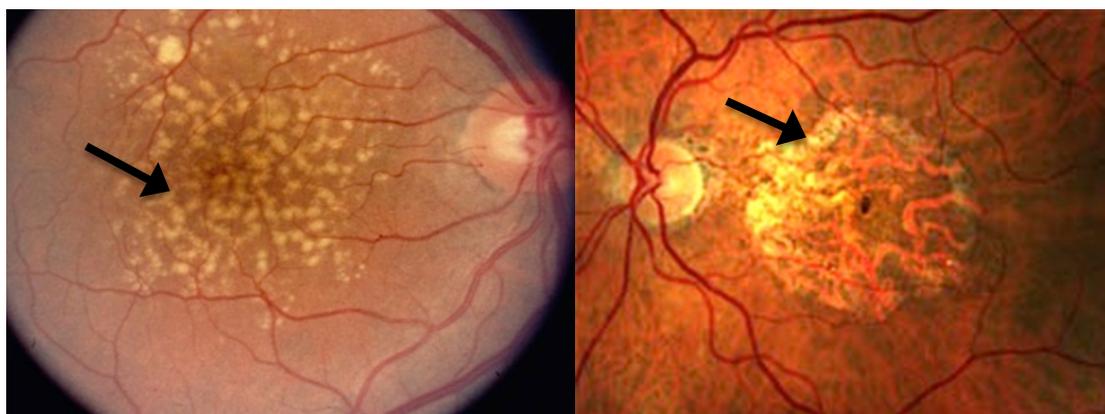


FIGURA 4 – Exemplo de DMRI seca categoria 3 (direita), composta por drusas medias e grandes - seta (www.retinagallery.com) e exemplo de Atrofia Geográfica (esquerda), com extensa área de atrofia de EPR e coroide - seta (www.retinagallery.com)

2.1.3 DMRI EXSUDATIVA

A forma exsudativa ou neovascular da DMRI, mesmo sendo menos comum que a forma seca, tem um pior prognóstico visual e, ao contrário da forma seca, a maioria dos pacientes apresenta sintomas. Embora represente 5 a 10% dos casos de DMRI corresponde a 80-90% dos casos de cegueira por esta doença (figura 5). Pode se apresentar como neovascularização subretiniana, sub-EPR e descolamentos de EPR (“DEPs”). Inclui ainda outras entidades como a vasculopatia polipoidal idiopática da coroide e proliferação angiomasosa da retina, que são clinicamente semelhantes à DMRI exsudativa porém podem exigir diferentes tratamentos e seguem diferentes cursos clínicos (HO, 2011).

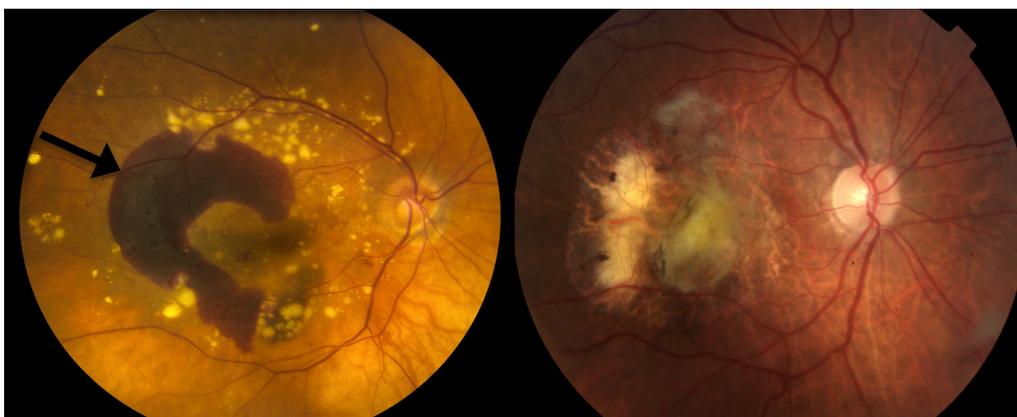


FIGURA 5 – Exemplo de DMRI exsudativa ativa com MNSR em atividade (esquerda - seta) e cicatrizada com fibrose (direita).

2.1.4 EPIDEMIOLOGIA

A DMRI é uma doença com incidência e prevalência crescentes no mundo ocidental. A composição étnica, componente genético e fatores externos influenciam na ocorrência da DMRI. No sul do Brasil estima-se uma casuística semelhante à europeia. Não há dados oficiais brasileiros mas pela composição populacional, a prevalência aproximada seria de 8% em maiores de 40 anos (todas formas de DMRI) a até 27% em maiores de 75 anos (SOUBRANE; HADDAD; COSCAS, 2002; WONG et al., 2014). É possível, no entanto, que poderia haver alguma variação pela exposição maior de raios ultravioletas no Brasil. Em outras regiões brasileiras é provável que seja algo semelhante a populações da América central, para as quais os dados também são escassos. Em países desenvolvidos a

DMRI já é a principal causa de cegueira em maiores de 55 anos de idade e um aumento de 50% é esperado até 2020 (DONOSO et al., 2006). O Brasil, pelo aumento da expectativa de vida, sendo a idade o principal fator de risco, deve ter um aumento importante na ocorrência de DMRI.

2.2 SISTEMA COMPLEMENTO

Os processos imunológicos podem ser divididos em dois principais sistemas: o adaptativo (linfócitos B e T com reconhecimento antígeno-específico e memória imunológica) e o inato (menos específico, mas de ação imediata). O sistema complemento participa em ambos processos, apesar de ativar mais significativamente os mecanismos inatos de defesa (ABBAS LICHTMAN, ANDREW H., PILLAI, SHIV., 2012). O sistema complemento compreende mais de 30 proteínas plasmáticas e associadas a membranas celulares, com uma concentração total de 3g/L no plasma (DUNKELBERGER; SONG, 2009). Atua na proteção contra patógenos invasores, remoção de debris celulares e como adjuvante em respostas imunes mediadas por células. Os hepatócitos sintetizam cerca de 90% dos componentes do sistema complemento. Alguns entretanto, tem sua origem em sítios diversos (C1 no intestino e monócitos/macrófagos; fator D em tecido adiposo; C7 em granulócitos da medula óssea, etc.). Alterações na produção ou função destas proteínas podem predispor a infecções ou estados pro-inflamatórios. A ativação do complemento pode ocorrer em 3 vias: **clássica, das lectinas e alternativa** (figura 6).

A via clássica, chamada assim pois foi a primeira descoberta, é ativada principalmente quando a proteína C1q se liga a anticorpos IgG e IgM associados a antígenos. A molécula C1q se liga à porção Fc dos anticorpos, ocasionando a ativação das serinoproteinases C1r e C1s, as quais iniciam a cascata proteolítica envolvendo as demais proteínas do complemento. A via alternativa, descoberta após a clássica, é ativada diretamente por antígenos, sem necessidade de anticorpos, através da hidrólise espontânea de C3, o qual se liga ao fator B e permite que o fator D o fracione em Ba e Bb, formando a enzima C3 convertase da via das lectinas. A via das lectinas é ativada pela ligação da lectina ligante de manose (MBL), ficolinas ou colectinas 10 e 11 a polissacarídeos presentes na superfície celular de diferentes patógenos.

A C3 convertase cliva C3, a proteína central do sistema, em C3a e C3b. C3a é liberado, tendo função quimiotática para neutrófilos, continuando o processo inflamatório. C3b liga-se ao antígeno e a outras proteínas do complemento para formar a C5 convertase, a qual cliva o C5 em um peptídeo secretado C5a com função quimiotática e em C5b, o qual fica aderido ao antígeno alvo e inicia a formação de um complexo com as proteínas C6, C7, C8 e C9. Esse complexo se liga a membrana do antígeno alvo é chamado de complexo de ataque a membrana (MAC), o qual leva a lise da célula (figuras 1 e 6).

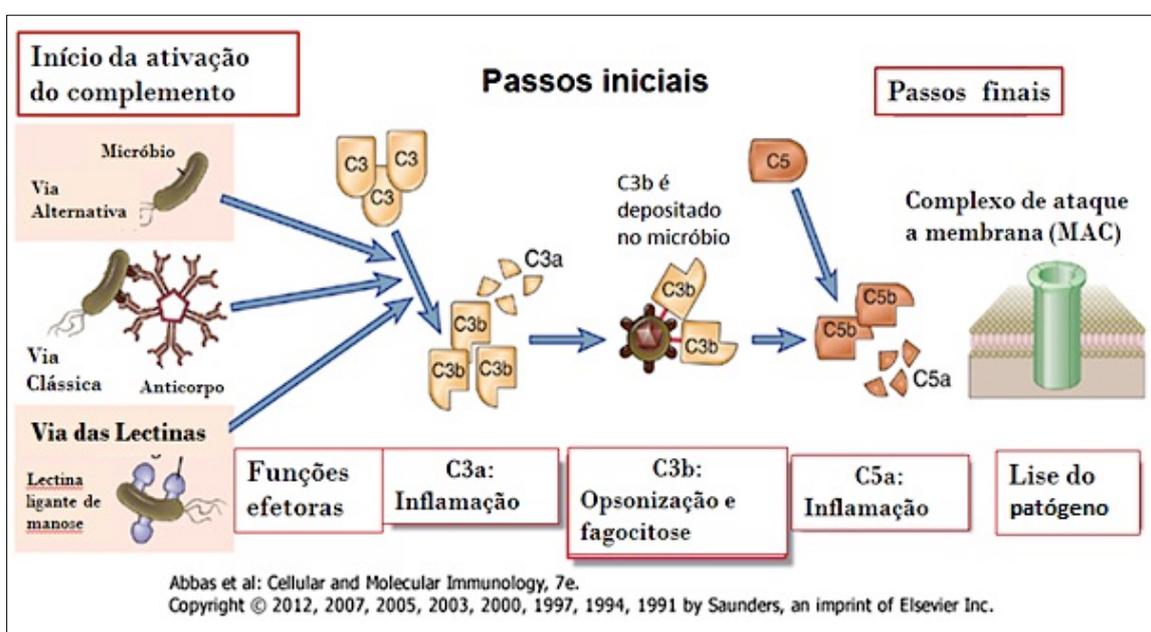


FIGURA 6 – Vias de ativação do Sistema Complemento (adaptado de ABBAS LICHTMAN, ANDREW H., PILLAI, SHIV., 2012).

2.3 SISTEMA COMPLEMENTO NA DMRI

A drusa, conforme descrição no item 2.1.1, é composta por diversas proteínas mas principalmente por proteínas do sistema complemento. Uma resposta inflamatória exacerbada parece contribuir de forma intensa para a gênese da DMRI (DONOSO et al., 2006). Esta hipótese ganha força a medida que variantes gênicas de componentes da via alternativa do complemento aumentam a susceptibilidade a doença, notadamente variações do fator H (EDWARDS et al., 2005; HAGEMAN et al., 2005; UFRET-VINCENTY et al., 2010).

O fator H (FH) é um inibidor da via alternativa agindo em vários pontos destas principalmente inibindo a ligação de C3b ao fator B e consequentemente, à formação da C3 convertase. Alterações na função e variantes genéticas do FH foram relacionadas a diferentes doenças. Deficiência de fator H predispõe a glomerulonefrite por um mecanismo suposto de ativação contínua de C3 próximo a membrana basal dos glomérulos, principalmente em pacientes com LES (lúpus eritematoso sistêmico) (TSUTSUMI et al., 2001). Outra alteração conhecida do FH, caracterizada por um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) rs1061170 no Exon 9 (troca de tirosina por histidina na posição 402 do gene (Y402H) teve uma associação importante com a DMRI (EDWARDS et al., 2005). Pacientes homocigotos para esta mutação apresentaram um risco relativo de quase 7 vezes o de pacientes sem mutação (THAKKINSTIAN et al., 2006). Mais recentemente, outro SNP intrônico rs1410996 do gene do fator H também apresentou uma relação importante com DMRI, também em populações não europeias (LI et al., 2007; MALLER et al., 2006).

Esses estudos demonstram que a via alternativa tem papel bem estabelecido na gênese da DMRI. Ainda outros genes tais como *PLEKHA1*, *ARMS2* e *HtrA1* (*LOC387715*) parecem estar envolvidos na desregulação da via alternativa e envolvidos na DMRI (ROSS et al., 2007). Embora nos Estados Unidos (EUA) o risco atribuível na população (RAP) para polimorfismos do FH varie de 43-68% (JAKOBSDOTTIR et al., 2005); (MAGNUSSON et al., 2005; ZAREPARSI et al., 2005) e para *HtrA1* seja 49,3%, estes polimorfismos não são responsáveis por todos os casos de DMRI com história familiar da doença.

