

## Padrões epigenéticos das DNMTs e alterações estruturais da retina na Degenerescência Macular da Idade

### Epigenetic Signatures of DNMTs and Retinal Structural Changes in Age-Related Macular Degeneration

Ana Afonso<sup>1</sup> , Diana Nobre<sup>1</sup> , Leonor Lino<sup>1</sup> , Edna Ribeiro<sup>1</sup> , Bruno Pereira<sup>1,3</sup> , Catarina Ginete<sup>1</sup> , Carina Silva<sup>1</sup> , Miguel Brito<sup>1</sup> , Pedro Camacho<sup>1,2,3</sup> 

<sup>1</sup>H&TRC- Health & Technology Research Center, ESSL- Escola Superior de Saúde de Lisboa, Instituto Politécnico de Lisboa, Lisboa, Portugal

<sup>2</sup>Ophthalmology Institute Dr. Gama Pinto, Lisboa, Portugal

<sup>3</sup>INOVA4Health, NOVA Medical School, NMS, Faculdade de Ciências Médicas, FCM, Universidade NOVA de Lisboa, Lisboa, Portugal

\*Autor correspondente/Corresponding author: [pedro.camacho@essl.ipl.pt](mailto:pedro.camacho@essl.ipl.pt)

Recebido/Received: 24-09-2025; Revisto/Revised: 01-02-2026; Aceite/Accepted: 31-03-2026

#### Resumo

**Introdução:** A DMI é uma das principais causas de perda visual irreversível em idosos, com opções terapêuticas limitadas nas fases não avançadas, destacando a necessidade de identificar biomarcadores eficazes. Alterações epigenéticas, como a expressão das DNMT's, têm sido implicadas na DMI, mas a sua relação com mudanças estruturais na Coróide e no GCL+IPL permanece pouco explorada. **Objetivo:** Descrever e correlacionar a expressão genética de modeladores epigenéticos (DNMT1, DNMT3A e DNMT3B) com a espessura da Coróide e GCL+IPL, obtida através do SD-OCT em diferentes estádios de DMI. **Material e Métodos:** Estudo transversal com 34 doentes distribuídos por DMI precoce (n=4), intermédia (n=13), atrófica (n=5) e neovascular (n=12). A expressão génica das DNMTs foi quantificada em sangue periférico. Foram avaliadas medidas funcionais (BCVA) e estruturais (RNFL, GCL, GCL+IPL, CRT, coróide) através de SD-OCT. **Resultados:** Na DMI atrófica, observou-se *downregulation* significativa de todas DNMTs em comparação com fases precoce, intermédia e neovascular ( $p < 0,05$ ). Em contraste, verificou-se tendência para *upregulation* na DMI neovascular. Na DMI intermédia, níveis mais elevados de DNMT1 correlacionaram-se positivamente com espessura da GCL e do GCL+IPL central ( $p < 0,05$ ), enquanto DNMT3A e DNMT3B apresentaram correlações negativas com RNFL central e BCVA ( $p < 0,05$ ). Na DMI neovascular, a expressão de DNMT1 correlacionou-se negativamente com GCL e GCL+IPL. **Conclusão:** Fenótipos avançados da DMI apresentam padrões epigenéticos distintos, refletindo mecanismos patológicos diferenciados. A integração de biomarcadores epigenéticos e de imagem poderá contribuir para uma melhor estratificação da doença.

**Palavras-chave:** Degenerescência Macular da Idade; Complexo de Células Ganglionares; Coróide; Epigenética; DNA Metiltransferases.

#### Abstract

**Introduction:** Age-related macular degeneration (AMD) is one of the leading causes of irreversible visual loss in the elderly. Identifying effective biomarkers is essential due to the limited therapeutic options in the early stages. Epigenetic alterations, such as DNA methyltransferase (DNMT) expression, have been implicated in AMD pathogenesis; however, their association with structural changes in the choroid and GCL+IPL remains poorly understood. **Objective:** To describe and correlate the genetic expression of epigenetic regulators (DNMT1, DNMT3A, DNMT3B) with choroidal and GCL+IPL thickness, assessed by SD-OCT, across different stages of AMD. **Methods:** Cross-sectional study including 34 patients with early AMD (n=4), intermediate (n=13), atrophic (n=5), and neovascular (n=12). Gene expression of DNMTs was quantified in peripheral blood. Functional (BCVA) and structural (RNFL, GCL, GCL+IPL, CRT, choroid) parameters were assessed using SD-OCT. **Results:** Atrophic AMD showed significant downregulation of DNMT1, DNMT3A, and DNMT3B compared with early, intermediate, and neovascular stages ( $p < 0.05$ ). In contrast, neovascular AMD exhibited a trend towards DNMT upregulation. In intermediate AMD, higher DNMT1 levels correlated positively with GCL and central GCL+IPL thickness ( $p < 0.05$ ), whereas DNMT3A and DNMT3B correlated negatively with central RNFL and BCVA ( $p < 0.05$ ). In neovascular AMD, DNMT1 expression correlated negatively with GCL and GCL+IPL thickness. **Conclusion:** Advanced AMD phenotypes exhibit distinct epigenetic patterns, reflecting differentiated pathogenic mechanisms. Integrating epigenetic and imaging biomarkers may improve disease stratification. Larger longitudinal studies are warranted to validate these findings and to explore the potential of DNMTs as clinical biomarkers.