Entretanto, deve-se considerar que o sistema complemento é ativado de forma interdependente pelas suas diferentes vias. Um papel da via das lectinas na lesão celular do EPR foi demonstrada recentemente por Joseph (JOSEPH et al., 2013). No estudo observou-se que a lesão na monocamada de células do EPR dependia da via das lectinas. Na ausência desta via, observou-se que o stress oxidativo foi insuficiente para produção de lesão celular. Somente quando componentes de ambas vias (alternativa e lectinas) foram adicionados, observou-se lesão oxidativa nas células (JOSEPH et al., 2013). Dessa forma, apesar da importância das alterações da via alternativa na lesão celular do EPR, estas parecem não ser suficientes para aumento de risco de DMRI. O objetivo desse estudo foi investigar se componentes da via das lectinas do complemento estariam

presentes na lesão celular inicial da DMRI (stress oxidativo do EPR), assim como ocorre com a via alternativa.

VIA DAS LECTINAS

A via das lectinas é ativada pela proteína plasmática lectina ligante de manose (MBL) que reconhece terminais de polissacarídeos na parede celular dos patógenos. Após esta ligação, as serino-proteinases associadas a MBL (MASPs) 1 e 2, as quais tem funções similares as do C1r e C1s da via clássica (JACK; KLEIN; TURNER, 2001; MESSIAS-REASON et al., 2009), associam-se à MBL para iniciar a cascata proteolítica idêntica à da via clássica (ABBAS LICHTMAN, ANDREW H., PILLAI, SHIV., 2012). Além da MBL, a via das lectinas pode ser ativada pelas ficolinas M, H e L, proteínas com domínio de reconhecimento semelhante ao fibrinogênio e que se associam às MASPs, podendo também levar à ativação da via das lectinas, além das colectinas 10 e 11 (BELTRAME et al., 2015).

Os níveis circulantes de referência dos componentes da via das lectinas estão demonstrados na tabela 1.

2.3.1 MBL – LECTINA LIGANTE DE MANOSE

A MBL é uma proteína plasmática com importante papel no sistema de defesa inato, constituindo um dos componentes iniciadores de ativação da via das lectinas. Atua na neutralização de patógenos independentemente de anticorpos (PETERSEN et al., 2001). A MBL é composta por 3 subunidades polipeptídicas de 32kD ligadas por pontes de dissulfeto, as quais formam polímeros de até 6 unidades (hexâmeros) (JACK; TURNER, 2003; LIM et al., 1994) - figura 7. Cada cadeia é formada por uma região N-terminal rica em cisteína, um segmento semelhante ao colágeno, uma região de pescoço e um domínio carbóxi-terminal ou de reconhecimento de carboidrato (CRD) que é dependente de cálcio.

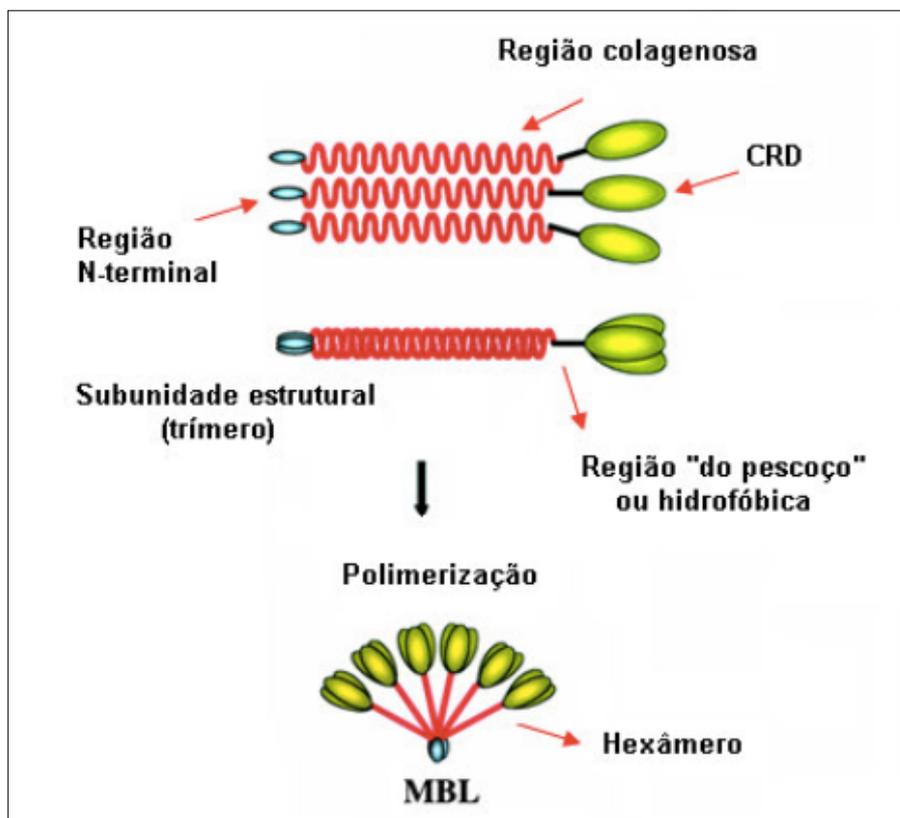


FIGURA 7 – Estrutura da molécula de MBL.

NOTA: Adaptado de (FUJITA, 2002).

A MBL forma complexos com as MASPs 1, 2 e 3 e uma forma “truncada” de MASP2 – a Map19. Sendo que as MASP-1 e 2 estão envolvidas na ativação da cascata do complemento levando a lise direta de microorganismos ou a fagocitose. Já o papel de MASP-3 e Map 19 parece ser regulatório do processo de ativação (WALLIS; CHENG, 1999).

O gene *mb12*, localizado no cromossomo 10 q11.2-q21, possui 4 exons, com 3 pontos de mutação no exon 1 que, geram além da forma selvagem A, outras 3 variantes alélicas: B, C e D. Estas variam conforme a população estudada: variante B é mais frequente entre europeus (29%) e japoneses (37%), enquanto a C é mais comum em africanos (50-60%) e a D é rara em todas as populações (SUMIYA et al., 1991; TSUTSUMI et al., 2001).

Três polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNP's) nos códons 52 (Arg52Cys, alelo D), 54 (Gly54Asp, alelo B) e 57 (Gly57Glu, alelo C) do exon 1 resultam na substituição de um aminoácido diferente na região do colágeno. Esta irá conferir

defeitos na polimerização e conseqüente decréscimo nos níveis sorológicos e funcionais da MBL circulante. Polimorfismos na região promotora do gene *MBL2* (*H/L*, *X/Y*, *P/Q*, nas posições -221, -550 e +4, a partir do início da transcrição, respectivamente) também afetam a concentração de MBL (LIM et al., 1994; MA et al., 2009). Ainda, polimorfismos adicionais na região promotora do gene geram 3 haplótipos: HY (associado a altos níveis séricos de MBL); LY (níveis intermediários) e LX (níveis baixos) (MADSEN et al., 1995; STEFFENSEN et al., 2000). A estrutura genica da MBL pode ser vista na figura 8. O exon 1 codifica a região N-terminal rica em cisteína e parte da região colagenosa, enquanto o exon 2 codifica o restante da região colagenosa. O exon 3 codifica a região hidrofóbica espiralada conhecida como pescoço e o exon 4 o CRD (JACK; TURNER, 2003).

Avanços na biologia molecular têm facilitado a caracterização dos alelos do complemento. A alotipagem (caracterização fenotípica das variantes proteicas) e a genotipagem (caracterização genômica do DNA) são usadas habitualmente. Polimorfismo refere-se à ocorrência simultânea de diferentes genótipos, resultantes da combinação de alelos de um mesmo locus, que podem ou não resultar em diferentes fenótipos. Porém, para que um locus gênico seja considerado polimórfico, o seu alelo mais comum não deve apresentar frequência populacional superior a 99%, de modo que o outro alelo polimorfo tenha frequência igual ou maior que 1%. Entretanto, a definição clássica preconiza que o termo se refira ao gene (ou locus gênico) e não a cada alelo individualmente.

Os valores séricos de MBL apresentam grande variação inter-individual, devido em grande parte aos polimorfismos no exon 1 e região promotora do gene *MBL2*. Essa variação também é observada entre indivíduos com genótipos idênticos de *MBL2* (YTTING et al., 2007). Portanto, não há consenso clínico definitivo do ponto de corte para o valor de referência da MBL. Utiliza-se habitualmente como valor “alto” acima de 1000 ng/mL (1µg/mL), “médio” entre 500-1000 ng/mL (0,5-1µg/mL), “baixo” mas suficiente entre 200-500 ng/mL (0,2-0,5µg/mL) e “muito baixo” e insuficiente abaixo de 100 ng/mL (0,1µg/mL) (GUARDIA; LOZANO, 2003).

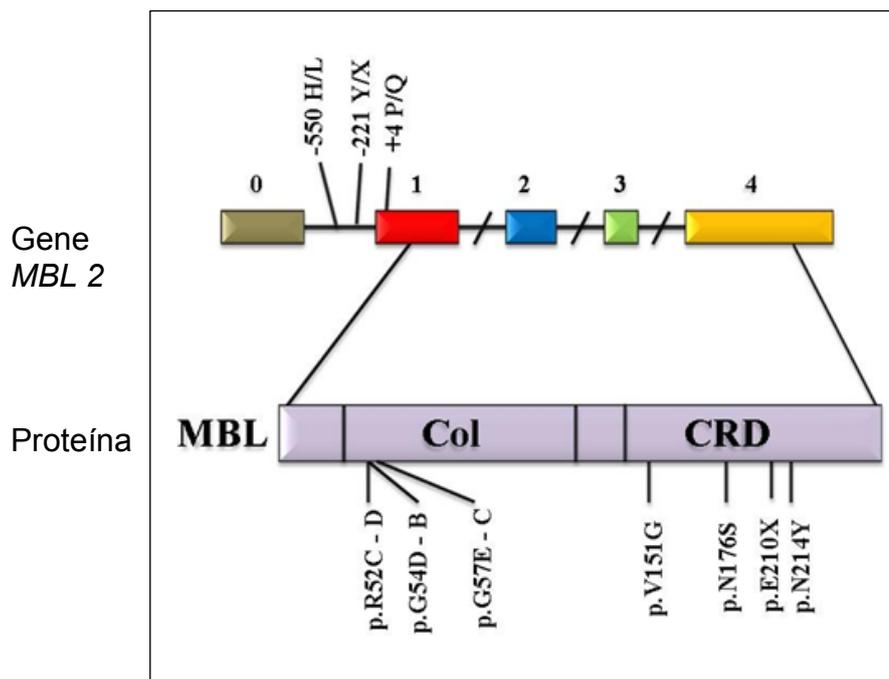


FIGURA 8 – Gene da MBL (MBL 2) com principais polimorfismos e proteína com substituições de aminoácidos. NOTA: Cortesia Dra. Angelica Boldt (2011).

TABELA 1 – Concentrações séricas dos componentes da via das lectinas do sistema complemento.

| Proteína | Concentração sérica (ng/mL) | Função |
|------------|-----------------------------|---|
| MBL | 100-8000 | Liga a resíduos de polissacarídeos na superfície de microrganismos, opsonização |
| MASP-1 | 6000 | Cliva C2 e ativa C3 e MASP-2 |
| MASP-2 | 170-1200 | Forma complexo com MBL e ficolinas, cliva C4 e C2 |
| MASP-3 | 5000 | Função regulatória |
| Map-19 | ? | Função desconhecida |
| Ficolina-L | 13700 | Associa-se as MASPs, ativa a via das lectinas |
| Ficolina-H | 6000-83000 | Associa-se as MASPs, ativa a via das lectinas |

Modificado de (ABBAS LICHTMAN, ANDREW H., PILLAI, SHIV., 2012)

Baixas concentrações ou deficiência de MBL (<100 ng/ml) estão associadas a defeitos de opsonização e fagocitose, resultando em infecções de repetição em recém-nascidos e crianças (GUARDIA; LOZANO, 2003). A frequência estimada de deficiência de MBL é de 5-7% da população geral, caracterizando a imunodeficiência primária mais comum (JACK; KLEIN; TURNER, 2001). Otite média, diarreia crônica e meningite foram as doenças mais frequentemente associadas com deficiência de MBL (FERRARONI, 2010).

Por outro lado, o aumento nos níveis de MBL pode estar associado com condições inflamatórias. Em estudo realizado em amostras de humor aquoso e vítreo de 27 indivíduos, sendo 15 controles com catarata e 12 com alterações oculares inflamatórias – endoftalmite e herpes retiniana, observou-se um aumento significativo das concentrações de MBL nas amostras oculares dos pacientes com condições inflamatórias (CHOW et al., 2011).