**Keywords:** Age-related macular degeneration; Ganglion cell complex; Choroid; Epigenetics; DNA methyltransferases.



## 1. INTRODUÇÃO

O envelhecimento populacional tem sido acompanhado por um aumento da prevalência de doenças neurodegenerativas, como a degenerescência macular da idade (DMI), a qual se estima poder afetar até 288 milhões de pessoas em todo o mundo em 2040 (Wong et al., 2014). Enquanto principal causa de perda visual irreversível em indivíduos com mais de 60 anos, a DMI tem um impacto significativo na qualidade de vida com um custo anual estimado de cerca de 30 milhões de euros para os sistemas de saúde (Cachulo et al., 2016; Zhang et al., 2024). Com uma etiologia multifatorial, a DMI resulta da interação entre fatores genéticos e ambientais, sendo influenciada por alterações nas vias inflamatórias, metabólicas e vasculares. Do ponto de vista clínico, pode ser classificada em DMI inicial/intermédia (DMI não avançada) ou nas suas formas atrófica/neovascular (DMI avançada) (Fleckenstein et al., 2024).

Apesar dos avanços significativos das terapêuticas intravítreas anti-VEGF na DMI neovascular, persiste um hiato terapêutico nas fases iniciais e intermédias da doença, que representam cerca de 90% dos casos, bem como nos estádios avançados atróficos, nos quais os agentes recentemente aprovados ainda não são utilizados de forma consensual na prática clínica (Corradetti et al., 2021; Sitnilska et al., 2021). Desta forma, a clarificação dos mecanismos fisiopatológicos ao longo dos diferentes estádios da DMI, bem como a otimização do uso de biomarcadores sistêmicos e imagiológicos, são fundamentais para uma melhor gestão da doença (Camacho et al., 2025; More et al., 2019).

Os drusen representam um sinal fundamental no diagnóstico e na avaliação do risco de progressão, enquanto biomarcadores imagiológicos. No entanto, doentes com fenótipos semelhantes podem evoluir para diferentes formas avançadas (atrófica ou neovascular), o que tem justificado a procura de novos biomarcadores estruturais pelo recurso de técnicas de imagem de alta resolução. Neste contexto, a disfunção vascular, refletida por variações na espessura coroideia, tem sido associada a hipóxia e isquemia do epitélio pigmentar da retina (EPR), secundárias à redução da perfusão coroideia (Camacho et al., 2018; Costa et al., 2025; Govetto et al., 2017). Paralelamente, têm sido descritas modificações neurodegenerativas na DMI, como a redução da espessura do complexo de células ganglionares (GCC), distintas dos padrões do envelhecimento fisiológico que podem refletir uma disfunção da função retiniana e da transmissão neuronal (Camacho et al., 2017; Farinha et al., 2021).

Ao nível sistémico, estudos genéticos identificaram polimorfismos associados a vias inflamatórias, imunitárias, metabólicas e energéticas. No entanto, a genética explica apenas cerca de 40–60% da variabilidade clínica da DMI, salientando o contributo de fatores ambientais e do estilo de vida (Fritsche et al., 2014). Neste contexto, a epigenética tem vindo a ganhar relevância, ao estudar modificações na expressão génica induzidas pelo ambiente, sem alteração da sequência do DNA (Baird and Wei, 2013). Alterações da metilação do DNA têm sido descritas em genes envolvidos na homeostasia do EPR sob stress oxidativo, na integridade da barreira hematorretiniana associada à sinalização angiogénica (Nashine and Kenney, 2020; Wu et al., 2021), e na desregulação imunitária com repercussão na resposta inflamatória (Wei et al., 2012). Mais recentemente, o estudo da

## 1. INTRODUCTION

Population ageing has been accompanied by a marked increase in the prevalence of neurodegenerative diseases, such as age-related macular degeneration (AMD), which is projected to affect up to 288 million people by 2040 (Wong et al., 2014). As the leading cause of irreversible vision loss in individuals over 60 years of age, AMD has a profound impact on quality of life and represents an estimated annual cost of 30 million euros for healthcare systems (Cachulo et al., 2016; Zhang et al., 2024). With multifactorial etiology, AMD arises from the interaction between genetic and environmental factors, and is associated with inflammatory, metabolic, and vascular dysfunctions. Clinically, it can be classified into early and intermediate stages (non-advanced AMD) and atrophic and neovascular forms (advanced AMD) (Fleckenstein et al., 2024).

Despite significant advances with anti-VEGF intravitreal therapies for neovascular AMD, substantial therapeutic gaps persist in early disease, which accounts for nearly 90% of cases, and in atrophic stages, where newly approved agents are not yet used consistently in clinical practice (Corradetti et al., 2021; Sitnilska et al., 2021). Clarifying the pathophysiological mechanisms across different AMD stages, and optimizing the use of systemic and imaging biomarkers are critical steps for improved disease management (Camacho et al., 2025; More et al., 2019).

Drusen is a hallmark for diagnosis and progression risk assessment among imaging biomarkers. However, patients with similar phenotypes may progress to different advanced forms (atrophic or neovascular), driving the search for novel structural biomarkers enabled by high-resolution imaging. In this regard, vascular impairment reflected by choroidal thickness variation has been associated with hypoxia and ischemia of the retinal pigment epithelium (RPE), secondary to reduced choroidal perfusion (Camacho et al., 2018; Costa et al., 2025; Govetto et al., 2017). Neurodegenerative features have also been linked to AMD, with changes in ganglion cell complex (GCC) thickness, distinct from physiological ageing patterns, reflecting impaired retinal function and neuronal transmission (Camacho et al., 2017; Farinha et al., 2021).

At a systemic level, genetic studies have identified polymorphisms affecting inflammatory, immune, metabolic, and energetic pathways. Nevertheless, genetics accounts for only 40–60% of AMD's clinical variability, underscoring the contribution of environmental and lifestyle factors (Fritsche et al., 2014). In this context, epigenetics has gained relevance, as it investigates environmentally induced modifications in gene expression without altering the DNA sequence (Baird and Wei, 2013). Aberrant DNA methylation has been described in genes involved in RPE homeostasis under oxidative stress, in the blood–retinal barrier associated with angiogenic signaling (Nashine and Kenney, 2020; Wu et al., 2021), and in immune dysregulation promoting inflammatory responses (Wei et al., 2012). Moreover, differential expression of DNA methyltransferases (DNMTs) has been reported across AMD stages, suggesting that distinct pathways may predominate in different disease phases (Camacho et al., 2025).

Despite these advances, the role of epigenetic

expressão diferencial das DNA metiltransferases (DNMTs) ao longo dos diferentes estádios da DMI, reforçou o contributo de vias moleculares distintas nas diferentes fases da doença (Camacho et al., 2025).

Apesar destes avanços, o papel das alterações epigenéticas na progressão da DMI e a sua correlação com marcadores vasculares e neurodegenerativos não têm sido explorados. Assim, este estudo teve como objetivo correlacionar a expressão de reguladores epigenéticos (DNMT1, DNMT3A e DNMT3B) com a espessura da coróide e com a espessura combinada da camada de células ganglionares e da camada plexiforme interna (GCL+IPL), avaliadas por tomografia de coerência ótica de domínio espectral (SD-OCT), em doentes com diferentes estádios de DMI. A integração destas abordagens de avaliação de parâmetros vasculares e neurodegenerativos poderá contribuir para a identificação e consolidação de biomarcadores de diagnóstico precoce, bem como para o aperfeiçoamento da monitorização clínica da DMI.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo observacional, de natureza transversal, foi conduzido com base numa coorte de doentes proveniente da base de dados do projeto “Interplay Between Inflammatory Genes and Methylation in Age-Related Macular Degeneration Progression” (IPL/IDI&CA2024/INSYDE AMD ESTeSL). O estudo foi desenvolvido na Escola Superior de Saúde de Lisboa (ESSL), em colaboração com o Lisbon Retina Institute (IRL) e o Instituto de Oftalmologia Dr. Gama Pinto (IOGP). O principal objetivo consistiu em descrever e correlacionar a expressão genética de moduladores epigenéticos (*DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B*) com a espessura de coróide e da camada combinada de células ganglionares e camada plexiforme interna (GCL+IPL), quantificadas por SD-OCT, em participantes com diferentes estádios de DMI. A base de dados foi construída a partir de dados clínicos e protocolos definidos no estudo original, o qual foi aprovado pelas Comissões de Ética da ESTeSL (CE-ESTeSL-Nº 59-2024), do IOGP e do IRL, em conformidade com os princípios da Declaração de Helsínquia. Todos os participantes receberam informação detalhada sobre o estudo e assinaram consentimento informado escrito.

### 2.1 SELEÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DOS PARTICIPANTES

Foi incluída uma amostra de conveniência, não probabilística, composta por 34 doentes provenientes do IRL e do IOGP, de acordo com os critérios de inclusão e exclusão previamente definidos. Os participantes elegíveis apresentaram uma idade  $\geq 55$  anos, diagnóstico médico confirmado de DMI e forneceram amostras de sangue periférico.

A classificação clínica foi realizada de acordo com a classificação *Age-Related Eye Disease Study* (AREDS): **DMI inicial** (categoria AREDS 2), caracterizada por drusen intermédios (63–124  $\mu\text{m}$ ) ou alterações ligeiras do epitélio pigmentar da retina (EPR); **DMI intermédia** (categoria AREDS 3), definida pela presença de numerosos drusen intermédios, pelo menos um drusen grande ( $\geq 125 \mu\text{m}$ ) e atrofia não central do EPR; **DMI atrófica** (categoria AREDS 4), com atrofia geográfica localizada a menos de 500  $\mu\text{m}$  do centro foveal; e **DMI neovascular** (categoria AREDS 4), caracterizada por neovascularização sub-

alterations in AMD progression and their correlation with vascular and neurodegenerative markers remains underexplored. Therefore, we aimed to correlate the expression of epigenetic regulators (DNMT1, DNMT3A, DNMT3B) with choroidal and combined ganglion cell layer and inner plexiform layer (GCL+IPL) thickness, measured by spectral-domain optical coherence tomography (SD-OCT) in patients with different AMD stages. Integrating these vascular and neurodegenerative approaches may contribute to the identification of novel early diagnostic biomarkers and enhance clinical monitoring of AMD.