Logo, a determinação das concentrações séricas da MBL é útil na avaliação de mecanismos de saúde e doença, para maior entendimento da defesa imune inata e de processos que cursam com inflamação sistêmica. Não é de nosso conhecimento, a existência de estudos relacionando as concentrações de MBL à DMRI.

3 PACIENTES E MÉTODOS

3.1 SELEÇÃO DE PACIENTES

Pesquisa aprovada em setembro de 2011 pelo Comitê de Ética em Pesquisa em seres humanos do Hospital de Clinicas da Universidade Federal do Paraná (Anexo A). Foram examinados 164 pacientes entre novembro de 2011 e novembro de 2013, maiores de 55 anos de ambos os sexos. Os pacientes analisados procuraram espontaneamente o Centro da Visão do Hospital de Clinicas da Universidade Federal do Paraná em busca de consulta oftalmológica.

Apenas pacientes capazes de compreender o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE – Anexo B) foram incluídos conforme os critérios abaixo (cada paciente levou uma cópia assinada do TCLE):

Critérios de inclusão para o grupo de casos:

- Idade maior de 55 anos (inclusive);
- Ter a capacidade de ler e compreender o TCLE;
- Drusas bilaterais grandes confluentes ($>125\ \mu\text{m}$) ou drusas grandes em um olho e olho contralateral com atrofia geográfica macular ($>360\ \mu\text{m}$), sinais de neovascularização de coróide ativa ou cicatrizada (hemorragia subretinianas, descolamento seroso macular, descolamento epitélio pigmentar, fibrose macular, etc.);
- Ausência de outras doenças oculares identificáveis como: opacidades de meios ópticos de qualquer natureza que dificultem ou impossibilitem a avaliação macular (catarata, turvação vítrea, opacidades corneanas); glaucoma diagnosticado ou suspeito, outras patologias do nervo óptico (colobomas, palidez, etc.); doenças retinianas que possam alterar a região macular (estrias angioides, coriorretinopatia serosa central, membrana epirretiniana, oclusões vasculares retinianas, uveíte em atividade, degenerações retinianas (excluindo-se DMRI), etc.);
- Ausência de cirurgias ou procedimentos oculares prévios que possam interferir na acuidade visual e/ou avaliação da região macular;
- Negar uso crônico de medicação ocular ou sistêmica sabidamente tóxicas ao nervo óptico ou retina (Deferoxamina, Cloroquina, Hidroxicloroquina, Tamoxifeno, etc.);
- Não estar usando anti-angiogênico sistêmico (ex: lactato de squalamina, avastin, etc.);
- Negar diabetes ou hipertensão arterial não controlada (uso de medicação e/ou diagnóstico médico prévio)

Critérios de inclusão para o grupo controle:

- Mesmos acima exceto terceiro item.

Os pacientes do grupo de casos foram convidados a participar quando houvesse o diagnóstico de DMRI satisfazendo os critérios de inclusão após consulta prévia no ambulatório de oftalmologia do Hospital de Clínicas da UFPR. Pacientes do grupo controle também foram convidados após consulta ambulatorial de rotina e que satisfizessem os critérios de inclusão para tal.

Critérios de exclusão para os casos de DMRI:

- Idade menor de 55 anos (exclusive);
- Incapacidade de ler e compreender o TCLE;
- Drusas bilaterais pequenas (<125 μm) em um olho sem sinais de drusas grandes (>125 μm) ou membrana neovascular subretiniana ativa (hemorragia subretiniana, descolamento seroso macular, descolamento epitélio pigmentar, fibrose macular, etc.) ou cicatrizada em olho contralateral ou atrofia geográfica macular < de 360 μm em olho contralateral;
- Retinopatia diabética em qualquer grau;
- Ambliopia suspeita em qualquer olho;
- Presença de outras patologias oculares identificáveis como: opacidades de meios ópticos de qualquer natureza que dificultem ou impossibilitem a avaliação macular (catarata, turvação vítrea, opacidades corneanas); glaucoma diagnosticado ou suspeito; outras patologias do nervo óptico (colobomas, palidez, etc.), doenças retinianas que possam alterar a região macular: (estrias angioides, coriorretinopatia serosa central, membrana epirretiniana, oclusões vasculares retinianas, uveíte em atividade, degenerações retinianas – exceto DMRI, etc.);
- Cirurgias ou procedimentos oculares prévios que possam interferir na acuidade visual e/ou avaliação da região macular;
- Necessidade de uso crônico de medicação ocular ou sistêmica sabidamente tóxicas ao nervo óptico ou retina (Deferoxamina, Cloroquina, Hidroxicloroquina, Tamoxifeno, etc.);
- Paciente usando anti-angiogênico sistêmico (ex: lactato de squalamina, avastin, etc.)

Critérios de exclusão para o grupo controle:

- Idade menor de 55 anos (exclusive);
- Incapacidade de ler e compreender o TCLE;
- Presença de patologias oculares identificáveis como: opacidades de meios ópticos de qualquer natureza que dificultem ou impossibilitem a avaliação

macular (catarata, turvação vítrea, opacidades corneanas); glaucoma diagnosticado ou suspeito; outras patologias do nervo óptico (colobomas, palidez, etc.); doenças retinianas que possam alterar a região macular (estrias angioides, coriorretinopatia serosa central, membrana epirretiniana, oclusões vasculares retinianas, uveíte em atividade, degenerações retinianas (incluindo-se DMRI em qualquer estagio), retinopatia diabética em qualquer grau, etc.;

- Ambliopia suspeita em qualquer olho;
- Presença de cirurgias ou procedimentos oculares prévios que possam interferir na acuidade visual e/ou avaliação da região macular;
- Estar em uso crônico de medicação ocular ou sistêmica sabidamente tóxicas ao nervo óptico ou retina (Deferoxamina, Cloroquina, Hidroxicloroquina, Tamoxifeno, etc.);
- Estar usando anti-angiogênico sistêmico (ex: lactato de squalamina, avastin, etc.).

3.2 COLETA DE DADOS

Para o exame oftalmológico, foi usada a melhor acuidade visual corrigida, sempre na mesma sala de exame utilizando 2 métodos: tabela de optotipos de Snellen (projedor) e tabela do ETDRS modelo “2” conforme a figura 9. Os exames de acuidade visual eram feitos sem midríase.

Após a acuidade visual, os pacientes eram submetidos a biomicroscopia em lâmpada de fenda para avaliar transparência corneana, cristalíniana e demais fatores que pudessem excluí-los conforme os critérios anteriormente citados. Foram submetidos então a tonometria de aplanção com tonômetro de Goldmann e então feita midríase com 1 a 2 gotas de tropicamida 1%.



FIGURA 9 – Tabela de avaliação da Acuidade Visual – ETDRS “Chart 2”

3.3 EXAME DE BIOMICROSCOPIA E FUNDO DE OLHO

Previamente à midríase, foi realizada biomicroscopia em lâmpada de fenda. Excluíam-se os pacientes que apresentassem quaisquer alterações que dificultassem a visualização retiniana, conforme descrito nos critérios de inclusão e exclusão.

Após midríase, os pacientes foram submetidos ao exame de mapeamento de retina com oftalmoscópio indireto e lente de 20 dioptrias e também biomicroscopia de fundo em lâmpada de fenda com uma lente de 78 dioptrias. Neste exame, dois especialistas em retina e vítreo faziam a avaliação das alterações retinianas e classificavam a DMRI (para grupo de casos) e confirmavam a ausência de alterações no grupo controle.



FIGURA 10 – Lâmpada de fenda Topcon SL-1E, lente de 78 dioptrias Volk e Oftalmoscópio Indireto Heine EN30.

3.4 TOMOGRAFIA DE COERÊNCIA ÓPTICA (OCT)

Todos os pacientes (casos e controles) foram submetidos a um OCT no Centro da Visão - HC-UFPR. O protocolo estabelecido usou como base o critério da “*University of Wisconsin – School of Medicine and Public Health – Fundus Photograph Reading Center – Non-study Specific Stratus Optical Coherence Tomography (OCT 3)*” (DEPARTMENT OF OPHTHALMOLOGY AND VISUAL SCIENCES, 2011)

Para cada paciente foram feitas duas imagens por olho (figura 11):

- Fast Macular Thickness Map
- 6mm Cross Hair

Para fins de documentação, as imagens eram consideradas aceitáveis quando:

- Captura centrada na macula;
- As bordas retinianas (linhas brancas) deveriam estar logo acima da membrana limitante interna e logo acima do epitélio pigmentar da retina;
- Qualidade de imagem (“nota”) mínima de 6.

O aparelho usado foi um Zeiss Stratus OCT (figura 11), software versão 4.0.2 (0056), Macular Normative Data Feature MAC-3244.

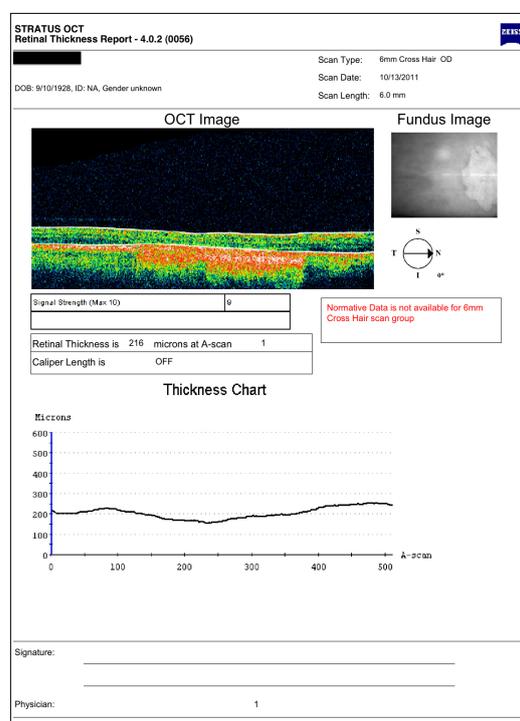
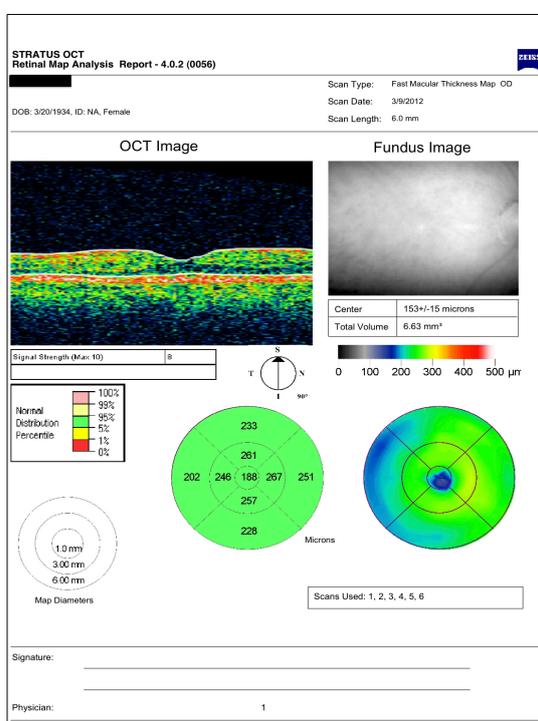


FIGURA 11 – Exemplo de caso de DMRI exsudativa cicatrizada (esquerda) e controle (direita) capturado pelo OCT.

3.5 ANGIOGRAFIA FLUORESCEINICA

Alguns pacientes, para elucidação diagnóstica ou controle pós tratamento, eventualmente necessitaram de angiografia fluoresceinica. Para tal, também foi usado o protocolo da “*University of Wisconsin – School of Medicine and Public Health – Fundus Photograph Reading Center – Non-study Specific Standard 35mm Film Fluorescein Angiography*” (DEPARTMENT OF OPHTHALMOLOGY AND

VISUAL SCIENCES, 2012). Este procedimento, no entanto, foi um procedimento de exclusão, devido aos riscos envolvidos pelo contraste.

O aparelho usado neste procedimento foi Topcon TRC50x (figura 11), com contraste de fluoresceína sódica a 20% (Oft vision[®], Tatuapé, São Paulo, Brasil), injetada em veia antecubital com agulha 26Gauge (0,45x13mm) e seringa plástica de 5mL.



FIGURA 12 – Angio-retinógrafo Topcon TRC50x.