## 2. MATERIALS AND METHODS

This observational, cross-sectional study was conducted using a cohort of patients from the database of the project “*Interplay Between Inflammatory Genes and Methylation in Age-Related Macular Degeneration Progression*” (IPL/IDI&CA2024/INSYDE AMD ESTeSL). The study was carried out at the Lisbon School of Health Technology (ESTeSL) in collaboration with the Lisbon Retina Institute (IRL) and the Dr. Gama Pinto Ophthalmology Institute (IOGP). Its main objective was to describe and correlate the genetic expression of epigenetic modulators (DNMT1, DNMT3A, DNMT3B) with choroidal and GCL+IPL thickness, assessed by SD-OCT, in participants at different AMD stages. The database was developed from clinical data and protocols defined in the original study, which was approved by the Ethics Committees of ESTeSL (CE-ESTeSL-Nº.59-2024), IOGP and IRL, in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki. All participants received detailed information about the study and signed written informed consent.

### 2.1 PARTICIPANT SELECTION AND CLASSIFICATION

A convenience, non-probabilistic sample of 34 patients from IRL and IOGP was included, following the inclusion and exclusion criteria described previously. Eligible participants were aged  $\geq 55$  years, had a confirmed medical diagnosis of AMD, and provided peripheral blood samples. Clinical staging followed the Age-Related Eye Disease Study (AREDS) severity scale commonly used in: **early AMD** (AREDS category 2) with intermediate drusen (63–124  $\mu\text{m}$ ) or mild RPE abnormalities; **intermediate AMD** (AREDS category 3) with numerous intermediate drusen, at least one large drusen ( $\geq 125 \mu\text{m}$ ) and non-central RPE atrophy; **atrophic AMD** (AREDS category 4) with geographic atrophy within 500  $\mu\text{m}$  of the foveal centre; and **neovascular AMD** (AREDS category 4) with subretinal neovascularisation causing fluid leakage, haemorrhage and subsequent fibrosis. This classification was applied in accordance with contemporary clinical guidelines (Flaxel et al., 2020).

Only participants with complete ophthalmological data were included: best-corrected visual acuity (BCVA, ETDRS letter score), fundus photography, and SD-OCT. Additional clinical and demographic data collected included age, sex, intraocular pressure (IOP), spherical equivalent, and follow-up period.

Exclusion criteria included concomitant ocular disease that could interfere with the study (e.g., diabetic retinopathy,

retiniana com exsudação, hemorragia e fibrose subsequente. Esta classificação foi aplicada de acordo com as recomendações clínicas (Flaxel et al., 2020).

Apenas foram incluídos participantes com dados oftalmológicos completos, nomeadamente: melhor acuidade visual corrigida (MAVC; escala ETDRS), fotografia do fundo ocular e SD-OCT. Foram ainda recolhidos dados clínicos e demográficos adicionais, incluindo idade, sexo, pressão intraocular (PIO), equivalente esférico e período de seguimento.

Os critérios de exclusão incluíram a presença de patologia ocular concomitante com potencial interferência nos resultados (por exemplo, retinopatia diabética, distrofias hereditárias da retina, glaucoma), ametropia elevada (equivalente esférico > -6,00 D ou < +2,00 D), opacidades dos meios ou inflamação ocular. Foram igualmente excluídos doentes com antecedentes de neoplasia, doença autoimune, demência ou outras patologias neurológicas.

## 2.2 COLHEITA DE SANGUE E PERFIL EPIGENÉTICO

O RNA da colheita de sangue foi extraído com recurso ao kit Quick-RNA™ Whole Blood (Zymo Research, Orange, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A concentração e pureza do RNA foram avaliadas com um espectrofotómetro NanoDrop One (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). A análise da expressão génica foi realizada por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real num único passo (RT-qPCR), utilizando o kit NZY Speedy RT-qPCR Green (NZYtech, Lisboa, Portugal), em reações de 20 µL, num sistema CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Todas as reações foram efetuadas em triplicado, incluindo controlos sem molde. Foram utilizados primers específicos (Tabela 1) dirigidos aos genes DNMT1, DNMT3A e DNMT3B, sendo o gene GAPDH selecionado como gene de referência para normalização, devido à sua expressão estável no sangue periférico. Os primers foram desenhados para abranger junções exon-exon, prevenindo a amplificação de DNA genómico. As condições de amplificação térmica consistiram em 50 °C durante 15 minutos, 95 °C durante 5 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95 °C durante 15 segundos e 60 °C durante 45 segundos, com aquisição de fluorescência em cada ciclo. A expressão génica relativa foi calculada pelo método  $\Delta\Delta C_t$ , normalizando os valores de  $C_t$  dos genes-alvo para o  $C_t$  médio do GAPDH. Os valores de  $\Delta\Delta C_t$  foram transformados em logaritmo para representação gráfica.

**Tabela/Table 1:** Sequências dos primers, números de acesso e comprimento dos produtos amplificados para a análise por RT-qPCR/Primer sequences, accession numbers, and product lengths for qRT-PCR analysis.

Genes	Accession Number *	Forward Primer (5'→3')	Reverse PRIMER (5'→3')	Product Length (bp)
<i>GAPDH</i>	NM_002046.7	GAGTCAACGGATTGGTCGTA	GCAGAGATGATGACCCCTTTTG	349
<i>DNMT1</i>	NM_001379.4	CCTCCAAAACCCAGCCAAC	TCCAGGACCCCTGGGGATTTC	101
<i>DNMT3A</i>	NM_022552.5	CCAACATCGAATCCATGAAA	CTTGCGCTTGCTGATGTAGT	140
<i>DNMT3B</i>	NM_175850.3	CGAATTTACCACCTGCTGAATT	AGAACGGCCGGTCATCAC	59

## 2.3 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA POR SD-OCT

A aquisição de imagens foi realizada com um equipamento de tomografia de coerência ótica de domínio espectral (SD-OCT; Spectralis®, Heidelberg Engineering®, Alemanha), com

inherited retinal dystrophies, glaucoma), high ametropia (spherical equivalent > -6.00 D or < +2.00 D), media opacities, or ocular inflammation. Patients with a history of cancer, autoimmune disease, dementia, or other neurological disorders were also excluded.

## 2.2 BLOOD COLLECTION AND EPIGENETIC PROFILE

Peripheral blood RNA was extracted using the Quick-RNA™ Whole Blood kit (Zymo Research, Orange, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. RNA concentration and purity were assessed using a NanoDrop One spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Gene expression analysis was performed by one-step real-time quantitative PCR (RT-qPCR) using the NZY Speedy RT-qPCR Green kit (NZYtech, Lisbon, Portugal) in 20 µL reactions on a CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

All reactions were performed in triplicate, including non-template controls. Gene-specific primers (Table 1) targeting DNMT1, DNMT3A, and DNMT3B were used, with GAPDH selected as the reference gene for normalization due to its reported stable expression in peripheral blood. Primers were designed to span exon-exon junctions to avoid genomic DNA amplification.

Thermal cycling conditions consisted of 50 °C for 15 min, 95 °C for 5 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 45 s, with fluorescence acquisition at each cycle. Relative gene expression was calculated using the  $\Delta\Delta C_t$  method, normalizing target gene  $C_t$  values to the mean  $C_t$  of GAPDH.  $\Delta\Delta C_t$  values were log-transformed for graphical representation.

## 2.3 SD-OCT QUANTITATIVE EVALUATION

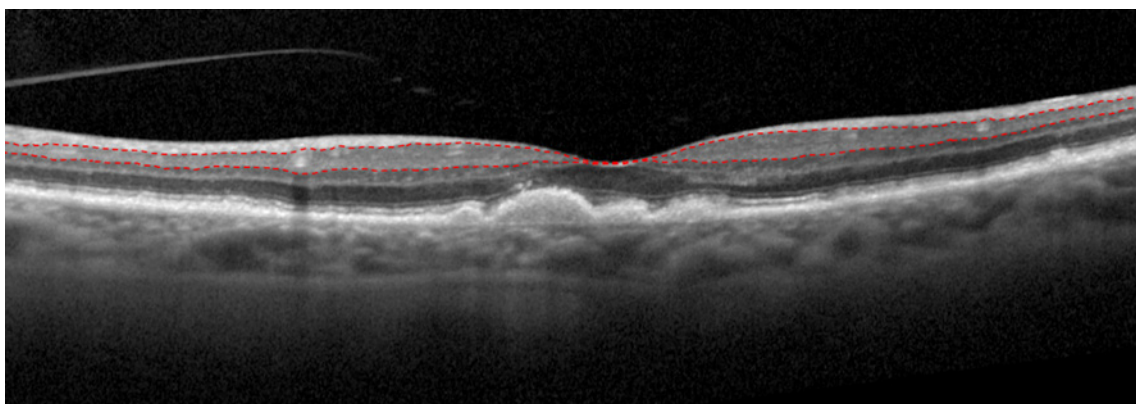
Imaging was performed using spectral-domain optical coherence tomography (SD-OCT; Spectralis®, Heidelberg Engineering®, Germany) with high-density macular raster

protocolo de aquisição de volume macular de alta densidade ( $20^\circ \times 20^\circ$ ), compostos por 49 B-scans horizontais de alta resolução (1024 A-scans por B-scan; resolução axial de  $3,9 \mu\text{m}$ ; média de 7 frames por B-scan). Para a avaliação da coróide, foram adicionalmente adquiridos novos mapas maculares no modo *enhanced depth imaging* (EDI).

A análise estrutural incidiu sobre a espessura combinada da camada de células ganglionares e da camada plexiforme interna (GCL+IPL) e sobre a espessura de coróide, quantificadas nos nove sectores da grelha ETDRS, incluindo o sector central, bem como sobre outros parâmetros derivados do OCT (por exemplo, espessura retiniana total), que não foram considerados na presente análise.

#### 2.4 AVALIAÇÃO COMBINADA DE CÉLULAS GANGLIONARES E CAMADA PLEXIFORME INTERNA

A espessura da GCL+IPL foi calculada como a soma das espessuras da camada de células ganglionares (GCL) e da camada plexiforme interna (IPL), utilizando a segmentação automática disponibilizada pelo software do Spectralis SD-OCT. Sempre que necessário, foi realizada correção manual da segmentação. Os resultados foram analisados nos nove sectores da grelha ETDRS.



**Figura/Figure 1:** Imagem ilustrativa da segmentação automática da GCL+IPL por SD-OCT/ Illustrative image of the automated segmentation of the GCL+IPL by SD-OCT.

**Legenda/Legend:** a linha tracejada superior corresponde ao limite interno da GCL, enquanto a linha tracejada inferior corresponde ao limite externo da camada plexiforme interna (IPL)/the upper dashed line corresponds to the inner boundary of the GCL, while the lower dashed line corresponds to the outer boundary of the inner plexiform layer (IPL).