3.6 COLETA DE SANGUE

Para todos os pacientes selecionados, foram coletadas amostras de sangue venoso periférico. As amostras foram coletadas e processadas no Laboratório de Imunopatologia – HC – UFPR. Para tal foi puncionada uma veia antecubital após garroteamento proximal com agulha 22Gauge (0,70x25mm) ou 26Gauge (0,45x0,13mm) (ambas BD[®]), sendo o sangue colocado em 2 frascos, 1 para obtenção de soro (Gel BD SST[®] II Advance; 16x100mm; 8,5mL; Ref. 367953) e 1 com EDTA para obtenção de plasma (EDTA K2; 13x75mm; 4mL; Ref 367861).

Todos os frascos eram etiquetados somente com o número de controle e sempre processadas no mesmo dia no Laboratório de Imunopatologia do HC-UFPR. Após centrifugação, as amostras de soro, plasma e anel leucocitários foram

fracionadas em alíquotas e armazenadas em temperatura -80°C até serem utilizadas.

3.7 QUANTIFICAÇÃO DA MBL SÉRICA

Para a quantificação da MBL sérica foi usado o método imunofluorométrico (Time-Resolved Immunofluorometric – “TRIFMA”). As amostras foram encaminhadas à Universidade de Aarhus - Dinamarca, ao Dr Jens Jensenius, após resfriamento à -96°C , acondicionamento e transporte por via aérea. De maneira sucinta, a técnica empregou placas de microtitulação (FluoroNunc MaxiSorp, Nunc, Kamstrup, Denmark) revestidas com $1\ \mu\text{g}$ de manose em $100\ \mu\text{L}$ de tampão de bicarbonato pH 9,6. Sítios de ligação dos resíduos de manose foram bloqueados pela adição de $200\ \mu\text{g}$ de albumina de soro humano (HSA, Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark) em $200\ \mu\text{L}$ de “Tris-buffered saline - TBS” (10mMTris–HCl, 140 mM NaCl, 15 mM NaN_3 , pH 7.4), TBS/HSA por poço, durante 1 hora a temperatura ambiente. As amostras de plasma foram diluídas 20 ou 100 vezes em tampão com alta concentração salina (20 mM Tris, 1 M NaCl, 0.05% (v/v) Triton X-100, 10 mM CaCl_2 , 0.1% (w/v) HSA, pH 7,4) e adicionadas aos poços em duplicatas de $100\ \mu\text{L}$. As amostras foram incubadas a 4°C por 18h, os poços foram lavados 3 vezes antes da adição de 100 ng de anticorpo monoclonal anti-CRD (domínio de reconhecimento de carboidrato) de MBL conjugado com europium (Hyb 131-01, Antibody Shop, Copenhagen, Denmark) em $100\ \mu\text{L}$ de TBS/Tween/25 μM EDTA (TBS contendo 0.05%(v/v) Tween 20, 25 μM EDTA) por 1 hora em temperatura ambiente.

Após a lavagem, uma solução de aprimoramento (PerkinElmer, Wallac®, Massachusetts, USA) foi adicionada e os sinais aferidos por fluorometria com tempo resolvido em um fluorometro Delfia 1232 (PerkinElmer,Wallac®, Massachusetts, USA). O anticorpo monoclonal Hyb 131-01 foi marcado com íons de europium usando reagentes e procedimentos da Perkin Elmer. Isto proporciona o acoplamento do quelato de Eu^{3+} do N1-(p-isotiocianatobenzila)dietilenetriamina-N1, N2, N3-ácido tetraacetico. O grupo DTTA (ácido dietilenetriaminotetraacetico) forma um complexo estável com os íons de europium e o grupo isotiocianato reage com os grupos de aminas livres nas proteínas, formando uma ligação covalente tio-ureia estável. Diluições de plasma padrão contendo $3,6\ \mu\text{g}$ MBL/mL, assim como amostras de

MBL de baixa, média e alta concentração foram incluídas como controle interno em cada placa de microtitulação (figura 12). As quantificações de MBL dos soros testes foram determinadas através de cálculo utilizando-se a curva padrão.

A sequência completa deste procedimento pode ser observada no “Anexo C”.

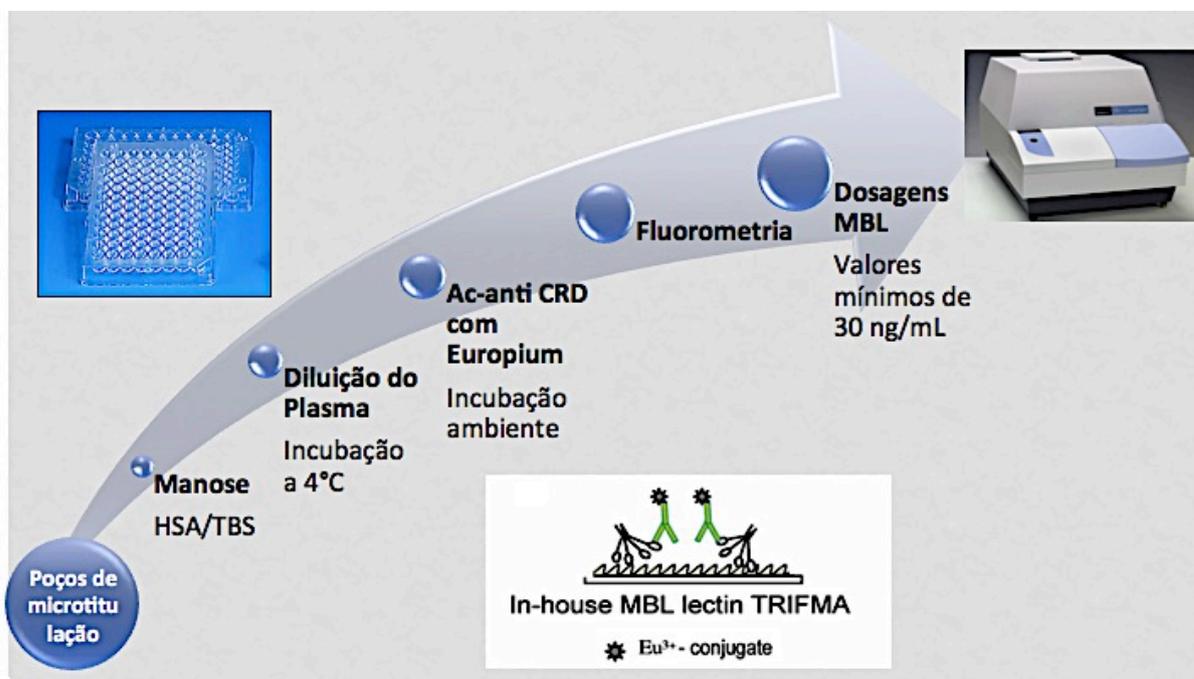


FIGURA 13 – Quantificação de MBL pelo método TRIFMA (FREDERIKSEN et al., 2006).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para cálculo de tamanho amostral, foi utilizado o programa Microsoft Excel for Mac 2011 com planilha disponível em (CAMPOS, [s.d.]) e dados populacionais disponíveis no IBGE para Curitiba (“IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística”, 2014). Para a análise estatística, foi usado inicialmente o programa “Assistat v7.7[®]”. O teste de Kolmogorov-Smirnov (IC 95%, significância estatística $p < 0,05$) demonstrou uma relação não paramétrica entre os grupos. Utilizou-se então o “GraphPad Prism 6 – GraphPad Software[®]”, teste de Mann-Whitney para comparar os grupos (controles e casos; exsudativa e seca). Outros dados demográficos como sexo, etnia, idade, IMC e tabagismo foram analisadas usando o mesmo software com base em correlações de Spearman, teste exato de Fisher ou Qui-quadrado (IC 95%, $p < 0,05$).

4 RESULTADOS

Foram incluídos neste estudo 126 pacientes, sendo que o grupo controle foi constituído por 68 pacientes sem alterações oculares identificáveis, enquanto o grupo de casos incluiu 68 pacientes com DMRI (34 com DMRI não exsudativa e 34 com DMRI exsudativa). Sessenta e três pacientes com DMRI eram de origem europeia (93%) e 5 (7%) não europeus. Ainda no grupo de DMRI, 33 (49%) eram do sexo masculino e 35 (51%) do sexo feminino, enquanto nos controles, 27 (40%) eram do sexo masculino e 41 (60%) feminino. A idade média (\pm DP) no grupo de DMRI foi de 73 anos (\pm 8,17 anos) e 67 (\pm 8,10 anos) nos controles. O tabagismo foi similar em ambos os grupos, sendo mais alto, porém sem significância estatística, no grupo controle (37%) em relação aos casos (29%). Ainda, houve uma maior proporção de pré-obesos e obesos em relação aos não-obesos em ambos os grupos, com maior frequência nos controles porém sem diferença significativa entre eles. Os dados demográficos dos casos e controles estão demonstrados na tabela 2.

TABELA 2 – Dados demográficos dos pacientes portadores de DMRI e controles.

| Características | Controles (%) N = 68 | DMRI (%) N = 68 | Valor p |
|--------------------------|---------------------------------|----------------------------|--------------------|
| Etnia | | | |
| Europeia | 63 (93%) | 63 (93%) | 1,000* |
| Não Europeia | 5 (7%) | 5 (7%) | |
| Sexo | | | |
| Masculino | 27 (40%) | 33 (49%) | 0,3001* |
| Feminino | 41 (60%) | 35 (51%) | |
| Tabagismo** | | | |
| Sim | 25 (37%) | 20 (29%) | 0,3622* |
| Não | 43 (63%) | 48 (71%) | |
| IMC | | | |
| Normal | 24 (35%) | 31 (46%) | 0,073* |
| Pré-obeso | 27 (40%) | 30 (44%) | |
| Obeso | 17 (25%) | 7 (10%) | |
| Idade média (±DP) | 67 (±8,10) | 73 (±8,20) | 0,3365*** (r 0,12) |

* Qui-quadrado / ** Maior de 1 ano-maço / ***Spearman

Os níveis medianos de MBL observados foram de 739 ng/mL (217 a 1632 ng/mL; 25 – 75%) nos controles e de 608 ng/mL (225 a 1464 ng/mL; 25 – 75%) nos casos de DMRI. Os valores de MBL circulante entre casos e controles não demonstrou diferença estatisticamente significativa; $p = 0,4770$ (teste de Mann-Whitney) (gráfico 1; tabela 3).

GRAFICO 1 – Concentrações de MBL sérica (ng/mL) em casos de DMRI e controles.

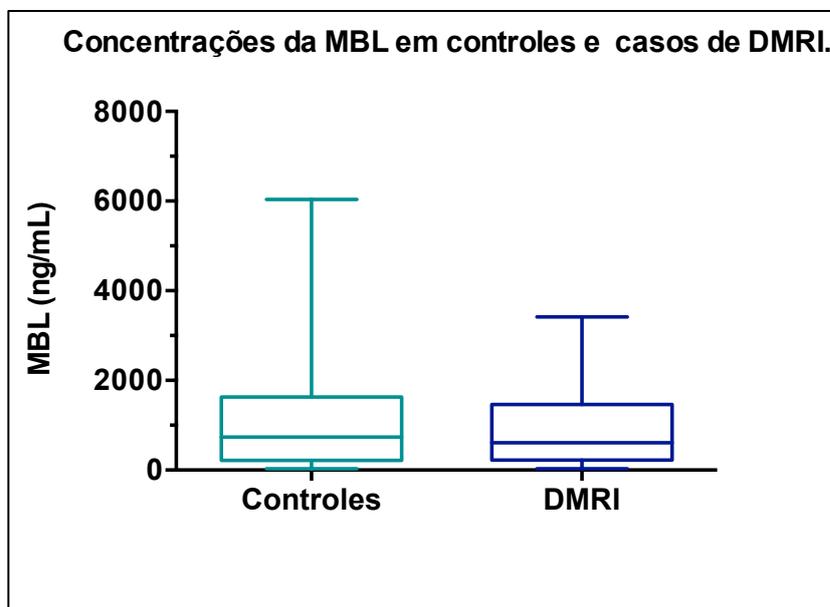


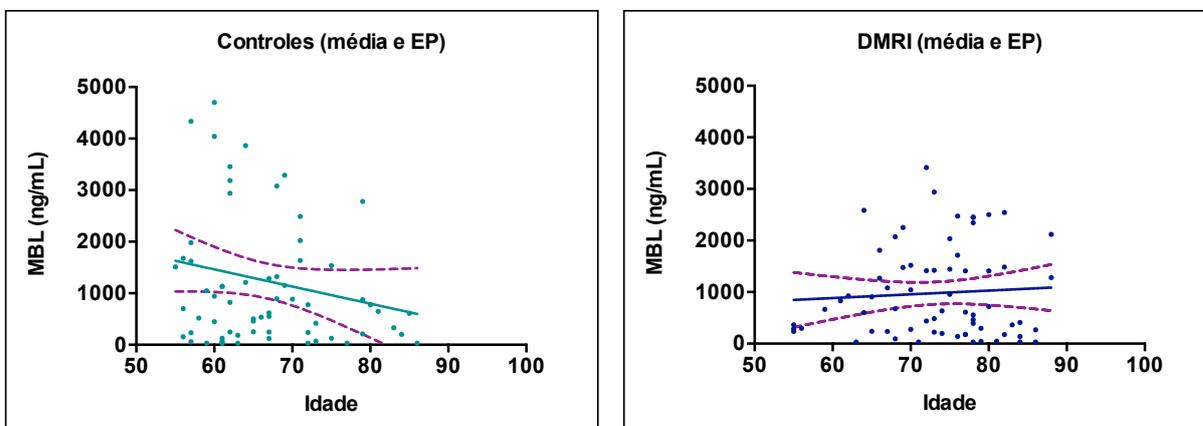
TABELA 3 – Concentrações de MBL sérica em casos de DMRI e controles.

| | DMRI MBL (ng/mL) N = 68 | Controles MBL(ng/mL) N = 68 | Valor p* |
|-----------------|--------------------------------------|--|-----------------|
| Mediana | 608 | 739 | |
| 25 – 75% | 225 - 1464 | 217 – 1632 | 0,4770 |
| Mínimo – Máximo | 30 – 3415 | 30 – 6039 | |

*Teste de Mann-Whitney.