#### 2.5 QUANTIFICAÇÃO DA ESPESSURA DA CORÓIDE

Para a coróide, tanto na região subfoveal como nos nove sectores da grelha ETDRS, a segmentação foi realizada de forma semi-automática de acordo com o protocolo descrito por Zhao et al. (Figura 2). Este método compreende três etapas principais: em primeiro lugar, procede-se à segmentação automática dos 49 B-scans para quantificação da espessura retiniana total, definida como a distância entre a membrana limitante interna (ILM) e a membrana de Bruch (BM); em segundo, a linha de referência da BM é manualmente deslocada para o limite posterior da coróide, correspondente à interface coróide-esclera (CSI), gerando o mapa da espessura combinada retina-coroide; por fim, a espessura da coróide é obtida subtraindo a espessura retiniana (ILM–BM) à espessura combinada retina-coroide (ILM–CSI), nos nove sectores da grelha ETDRS (Zhao et al., 2020).

volume scans ( $20^\circ \times 20^\circ$ ), consisting of 49 horizontal high-resolution B-scans (1024 A-scans per B-scan; axial resolution  $3.9 \mu\text{m}$ ; 7 frames averaged per B-scan), and additional macular volume scans acquired in enhanced depth imaging (EDI) mode for choroidal assessment.

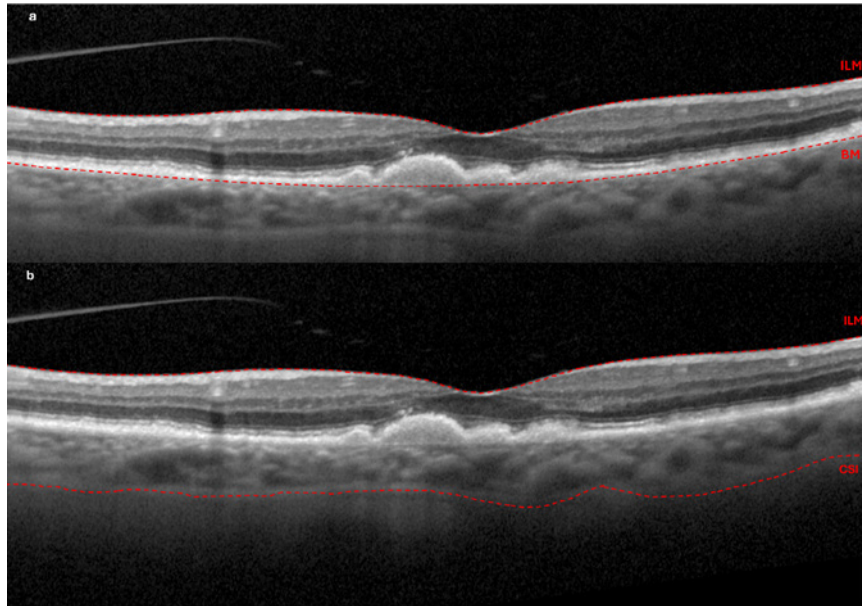
Structural analysis focused on the combined ganglion cell layer and inner plexiform layer thickness (GCL+IPL) and choroidal thickness, quantitatively assessed across the nine sectors of the ETDRS grid, including the central subfield, in addition to other standard OCT-derived metrics (e.g., total retinal thickness), which were not included in the present analysis.

#### 2.4 COMBINED GANGLION CELL LAYER AND INNER PLEXIFORM LAYER

GCL+IPL thickness was calculated as the sum of the ganglion cell layer (GCL) and inner plexiform layer (IPL) thickness, using automated segmentation provided by the Spectralis SD-OCT software. Manual correction was performed when necessary, and results were analyzed across the nine ETDRS grid sectors.

#### 2.5 CHOROIDAL THICKNESS QUANTIFICATION

For the choroid, both in the subfoveal region and across the nine ETDRS grid sectors, segmentation was performed semi-automatically according to the protocol from Zhao et al. (Figure 2). This method consists of three main steps. First, automated segmentation of the 49 B-scans is performed to quantify total retinal thickness, defined as the distance between the internal limiting membrane (ILM) and Bruch's membrane (BM). Second, the reference BM line in the 49 B-scans is manually transposed to the posterior boundary of the choroid (CSI – Choroidoscleral Interface), thereby generating the map corresponding to the combined thickness of retina and choroid. Finally, choroidal thickness is calculated by subtracting retinal thickness (ILM–BM) from the combined retina–choroid thickness (ILM–CSI), across the nine ETDRS grid sectors (Zhao et al., 2020).



**Figura/Figure 2:** Imagem ilustrativa da segmentação semi-automática da coróide por SD-OCT/Illustrative image of semi-automated choroidal segmentation by SD-OCT.

**Legenda/Legend:** BM = membrana de Bruch; CSI = interface coróide-escleral; ILM = membrana limitante interna. (a) As linhas de referência indicam a localização da ILM e da BM; (b) a linha de referência da BM em (a) foi manualmente ajustada para a localização da CSI, permitindo obter a espessura combinada retina–coróide (ILM–CSI)/BM = Bruch's Membrane; CSI = Choroidoscleral Interface; ILM = Internal Limiting Membrane. (a) Reference lines indicate the location of the internal limiting membrane (ILM) and Bruch's membrane (BM); (b) the BM reference line in (a) was manually adjusted to the location of the choroidoscleral interface (CSI) to obtain the combined retina–choroid thickness (ILM to CSI).