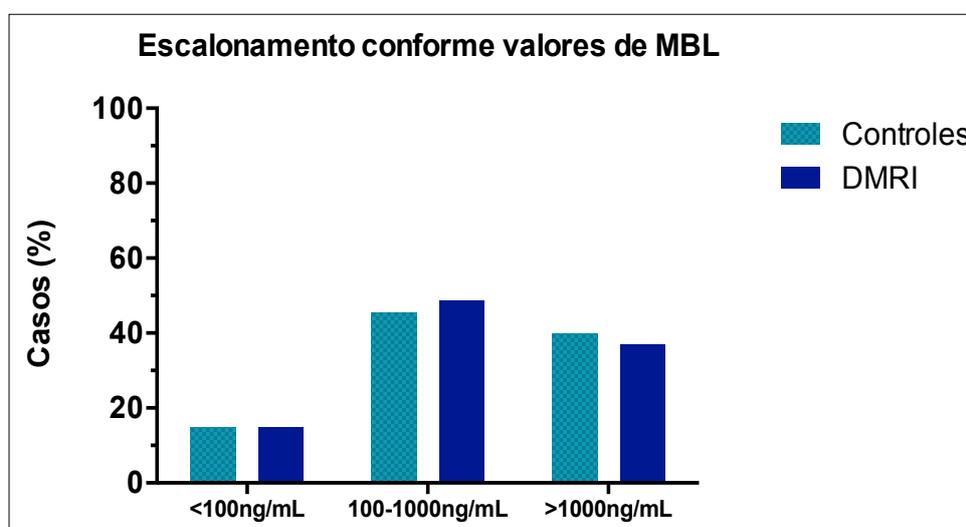
O aumento da idade mostrou tendência de diminuição nos níveis de MBL nos controles (Spearman, $r = -0,14$, $p = 0,2576$), porém não nos casos de DMRI (Spearman, $r = -0,051$, $p = 0,6779$) (gráfico 2).

GRAFICO 2 – Correlação entre idade e níveis de MBL nos controles e casos de DMRI.



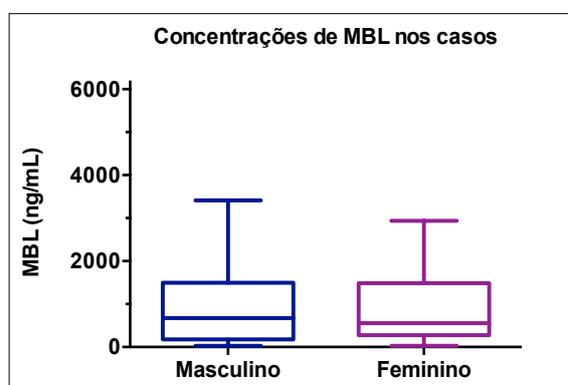
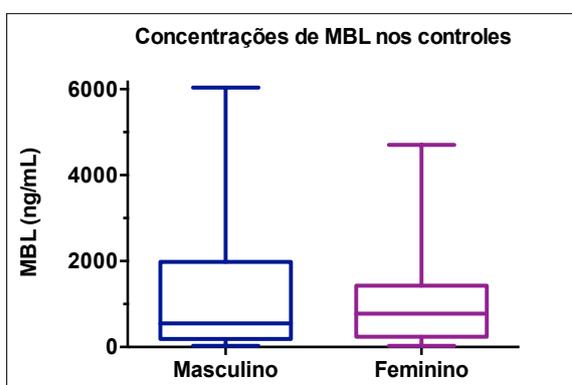
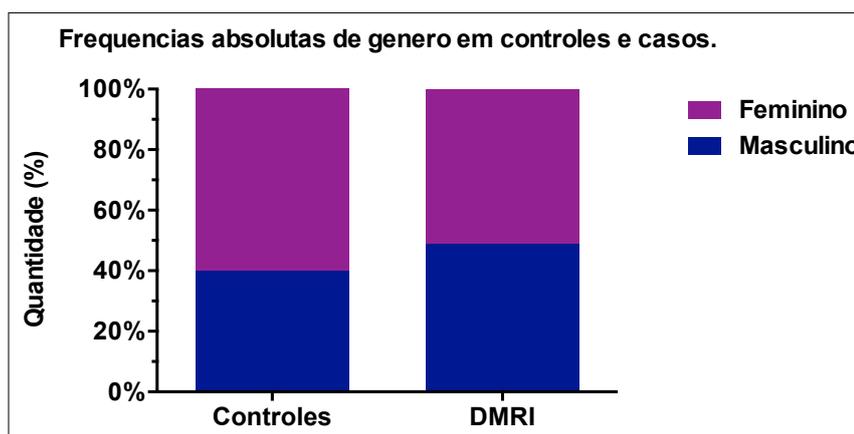
Ao estratificarmos os casos e controles por grupos conforme os níveis de MBL considerados baixos (<100 ng/mL), médios ou normais (100-1000ng/mL) e altos (>1000 ng/mL); a distribuição desses foi semelhante entre pacientes com DMRI e controles. Em ambos grupos, aproximadamente 15% deles apresentaram baixos níveis de MBL, 45% dos controles e 48% dos casos com níveis médios e 40% dos controles e 37% dos casos com altos níveis da proteína (gráfico 3).

GRAFICO 3 – Estratificação de pacientes com DMRI e controles de acordo com variação nos níveis de MBL.



Os níveis de MBL também não diferiram tanto nos controles como nos casos em relação ao gênero (embora discretamente maior nos homens de ambos os grupos). Nos casos de DMRI, observou-se mediana de MBL de 676 ng/mL (± 163 EP ng/mL – intervalo de 30 – 3415 ng/mL) em 33 homens e de 557 ng/mL (± 144 EP ng/mL – intervalo de 30 – 2938 ng/mL) em 35 mulheres, resultando em valor p de 0,9102 (Mann-Whitney). Já nos controles, a mediana de MBL nos indivíduos masculinos foi de 552 ng/mL (± 316 EP ng/mL – intervalo de 30 – 6039 ng/mL) e de 778 ng/mL nas mulheres (± 196 EP ng/mL – intervalo de 30 – 4703 ng/mL), $p = 0,9627$ (teste de Mann-Whitney) (gráfico 4).

GRAFICO 4 – Frequências absolutas de gênero em relação aos níveis de MBL em pacientes com DMRI e controles.



Ao avaliarmos os dados demográficos e características clínicas entre os pacientes com DMRI não-exsudativa ou seca e pacientes com DMRI exsudativa, observou-se frequência alta de europeus em ambos os grupos (>90%), semelhança na distribuição do gênero (aproximadamente 50% em ambos os grupos), tabela 4. Uma proporção menor de tabagistas foi observada na DMRI seca (29%) em relação a exsudativa (44%). Observou-se maior frequência de indivíduos pré-obesos e obesos em relação a não obesos em ambos os grupos (>50% em cada grupo). Em relação a idade, não houve diferença significativa, sendo a média de 73 anos para ambos os grupos. O avanço da idade também não influenciou de forma significativa os níveis de MBL. Uma discreta elevação dos níveis de MBL com a idade foi observada na DMRI seca (Spearman, $r = 0,26$, $p = 0,1374$) e diminuição na exsudativa (Spearman, $r = -0,22$, $p = 0,2059$), conforme gráfico 5.

GRAFICO 5 – Correlação entre idade e níveis de MBL na DMRI seca e exsudativa.

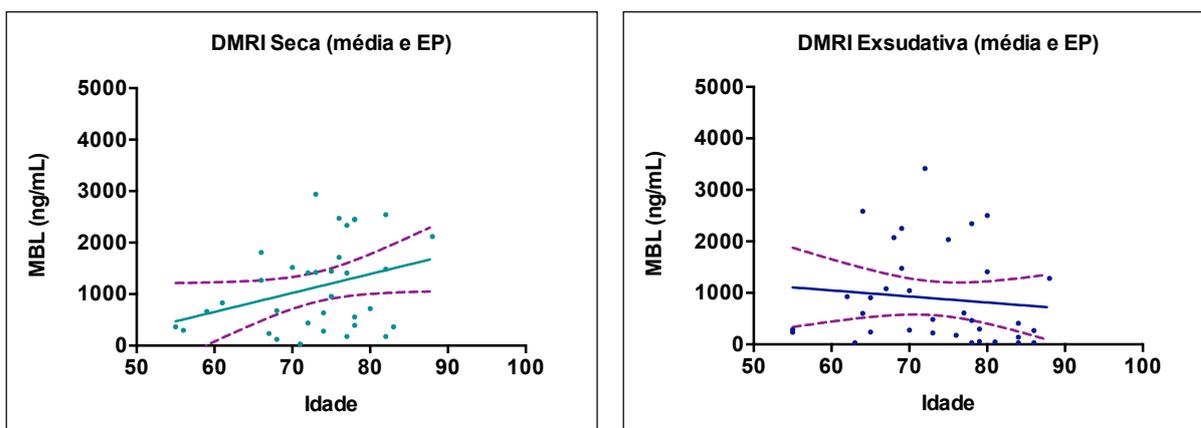


TABELA 4 – Dados demográficos de portadores de DMRI seca e exsudativa.

| Características | DMRI Seca (%) N = 34 | DMRI Exsudativa (%) N=34 | Valor p |
|--------------------------|---------------------------------------|---|--------------------|
| Etnia | | | 1,000* |
| Europeu | 31 (91%) | 32 (94%) | |
| Não Europeu | 3 (9%) | 2 (6%) | |
| Sexo | | | 0,8083** |
| Masculino | 16 (47%) | 17 (50%) | |
| Feminino | 18 (53%) | 17 (50%) | |
| Tabagismo*** | | | 0,2086** |
| Sim | 10 (29%) | 15 (44%) | |
| Não | 24 (71%) | 19 (56%) | |
| IMC | | | 0,0906** |
| Normal | 16 (47%) | 15 (44%) | |
| Pre-obeso | 12 (35%) | 18 (53%) | |
| Obeso | 6 (18%) | 1 (3%) | |
| Idade média (±DP) | 73 (±7,70) | 73 (±8,80) | 0,5505****(r 0,11) |

*Teste exato de Fisher / **Qui-quadrado / *** Maior de 1 ano-maço / ****Spearman

Com relação às concentrações séricas de MBL entre os subtipos de DMRI, observou-se nos casos de DMRI seca uma mediana de 893 ng/mL (365 – 1738 ng/mL; 25 – 75%) e nos casos de DMRI exsudativa, mediana de 476 ng/mL (211 – 1428; 25 – 75%). No entanto, não houve diferença estatística; p = 0,101, gráfico 6, tabela 5).

GRAFICO 6 – Comparação dos níveis de MBL sérica nos subtipos de DMRI.

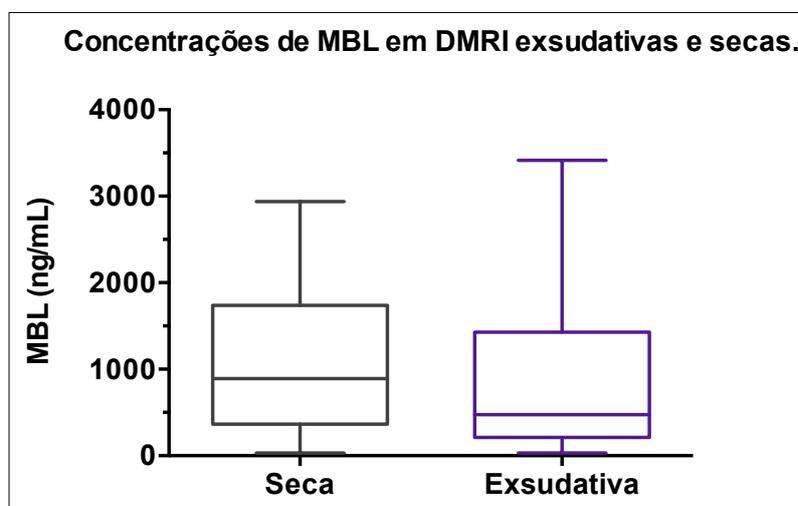


TABELA 5 – Comparação dos níveis de MBL sérica nos subtipos de DMRI.

| | Seca (MBL ng/mL) N = 34 | Exsudativa (MBL ng/mL) N = 34 | Valor p* |
|-----------------|--------------------------------------|--|-----------------|
| Mediana | 893 | 476 | |
| 25 – 75% | 365 – 1738 | 211 – 1428 | 0,1011 |
| Mínimo – Máximo | 30 - 2938 | 30 - 3415 | |

*Teste Mann-Whitney.

5 DISCUSSÃO

Embora não existam dados epidemiológicos oficiais sobre a prevalência da DMRI no Brasil, essa doença certamente encontra-se em expansão no nosso meio. Apenas dois trabalhos relatam a sua prevalência em grupos distintos no país. Em pacientes orientais maiores de 60 anos de Londrina - PR (OGUIDO, 2004), observou-se aproximadamente 15% de todas formas de DMRI e 1,3% de formas tardias. Já em pacientes maiores de 80 anos de Veranópolis – RS, observou-se uma prevalência de 31,50% de DMRI. No entanto, deve-se ressaltar que os métodos utilizados para diagnóstico nesses estudos não são os adotados internacionalmente (ROMANI, 2005).

O aumento da expectativa de vida, exposição solar, tabagismo, obesidade, entre outros, tendem a elevar substancialmente o número de casos de DMRI nos próximos anos, tanto no Brasil como em todo mundo. Notadamente na região sul, com composição étnica semelhante a europeia, a DMRI deverá brevemente tornar-se uma importante causa de cegueira legal. No presente estudo monitoramos todos os pacientes (num total de 6155 pacientes) que, nestes dois anos, procuraram o Centro da Visão do Hospital de Clínicas - UFPR em busca de consulta oftalmológica. Durante esse período um total de 346 pacientes foram diagnosticados com doenças diversas de retina (5,6% do total) e destes, 68 tiveram diagnóstico de DMRI, o que representaria uma prevalência aproximada de 1,1% de DMRI nos indivíduos atendidos nesse Centro.

Estima-se que em Curitiba, a população de adultos maiores de 55 anos seja de aproximadamente 285.000 indivíduos conforme dados do IBGE (“IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística”, 2014). Considerando-se uma prevalência de 6% de DMRI (IC 95%, erro de $\pm 5\%$), uma amostra significativa desta população, seria 87 indivíduos. Devido à idade normalmente avançada dos pacientes que apresentam DMRI, esses frequentemente apresentam comorbidades tais como: hipertensão arterial sistêmica (HAS), diabetes do tipo 2, além de uso de medicações diversas, entre outros. Dessa forma, apenas uma pequena parcela desses pacientes irá apresentar alterações retinianas, devido exclusivamente a DMRI. Por consequência desses fatores e respeitando-se os critérios de exclusão, após 24 meses de acompanhamento no Centro da Visão - HC-UFPR, somente 68 casos de

DMRI puderam ser incluídos no estudo. Esse número é equivalente a IC 91%, erro de $\pm 5\%$, considerando-se uma prevalência de DMRI de 6%.

As alterações do sistema complemento, tanto relativas a ativação quanto a deficiência, tem uma relação estreita com a atividade inflamatória sistêmica. Existe uma associação bem estabelecida entre a DMRI e a ativação do sistema complemento. Sendo que a via alternativa é a melhor estudada, especialmente os polimorfismos do gene do fator H, em todas as formas da doença (HAGEMAN et al., 2005; KLEIN et al., 2011). Mesmo havendo, pelo menos em modelos murinos, pouca expressão retiniana de componentes da via das lectinas (LUO; CHEN; XU, 2011), o sistema complemento é necessário como um todo para o desenvolvimento da DMRI, principalmente a forma exsudativa (ROHRER et al., 2012); uma vez que as três vias (clássica, alternativa e das lectinas) convergem para o mesmo produto final: ativação de C3 e C5 e formação do complexo lítico de membrana.

Recentemente demonstrou-se que a ativação isolada da via alternativa não foi capaz de produzir lesão oxidativa celular de células do epitélio pigmentado da retina (EPR). Porém, ao associar-se a ativação da via alternativa a via das lectinas, houve lesão oxidativa das células do EPR (JOSEPH et al., 2013). A via das lectinas do sistema complemento, em cuja ativação a MBL exerce fundamental papel, ainda é pouco estudada em relação a fisiopatologia da DMRI. A MBL se liga a carboidratos presentes na superfície de patógenos levando à opsonização e fagocitose, e ativa a cascata do complemento que culmina com a lise celular e resposta inflamatória. As concentrações séricas de MBL são geneticamente determinadas e, quando baixas, aumentam a susceptibilidade especialmente a infecções por microrganismos extracelulares (NISIHARA et al., 2010). Por outro lado, no caso de patógenos intracelulares que usam a opsonização por complemento para adentrar as células como o *Mycobacterium leprae*, uma baixa concentração de MBL pode promover certa “proteção natural” (JACK; KLEIN; TURNER, 2001). Ainda, altas concentrações de MBL estão associadas a doenças que cursam com inflamação crônica, como cardite reumática (SCHAFRANSKI et al., 2004), nefropatia por IgA (ENDO et al., 1998) e diabetes tipo 2 (HANSEN et al., 2003). Considerando o importante papel da reação inflamatória no desenvolvimento da DMRI, pode-se especular a participação da MBL ou ativação da via das lectinas no processo imunopatológico dessa doença. Esta possibilidade se baseia no fato que a glomerulonefrite membranosa do tipo 2, doença renal mediada pelo sistema complemento, produz drusas retinianas

idênticas histologicamente às encontradas na DMRI (GEHRS et al., 2010). Portanto, o estudo da via das lectinas e de seus componentes incluindo a MBL, além de polimorfismos gênicos poderia fornecer informações importantes sobre o risco associado a doença, além de eventualmente contribuir para um tratamento precoce e personalizado. Dessa forma, portadores de variantes genéticas de maior risco a doença poderiam ser observados e orientados precocemente quanto à exposição aos fatores externos modificáveis normalmente envolvidos na patogênese da DMRI (GROUP, 2001).

Como ainda não foram publicados estudos na população brasileira sobre a prevalência e concentrações de MBL na DMRI, as comparações foram realizadas neste estudo com dados obtidos em outras populações. Sabe-se que os níveis de MBL atingem seu pico por volta de um mês de idade (AITTONIEMI et al., 1996) e diminuem após os 40 anos de idade (IP et al., 2004). De fato, na população investigada, os níveis de MBL foram significativamente mais baixos do que os níveis normais observados em adultos saudáveis. Vale ressaltar que a idade média dos pacientes foi de 73(\pm 8,20) anos e controles era 67(\pm 8,10) anos e que a concentração de MBL teve uma tendência de diminuição com aumento da idade, principalmente no grupo controle, o que corrobora o fato da diminuição dos níveis séricos da proteína com o passar do tempo. Em relação ao sexo, níveis discretamente maiores de MBL foram observados nos pacientes do sexo masculino, porém não nos controles.

Devido à presença de comorbidades em idosos, já anteriormente referido, e de possíveis alterações do sistema complemento associados a essas (UTIYAMA, 2004), foi necessário um critério restrito para inclusão dos casos neste estudo. Portanto, os pacientes com DMRI não apresentavam outras comorbidades no momento de sua inclusão no estudo. Uma menor concentração de MBL foi observada nesses casos em relação aos controles. Interessante também que, os pacientes com a forma mais grave, DMRI exsudativa, apresentaram níveis ainda mais baixos de MBL. Porém não houve associação com a deficiência de MBL. Pode-se inferir que alguns componentes do complemento incluindo MBL, estejam sendo “consumidos” devido a ativação do complemento e maior atividade inflamatória na DMRI, ou que haja menor produção proteica (JOHNSON et al., 2001b). Assim, a diminuição dos níveis de MBL na DMRI poderia estar associada a doença, tal como ocorre com doenças vasculares (BEST et al., 2004). Interessante

ressaltar que, para doenças ateroscleróticas, existe uma relação de aumento de risco com baixos níveis de MBL (BEST et al., 2004), o que poderia também estar presente na DMRI. Além disso, uma possível causa para o achado de menores concentrações de MBL na DMRI poderia ser a presença de variantes genéticas associadas a deficiência da proteína nestes pacientes. Esse fato poderá ser confirmado com a investigação de polimorfismos do gene *MBL2*. No entanto, deve-se ressaltar que os resultados obtidos não alcançaram diferenças estatisticamente significantes, provavelmente devido ao tamanho do número amostral. Estudos futuros incluindo maior número de pacientes devem ser realizados a fim de se confirmar a relação de baixas concentrações de MBL com DMRI.

Sabe-se que a evolução da DMRI para casos graves, como a doença exsudativa, está associada com intensa atividade inflamatória. No presente estudo, concentrações séricas menores de MBL foram observadas nos pacientes com DMRI exsudativa em relação àqueles com DMRI seca. É provável que a MBL esteja participando *in situ* desse processo inflamatório, e por conta disso, seus níveis circulantes estariam mais diminuídos ainda na forma mais grave da doença. No entanto, essa hipótese só poderá ser confirmada em futuros estudos que incluam um número amostral mais expressivo de pacientes com as diferentes formas clínicas da doença.

O mecanismo fisiopatológico exato que ocorre na DMRI permanece ainda obscuro. Sabe-se que fatores ambientais e genéticos atuam em conjunto na sua etiopatogenia, como na maioria das doenças complexas. A importância do sistema complemento na DMRI é reconhecida, sendo, portanto, promissoras estratégias utilizando intervenções no sistema complemento, tanto na prevenção como no tratamento da doença.

No nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho sobre concentrações séricas de MBL em pacientes com DMRI no Brasil. Devido a seleção criteriosa e restrita dos pacientes e do grupo controle com indivíduos de mais de 55 anos sem doenças oculares, acreditamos haver confiabilidade para extrapolação de dados tanto interna como externamente, ressalvando-se porém o grupo amostral reduzido. Mais estudos são necessários para esclarecer o real papel de MBL, bem como dos outros componentes da via das lectinas incluindo, ficolinas e MASPs e sua relação com a DMRI. Achados significantes poderão contribuir para desenvolvimento de terapias visando a regulação da via das lectinas, a exemplo daquelas já existentes

para a via alternativa. Inibidores do complemento como o anticorpo monoclonal lampalizumab, anti-fator D – que inibe via alternativa, já vem sendo testados em estudos clínicos de fase 3 para tratamento da DMRI seca (HELWICK, 2013; MCNAMARA, 2013; REGILLO; EYE; JEFFERSON, 2015). O fator D do complemento é um importante regulador da via alternativa do complemento, a qual, quando apresenta exacerbada ativação, está diretamente relacionada ao desenvolvimento da DMRI.

Finalmente, um fato significativo observado ao longo deste estudo, é que os pacientes já chegavam ao ambulatório com doença ocular avançada em grande parte dos casos, sendo 50% deles com doença exsudativa. O esperado, considerando a prevalência geral de DMRI, incluindo serviços primários, secundários e terciários, seria de aproximadamente 10% de casos de doença exsudativa (WONG et al., 2014). Este fato provavelmente está relacionado ao atendimento de um hospital terciário público. Observa-se um desconhecimento de grande parcela da população leiga e mesmo medica a respeito da doença e de seu grande potencial de cegueira. Portanto, medidas de conscientização e, principalmente, de melhora no acesso aos serviços e exames oftalmológicos são indispensáveis para diminuição do custo pessoal e social relacionado a esta doença. Importante lembrar que, uma vez estabelecida, o tratamento é difícil e pode não ser efetivo. Marcadores séricos podem ser a melhor forma, no Brasil, para diagnóstico e escalonamento de risco, dada à escassez de recursos de alto custo muitas vezes necessários. Neste sentido, a busca de aferições factíveis e confiáveis reveste-se de suma importância para aprimoramento do diagnóstico e acompanhamento de pacientes com DMRI.