## 2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados com o *Statistical Package for the Social Sciences* (IBM SPSS, versão 29). Foram calculadas estatísticas descritivas, incluindo média, desvio-padrão, valores mínimo e máximo para as variáveis contínuas (idade, PIO, MAVC, expressão das DNA metiltransferases e espessura da retina e da coróide), bem como frequências absolutas e relativas para as variáveis categóricas (sexo, olho em estudo e subtipo de DMI). O teste do qui-quadrado foi utilizado para avaliar associações entre os grupos de DMI e as variáveis categóricas. Para as variáveis contínuas, e após o estudo da normalidade pelo teste de Shapiro–Wilk, foram aplicados os testes ANOVA ou Kruskal–Wallis. As correlações lineares entre a expressão das DNMTs e as restantes variáveis contínuas foram avaliadas através dos coeficientes de correlação de Pearson ou de Spearman, de acordo com a distribuição dos dados. Foi considerado um intervalo de confiança de 95% e um nível de significância de 5% em todas as análises.

## 3. RESULTADOS

Este estudo incluiu 34 participantes, dos quais 17 (50%) apresentavam DMI não avançada e 17 (50%) DMI avançada. Na tabela 2 podem ser consultadas as principais características sociodemográficas e clínicas dos participantes nos diferentes estádios da doença.

Verificaram-se diferenças na MAVC entre os diferentes estádios da DMI ( $p = 0,002$ ). Os valores médios mais elevados foram observados nos grupos de DMI inicial ( $74,3 \pm 6,9$  letras ETDRS) e intermédia ( $75,1 \pm 8,9$  letras). Em contraste, verificou-se uma redução da MAVC nas formas avançadas da doença, com valores médios de  $51,0 \pm 15,6$  letras nos participantes com DMI atrófica e de  $59,4 \pm 16,5$  letras no grupo de DMI neovascular. A avaliação estrutural revelou diferenças estatisticamente

## 2.6 STATISTICAL ANALYSIS

Data were analyzed using the Statistical Package for the Social Sciences (IBM SPSS, version 29). Descriptive statistics were calculated, including mean, standard deviation, minimum, and maximum values for continuous variables (age, IOP, BCVA, DNA methyltransferase expression, and retinal and choroidal thicknesses), and absolute and relative frequencies for categorical variables (sex, study eye, and AMD subtype).

The Chi-square test was applied to assess associations between AMD groups and categorical variables (sex, study eye). For continuous variables, normality was verified using the Shapiro–Wilk test, and either ANOVA or Kruskal–Wallis tests were used, as appropriate. Depending on data distribution, linear correlations between DNMT expression and other continuous variables were evaluated using Pearson's or Spearman's correlation coefficients. A 95% confidence interval and a significant level of 5% were considered for all analyses.

## 3. RESULTS

This study included 34 participants, of whom 17 (50%) had non-advanced AMD and 17 (50%) had advanced AMD. Table 2 summarizes the sociodemographic and clinical characteristics across the different disease stages.

Best-corrected visual acuity (BCVA) differed significantly across AMD stages ( $p = 0,002$ ). The highest mean values were observed in the early ( $74.3 \pm 6.9$  ETDRS letters) and intermediate groups ( $75.1 \pm 8.9$  letters). In contrast, reduced BCVA was noted in advanced forms, with mean values of  $51 \pm 15.6$  letters in the atrophic group and  $59.4 \pm 16.5$  letters in the neovascular group.

Structural assessment revealed significant differences in central retinal thickness (CRT;  $p = 0,002$ ). Mean CRT was lowest in atrophic AMD ( $204.2 \pm 56.8 \mu\text{m}$ ) and markedly increased in neovascular AMD ( $420.8 \pm 205.7 \mu\text{m}$ ). A similar pattern was

significativas na espessura retiniana central ( $p = 0,002$ ). A espessura central da retina (CRT) foi mais baixa na DMI atrófica ( $204,2 \pm 56,8 \mu\text{m}$ ) e encontrava-se marcadamente aumentada na DMI neovascular ( $420,8 \pm 205,7 \mu\text{m}$ ). Um padrão semelhante foi observado para a espessura mínima foveal ( $p = 0,002$ ), com os valores mais baixos registados no grupo de DMI atrófica ( $142,5 \pm 71,0 \mu\text{m}$ ) e os valores mais elevados no grupo de DMI neovascular ( $368,3 \pm 196,3 \mu\text{m}$ ).

observed for minimum foveal thickness ( $p = 0.002$ ), with the lowest values recorded in atrophic AMD ( $142.5 \pm 71.0 \mu\text{m}$ ) and the highest in neovascular AMD ( $368.3 \pm 196.3 \mu\text{m}$ ).

**Tabela/Table 2:** Comparação das características sociodemográficas e clínicas entre os diferentes estádios da DMI/Comparison of sociodemographic and clinical characteristics across AMD stages.