6 CONCLUSOES

- ✓ Não foi observada diferença significativa nas concentrações séricas de MBL em pacientes com DMRI em relação aos controles.
- ✓ Não houve diferença estatisticamente significativa nas concentrações séricas de MBL em pacientes com a forma seca de DMRI em relação a forma exsudativa.
- ✓ Não houve diferença, tanto em pacientes quanto em controles, nas concentrações séricas de MBL em relação ao gênero.
- ✓ Observou-se tendência à diminuição das concentrações de MBL com avanço da idade nos controles.

7 REFERÊNCIAS

ABBAS LICHTMAN, ANDREW H., PILLAI, SHIV., A. K. **Cellular and Molecular Immunology**. Philadelphia: Elsevier/Saunders, 2012.

ANDERSON, D. H. et al. A role for local inflammation in the formation of drusen in the aging eye. **American Journal of Ophthalmology**, v. 134, n. 3, p. 411–431, set. 2002.

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, fev. 2004.

APTE, R. S. et al. Macrophages inhibit neovascularization in a murine model of age-related macular degeneration. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 8, p. e310, ago. 2006.

AUGUSTIN, A. J.; KIRCHHOF, J. Inflammation and the pathogenesis of age-related macular degeneration. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 13, n. 6, p. 641–651, 21 maio 2009.

BEST, L. G. et al. Prospective analysis of mannose-binding lectin genotypes and coronary artery disease in American Indians: the Strong Heart Study. **Circulation**, v. 109, n. 4, p. 471–5, 3 fev. 2004.

BOK, D. Evidence for an inflammatory process in age-related macular degeneration gains new support. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 20, p. 7053–7054, 2005.

CAMPOS, M. S. **Calculo de tamanho amostral**. Disponível em: <<http://www.siqueiracampos.com/downloads.asp>>.

CHONG, N. H. V. et al. Decreased thickness and integrity of the macular elastic layer of Bruch's membrane correspond to the distribution of lesions associated with age-related macular degeneration. **The American Journal of Pathology**, v. 166, n. 1, p. 241–51, jan. 2005.

CHOW, S. et al. Mannose binding lectin as part of the complement pathway: characterization in non inflamed and inflamed human eyes. **Clinical & Experimental Ophthalmology**, v. 39, n. 9, p. 871–877, 2011.

CRABB, J. W. et al. Drusen proteome analysis: an approach to the etiology of age-related macular degeneration. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 23, p. 14682–7, 12 nov. 2002.

DEPARTMENT OF OPHTHALMOLOGY AND VISUAL SCIENCES. Fundus Photograph Reading Center. **University of Wisconsin School of Medicine and Public Health**, n. May, 2011.

DEPARTMENT OF OPHTHALMOLOGY AND VISUAL SCIENCES. ACCORD Forms

, Labeling , Study Conventions and Imaging Procedures. **University of Wisconsin School of Medicine and Public Health**, n. 608, 2012.

DONOSO, L. A. et al. The Role of Inflammation in the Pathogenesis of Age-related Macular Degeneration. **Survey of Ophthalmology**, v. 51, n. 2, p. 137–152, 1 mar. 2006.

DONOSO, L. A. et al. The Role of Inflammation in the Pathogenesis of Age-related Macular Degeneration. **Survey of Ophthalmology**, v. 51, n. 2, p. 137–152, 24 jun. 2014.

DUNKELBERGER, J. R.; SONG, W.-C. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. **Cell Research**, v. 20, n. 1, p. 34–50, 2009.

EDWARDS, A. O. et al. Complement Factor H Polymorphism and Age-Related Macular Degeneration. **Science**, v. 308, n. 5720, p. 421–424, 15 abr. 2005.

ENDO, M. et al. Glomerular deposition of mannose-binding lectin (MBL) indicates a novel mechanism of complement activation in IgA nephropathy. **Nephrology Dialysis Transplantation**, p. 1984–1990, 1998.

ESPINOSA-HEIDMANN, D. G. et al. Macrophage depletion diminishes lesion size and severity in experimental choroidal neovascularization. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 44, n. 8, p. 3586–3592, ago. 2003.

FERRARONI, N. **Níveis séricos e polimorfismos gênicos da Lectina Ligadora de Manose (MBL) e da Serino Protease Associada à MBL (MASP)-2 em uma amostra da população brasileira Tese.** [s.l.] Universidade de São Paulo - USP, 2010.

FREDERIKSEN, P. D. et al. Quantification of mannan-binding lectin. **Journal of Immunological Methods**, v. 315, n. 1-2, p. 49–60, 31 ago. 2006.

FUJITA, T. Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. **Immunological Reviews**, v. 2, n. 5, p. 346–353, maio 2002.

GEHRS, K. M. et al. Complement, age-related macular degeneration and a vision of the future. **Archives of Ophthalmology**, v. 128, n. 3, p. 349–58, mar. 2010.

GOLD, B. et al. Variation in factor B (BF) and complement component 2 (C2) genes is associated with age-related macular degeneration. **Nature Genetics**, v. 38, n. 4, p. 458–462, abr. 2006.

GROUP, A.-R. E. D. S. R. 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, 2001.

GUARDIA, A.; LOZANO, F. Mannose-binding lectin deficiencies in infectious and

inflammatory disorders. **Reviews in Medical Microbiology**, v. 14, n. 2, p. 41–52, 2003.

HAGEMAN, G. S. Structure and composition of drusen associated with glomerulonephritis: implications for the role of complement activation in drusen biogenesis. **Eye**, p. 390–395, 2001.

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**, v. 20, n. 6, p. 705–732, nov. 2001.

HAGEMAN, G. S. et al. A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 20, p. 7227–32, 17 maio 2005.

HAINES, J. L. et al. Complement Factor H Variant Increases the Risk of Age-Related Macular Degeneration. **Science**, v. 308, n. 5720, p. 419–421, 15 abr. 2005.

HANSEN, T. K. et al. Elevated levels of mannan-binding lectin in patients with type 1 diabetes. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 88, n. 10, p. 4857–61, out. 2003.

HELWICK, C. **MAHALO Finds New Biomarker for Dry Macular Degeneration**. Disponível em: <<http://www.medscape.com/viewarticle/814822>>.

HO, A. C. **Age-related Macular Degeneration Diagnosis and Treatment**. New York, NY: Springer New York, 2011.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://www.cidades.ibge.gov.br/painel/populacao.php?lang=&codmun=410690&search=parana|curitiba|infograficos:-evolucao-populacional-e-piramide-etaria>>.

JACK, D. L.; KLEIN, N. J.; TURNER, M. W. Mannose-binding lectin: targeting the microbial world for complement attack and opsonophagocytosis. **Immunological Reviews**, v. 180, n. 1, p. 86–99, 2001.

JACK, D. L.; TURNER, M. W. Anti-microbial activities of mannose-binding lectin. **Biochemical Society Transactions**, v. 31, n. Pt 4, p. 753–7, ago. 2003.

JAKOBSDOTTIR, J. et al. Susceptibility genes for age-related maculopathy on chromosome 10q26. **The American Journal of Human Genetics**, v. 77, n. 3, p. 389–407, 2005.

JOHNSON, L. V et al. Complement activation and inflammatory processes in Drusen formation and age related macular degeneration. **Experimental Eye Research**, v. 73, n. 6, p. 887–96, dez. 2001a.

JOHNSON, L. V et al. Complement Activation and Inflammatory Processes in Drusen Formation and Age Related Macular Degeneration. **Experimental Eye Research**, v. 73, n. 6, p. 887–896, dez. 2001b.

JOSEPH, K. et al. Oxidative stress sensitizes retinal pigmented epithelial (RPE) cells to complement-mediated injury in a natural antibody-, lectin pathway-, and phospholipid epitope-dependent manner. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 18, p. 12753–65, 3 maio 2013.

KLEIN, R. et al. Prevalence of age-related maculopathy in the Atherosclerosis Risk in Communities Study. **Archives of Ophthalmology**, v. 117, n. 9, p. 1203–10, set. 1999.

KLEIN, R. et al. Association of emphysema, gout, and inflammatory markers with long-term incidence of age-related maculopathy. **Archives of Ophthalmology**, v. 121, n. 5, p. 674–8, maio 2003.

KLEIN, R. et al. Systemic markers of inflammation, endothelial dysfunction, and age-related maculopathy. **American Journal of Ophthalmology**, v. 140, n. 1, p. 35–e1, 2005.

KLEIN, R. et al. Prevalence of age-related macular degeneration in the US population. **Archives of Ophthalmology**, v. 129, n. 1, p. 75–80, jan. 2011.

KLEIN, R.; CHOU, C. Prevalence of age-related macular degeneration in the US population. **Archives of Ophthalmology**, v. 129, n. 1, p. 75–80, jan. 2011.

KLEIN, R.; MYERS, C. E.; KLEIN, B. E. K. Vasodilators, Blood Pressure-Lowering Medications, and Age-related Macular Degeneration: The Beaver Dam Eye Study. **Ophthalmology**, 30 abr. 2014.

KLEIN, R.; ROWLAND, M. L.; HARRIS, M. I. Racial/Ethnic Differences in Age-related Maculopathy: Third National Health and Nutrition Examination Survey. **Ophthalmology**, v. 102, n. 3, p. 371–381, mar. 1995.

LE TIEN. **Screening campaign assesses AMD prevalence in France**. Disponível em: <http://www.healio.com/ophthalmology/retina-vitreous/news/online/%7Bac4874ba-8e12-4e7b-a861-4c45177c08ff%7D/screening-campaign-assesses-amd-prevalence-in-france>.

LI, M. et al. CFH haplotypes without the Y402H coding variant show strong association with susceptibility to age-related macular degeneration. **Nature Genetics**, v. 38, n. 9, p. 1049–1054, 2007.

LIM, B.-L. et al. Expression of the carbohydrate recognition domain of lung surfactant protein D and demonstration of its binding to lipopolysaccharides of gram-negative bacteria. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 202, n. 3, p. 1674–1680, 1994.

LUO, C.; CHEN, M.; XU, H. Complement gene expression and regulation in mouse retina and retinal pigment epithelium/choroid. **Molecular Vision**, v. 17, n. September 2010, p. 1588–97, jan. 2011.

MA, Y. J. et al. Synergy between ficolin-2 and pentraxin 3 boosts innate immune recognition and complement deposition. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 41, p. 28263–75, 9 out. 2009.

MADSEN, H. O. et al. Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein. **The Journal of Immunology**, v. 155, n. 6, p. 3013–3020, 1995.

MAGNUSSON, K. P. et al. CFH Y402H confers similar risk of soft drusen and both forms of advanced AMD. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 1, p. e5, 2005.

MALLER, J. et al. Common variation in three genes, including a noncoding variant in CFH, strongly influences risk of age-related macular degeneration. **Nature Genetics**, v. 38, n. 9, p. 1055–1059, set. 2006.

MCNAMARA, D. **Lampalizumab Appears Safe for Dry Macular Degeneration Medscape 2013**. Disponível em: <<http://www.medscape.com/viewarticle/811878>>.

MESSIAS-REASON, I. J. et al. Ficolin 2 (FCN2) functional polymorphisms and the risk of rheumatic fever and rheumatic heart disease. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 157, n. 3, p. 395–9, set. 2009.

MILLER, D. M. et al. The association of prior cytomegalovirus infection with neovascular age-related macular degeneration. **American Journal of Ophthalmology**, v. 138, n. 3, p. 323–328, set. 2004.

NISIHARA, R. M. **Concentrações Séricas da Lectina Ligante de Manose na Síndrome de Down: Associação com Infecções Recorrentes e Doenças Auto-Imunes**. [s.l.] UFPR - Universidade Federal do Parana, 2009.

NISIHARA, R. M. et al. Mannan-binding lectin deficiency increases the risk of recurrent infections in children with Down's syndrome. **Human Immunology**, v. 71, n. 1, p. 63–66, jan. 2010.

OGUIDO, A. P. M. T. **Prevalência da maculopatia relacionada à idade, em japonese e descendentes, na cidade de Londrina-PR / Prevalence of age-related macular maculopathy in japanese people and descendants, living in Londrina-Pr, Brazil**. [s.l.] UEL - Universidade de Londrina, 2004.

PENFOLD, P. L. et al. Immunological and Aetiological Aspects of Macular Degeneration. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 20, n. 3, p. 385–414, maio 2001.

PETERSEN, S. V. et al. An assay for the mannan-binding lectin pathway of complement activation. **Journal of Immunological Methods**, v. 257, n. 1, p. 107–

116, 2001.

REGILLO, C. D.; EYE, W.; JEFFERSON, T. **Complement Inhibition as a Potential Treatment for Geographic Atrophy.**

ROHRER, B. et al. The alternative pathway is required, but not alone sufficient, for retinal pathology in mouse laser-induced choroidal neovascularization. **Molecular Immunology**, v. 48, p. 1–18, 2012.

ROMANI, F. Prevalência de transtornos oculares na população de idosos residentes na cidade de Veranópolis, RS, Brasil. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 68, n. 3, p. 649–655, 2005.

ROSS, R. J. et al. Genetic markers and biomarkers for age-related macular degeneration. **Expert Review of Ophthalmology**, v. 2, n. 3, p. 443–457, 2007.

SAKURAI, E. et al. Macrophage depletion inhibits experimental choroidal neovascularization. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 44, n. 8, p. 3578–3585, ago. 2003.

SCHAFRANSKI, M. D. et al. Significantly increased levels of mannose-binding lectin (MBL) in rheumatic heart disease: a beneficial role for MBL deficiency. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 138, n. 3, p. 521–5, dez. 2004.

SEDDON, J. et al. Association between C-reactive protein and age-related macular degeneration. **The Journal of the American Medical Association**, v. 291, n. 6, p. 704–10, 11 mar. 2004.

SEDDON, J. M. et al. Progression of age-related macular degeneration: prospective assessment of C-reactive protein, interleukin 6, and other cardiovascular biomarkers. **Archives of Ophthalmology**, v. 123, n. 6, p. 774–782, 2005.

SILVESTRI, G. Age-related macular degeneration: genetics and implications for detection and treatment. **Molecular Medicine Today**, v. 3, n. 2, p. 84–90, 1997.

SOUBRANE, G.; HADDAD, W. M.; COSCAS, G. [Age-related macular degeneration]. **Presse Medicale (Paris, France : 1983)**, v. 31, n. 27, p. 1282–1287, 2002.

STEFFENSEN, R. et al. Detection of structural gene mutations and promoter polymorphisms in the mannan-binding lectin (MBL) gene by polymerase chain reaction with sequence-specific primers. **Journal of Immunological Methods**, v. 241, n. 1, p. 33–42, 2000.

SUMIYA, M. et al. Molecular basis of opsonic defect in immunodeficient children. **The Lancet**, v. 337, n. 8757, p. 1569–1570, 1991.

THAKKINSTIAN, A. et al. Systematic review and meta-analysis of the association between complement factor H Y402H polymorphisms and age-related macular

degeneration. **Human Molecular Genetics**, v. 15, n. 18, p. 2784–90, 15 set. 2006.

TSAI, D.-C. et al. Different plasma levels of vascular endothelial growth factor and nitric oxide between patients with choroidal and retinal neovascularization. **Ophthalmologica**, v. 220, n. 4, p. 246–251, 2006.

TSUTSUMI, A. et al. Mannose-binding lectin gene: polymorphisms in Japanese patients with systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and Sjogren's syndrome. **Genes and Immunity**, v. 2, n. 2, p. 99–104, 2001.

UFRET-VINCENTY, R. L. et al. Transgenic mice expressing variants of complement factor H develop AMD-like retinal findings. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 51, n. 11, p. 5878–87, nov. 2010.

UTIYAMA, S. DA R. O Sistema Complemento nas Doenças: Genética e Patogenia The Complement System in Diseases: Genetic and Pathogeny. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 44, n. 4, p. 277–286, 2004.

WALLIS, R.; CHENG, J. Y. T. Molecular defects in variant forms of mannose-binding protein associated with immunodeficiency. **The Journal of Immunology**, v. 163, n. 9, p. 4953–4959, 1999.

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, 2014.

YTTING, H. et al. Biological variation in circulating levels of mannan-binding lectin (MBL) and MBL-associated serine protease-2 and the influence of age, gender and physical exercise. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 66, n. 4, p. 458–464, out. 2007.

ZARBIN, M. Current concepts in the pathogenesis of age-related macular degeneration. **Archives of Ophthalmology**, v. 122, n. 4, p. 598–614, abr. 2004.

ZAREPARSI, S. et al. Strong association of the Y402H variant in complement factor H at 1q32 with susceptibility to age-related macular degeneration. **The American Journal of Human Genetics**, v. 77, n. 1, p. 149–153, 2005.

ZHAO, L. et al. Common variant in VEGFA and response to anti-VEGF therapy for neovascular age-related macular degeneration. **Current Molecular Medicine**, v. 13, n. 6, p. 929–34, jul. 2013.

ANEXOS

ANEXO A – Carta de Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos do HC-

UFPR



Curitiba, 28 de setembro de 2011.

Ilmo (a) Sr. (a)
Fernando Morandini Pradella
Hospital de Clínicas da UFPR
Curitiba - PR

Prezado Pesquisador:

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado: “ATUAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO NA DEGENERAÇÃO MACULAR RELACIONADA A IDADE”, foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, em reunião realizada no dia 27 de setembro de 2011.

O referido projeto atende aos aspectos das Resoluções CNS 196/96, e suas complementares, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Ministério da Saúde.

CAAE: 0239.0.208.000-11
Registro CEP: 2609.215/2011-09

Conforme a Resolução 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do primeiro relatório: março de 2012.

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Renato Tambara Filho'.

Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas/UFPR

Nazah C. M. Youssef
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa em Seres Humanos HC/UFPR
CRM Nº 12465 - Mat.: 108900

ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE**TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO LIVRE E ESCLARECIDO**

Título do Projeto: “Atuação do Sistema Complemento na Degeneração Macular Relacionada a Idade”

Investigador: Fernando Morandini Pradella

Local da Pesquisa: Centro da Visão – Universidade Federal do Paraná

Endereço e telefone: Rua Pasteur, 26 / Telefone: 3323-8727

PROPÓSITO DA INFORMAÇÃO AO PACIENTE E DOCUMENTO DE CONSENTIMENTO

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa, coordenada por um profissional de saúde agora denominado pesquisador. Para poder participar, é necessário que você leia este documento com atenção. Ele pode conter palavras que você não entende. Por favor, peça aos responsáveis pelo estudo para explicar qualquer palavra ou procedimento que você não entenda claramente.

O propósito deste documento é dar a você as informações sobre a pesquisa e, se assinado, dará a sua permissão para participar no estudo. O documento descreve o objetivo, procedimentos, benefícios e eventuais riscos ou desconfortos caso queira participar. Você só deve participar do estudo se você quiser. Você pode se recusar a participar ou se retirar deste estudo a qualquer momento.

INTRODUÇÃO

Investigação sobre Degeneração Macular Relacionada a Idade (DMRI - doença que ataca a retina no fundo dos olhos) e relação com sistema complemento (uma das defesas do organismo).

PROPÓSITO DO ESTUDO

Avaliar o papel dos fatores de ativação/inibição do sistema complemento e genes envolvidos na Degeneração Macular Relacionada a Idade

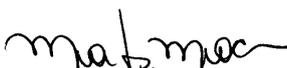
SELEÇÃO

São incluídos pacientes com diagnóstico de DMRI (com ou sem tratamento) e grupo controle sem esta alteração.

PROCEDIMENTOS

Preenchimento de questionário sucinto, exames de protocolo (padrão) para sua doença e coleta de frasco de sangue para exame laboratorial.

Versão 1 data SET/2011


MÁRIA JOSÉ MOCELIN
Membro do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do HC/UFPR
Matrícula 7462

Benefícios: Maior conhecimento sobre sua doença, podendo trazer aperfeiçoamento no diagnóstico e tratamento futuros tanto para você como para outros pacientes nesta condição.

Riscos: Procedimentos protocolares (padrão) poderão acarretar riscos não maiores do que os usualmente encontrados no diagnóstico e tratamento de sua doença, exceto pelo possível hematoma (“mancha de sangue”) no local de punção para retirada de sangue.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA:

Sua decisão em participar deste estudo é voluntária. Você pode decidir não participar no estudo. Uma vez que você decidiu participar do estudo, você pode retirar seu consentimento e participação a qualquer momento. Se você decidir não continuar no estudo e retirar sua participação, você não perderá qualquer benefício ao qual você tem direito.

CUSTOS

Não haverá nenhum custo a você relacionado aos procedimentos previstos no estudo.

PAGAMENTO PELA PARTICIPAÇÃO

Sua participação é voluntária, portanto você não será pago por sua participação neste estudo.

PERMISSÃO PARA REVISÃO DE REGISTROS, CONFIDENCIALIDADE E ACESSO AOS REGISTROS:

O Investigador responsável pelo estudo e equipe irá coletar informações sobre você. Em todos esses registros um código substituirá seu nome. Todos os dados coletados serão mantidos de forma confidencial. Os dados coletados serão usados para a avaliação do estudo, membros das Autoridades de Saúde ou do Comitê de Ética, podem revisar os dados fornecidos. Os dados também podem ser usados em publicações científicas sobre o assunto pesquisado. Porém, sua identidade não será revelada em qualquer circunstância.

Você tem direito de acesso aos seus dados. Você pode discutir esta questão mais adiante com seu médico do estudo.

CONTATO PARA PERGUNTAS

Se você ou seus parentes tiver (em) alguma dúvida com relação ao estudo, direitos do paciente, ou no caso de danos relacionados ao estudo, você deve contatar o Investigador do estudo ou sua equipe no Centro da Visão (pesquisador Fernando M Pradella); telefone 3323-8727/9612-7712. Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como um paciente de pesquisa, você pode contatar Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pelo telefone: 3360-1896. O CEP trata-se de um grupo de indivíduos com conhecimento

científicos e não científicos que realizam a revisão ética inicial e continuada do estudo de pesquisa para mantê-lo seguro e proteger seus direitos.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO DO PACIENTE:

Eu li e discuti com o investigador responsável pelo presente estudo os detalhes descritos neste documento. Entendo que eu sou livre para aceitar ou recusar, e que eu posso interromper minha participação a qualquer momento sem dar uma razão. Eu concordo que os dados coletados para o estudo sejam usados para o propósito acima descrito

Eu entendi a informação apresentada neste termo de consentimento. Eu tive a oportunidade para fazer perguntas e todas as minhas perguntas foram respondidas.

Eu receberei uma cópia assinada e datada deste Documento de Consentimento Informado.

NOME DO PACIENTE
DATA

ASSINATURA

NOME DO INVESTIGADOR
DATA
(Pessoa que aplicou o TCLE)

ASSINATURA

ANEXO C – Dosagem e Quantificação da MBL Sérica por *TRIFMA* (Ensaio Imunofluorométrico a tempo resolvido).

Ensaio da Lectina: O ensaio é baseado na ligação de MBL com o ligante manose, revestido em placa de 96 poços e a detecção da ligação de MBL com MAb anti-MBL marcada com Europium.

Métodos:

1. Prepare 10 µg manose/ml em Tampão de revestimento (Coatingbuffer pH 9.6)
2. Distribua a solução em uma placa de 96 poços e deixe as placas revestirem overnight em temperatura ambiente com a manose.
3. A placa é esvaziada e preenchida com 200 µl de TBS/HSA 1 mg/ml para bloqueio por uma hora em temperatura ambiente.
4. A placa é lavada 3 vezes com TBS/Tween na lavadora de placas.
5. Misture as amostras, o pool de standard (soro com concentrações conhecidas) e os controles em um mixer para fazer a diluição.
6. Dilua os controles e amostras 1/100 em Tampão ROSA (Tampão salino).
7. Para a curva standard diluir primeiro 1/20 e de maneira sucessiva 3.5 vezes, totalizando 8 amostras. 1/20, 1/70, 1/245...
8. Todas as amostras são adicionadas em duplicatas, inclusive os standards e controles. Primeiro adicione os standards nos 16 primeiros poços, e então somente Tampão ROSA nos próximos dois, nos próximos 8 poços os controles e finalmente as amostras. (35 amostras por placa).
9. Incubar a placa com amostras a 4°C overnight.
10. A placa é lavada 3 vezes com TBS/Tween/Ca 2+ na lavadora de placas e então incubada por 2 horas em temperatura ambiente com Biotina (hyb 131-1) diluída em TBS/Tween/Ca2+
11. A placa é lavada 3 vezes com TBS/Tween/Ca 2+ na lavadora de placas e então incubada com Solução Enhancement por uma hora.
12. A placa é colocada em agitação por 5 minutos em uma agitadora de placas.
13. Leia a contagem por fluorimetria DELFIA-reader da Perkin Elmer – Victor3).