	<b>DMI precoce</b> n=4 (11,7%)	<b>DMI intermédia</b> n=13 (38,2%)	<b>DMI atrófica</b> n=5 (14,7%)	<b>DMI neovascular</b> n=12 (35,2%)	<b>p-value</b>
<b>Idade, anos</b> Média ± DP [min.-máx.]	81,5 ± 6,1 [77 – 90]	80,4 ± 3,6 [76 – 86]	80,7 ± 6,7 [70 – 88]	82,8 ± 5,5 [72 – 89]	0,597
<b>Feminino/masculino</b> n (%)	1 (25) / 3 (75)	3 (20,1) / 10 (76,9)	3 (60) / 2 (40)	5 (41,6) / 6 (58,4)	0,167
<b>Olho estudo, n (%)</b> direito/esquerdo	0 (0) / 4 (100)	5 (38,5) / 8 (61,5)	3 (60) / 2 (40)	6 (50) / 6 (50)	0,337
<b>PIO (mmHg)</b> Média ± DP [min.-max]	14,3 ± 2,6 [12 – 18]	14,4 ± 2,7 [10 – 19]	15,0 ± 1,7 [13 – 18]	13,9 ± 2,9 [10 – 19]	0,596
<b>MAVC, ETDRS Letters</b> Mean ± SD [min.-max]	74,3 ± 6,9 [69 – 84]	75,1 ± 8,9 [60 – 85]	51,0 ± 15,6 [34 – 69]	59,4 ± 16,5 [20 – 75]	0,002
<b>CRT, <math>\mu\text{m}</math></b> Média ± DP [min.-max]	271,3 ± 33,6 [231 – 311]	292,9 ± 33,2 [250 – 367]	204,2 ± 56,8 [100 – 257]	420,8 ± 205,7 [238 – 855]	0,002
<b>Fóvea, <math>\mu\text{m}</math></b> Média ± SD [min.-max]	243,4 ± 37,1 [209 – 293]	243,3 ± 27,1 [210 – 310]	142,5 ± 71,0 [20 – 207]	368,3 ± 196,3 [196 – 857]	0,002
<b>GCL+IPL total, <math>\mu\text{m}</math></b> Média ± SD [min.-max]	61,9 ± 5,5 [58 – 70]	72,5 ± 6,9 [62 – 85]	68,8 ± 4,1 [63 – 73]	71,9 ± 11,9 [50 – 91]	0,129
<b>RNFL Total, <math>\mu\text{m}</math></b> Média ± SD [min.-max]	23,7 ± 1,9 [21 – 25]	29,9 ± 4,2 [26 – 40]	31,0 ± 7,8 [21 – 43]	34,2 ± 6,3 [22 – 45]	0,012
<b>Coróide Subfoveal, <math>\mu\text{m}</math></b> Média ± SD [min.-max]	242,5 ± 106,7 [171 – 401]	169,1 ± 66,2 [33 – 270]	154,2 ± 39,4 [111 – 224]	194,3 ± 60,1 [127 – 295]	0,046

**Legenda/Legend:** GCL+IPL = camada combinada de células ganglionares e camada plexiforme interna; RNFL = camada de fibras nervosas da retina; CRT = espessura retiniana central; DMI = degenerescência macular relacionada com a idade; DP = desvio-padrão; ETDRS = Early Treatment Diabetic Retinopathy Study; AVC = acuidade visual corrigida; Máx = máximo; Mín = mínimo; PIO = pressão intraocular. Os valores de idade, PIO, AVC, CRT, fóvea, GCL+IPL total, RNFL total, coróide total e coróide subfoveal são apresentados como média ± desvio-padrão, com os respetivos valores mínimo e máximo. As variáveis categóricas, como sexo e olho em estudo, são expressas em valores absolutos (n) e percentagens (%). Os valores de p foram calculados utilizando os testes de Kruskal-Wallis e do qui-quadrado de Pearson para as variáveis categóricas. Os valores estatisticamente significativos encontram-se destacados a negrito ( $p \leq 0,05$ )/GCL+IPL = combined Ganglion Cell Layer and Inner Plexiform Layer; RNFL = Retinal Nerve Fiber Layer; CRT = Central Retinal Thickness; AMD = Age-related Macular Degeneration; SD = Standard Deviation; ETDRS = Early Treatment Diabetic Retinopathy Study; BCVA = Best-Corrected Visual Acuity; Max = Maximum; Min = Minimum; IOP = Intraocular Pressure. Values for age, IOP, BCVA, CRT, fovea, total GCL+IPL, total RNFL, total choroid, and subfoveal choroid are presented as mean ± standard deviation, with minimum and maximum ranges. Categorical variables such as sex and study eye are expressed as absolute numbers (n) and percentages (%). p-values were calculated using the Kruskal-Wallis and Pearson's Chi-square tests for categorical variables. Statistically significant values are shown in bold ( $p \leq 0.05$ ).

Relativamente às camadas internas da retina, observou-se um aumento progressivo da espessura total da CFNR ao longo dos diferentes estádios da DMI ( $p = 0,012$ ), com valores mais elevados na DMI atrófica avançada ( $31,0 \pm 7,8 \mu\text{m}$ ) e na DMI neovascular ( $34,2 \pm 6,3 \mu\text{m}$ ), em comparação com a DMI inicial ( $23,7 \pm 1,9 \mu\text{m}$ ). Foram igualmente identificadas diferenças estatisticamente significativas na espessura da coróide subfoveal ( $p = 0,046$ ), a qual apresentou os valores médios mais elevados na DMI inicial ( $242,5 \pm 106,7 \mu\text{m}$ ), diminuindo nos estádios intermédio ( $169,1 \pm 66,2 \mu\text{m}$ ), atrófico ( $154,2 \pm 39,4 \mu\text{m}$ ) e neovascular ( $194,3 \pm 60,1 \mu\text{m}$ ).

For the inner retinal layers, a progressive increase in total RNFL thickness was observed across AMD stages ( $p = 0.012$ ), with advanced atrophic ( $31.0 \pm 7.8 \mu\text{m}$ ) and neovascular AMD ( $34.2 \pm 6.3 \mu\text{m}$ ) presenting higher values compared with early AMD ( $23.7 \pm 1.9 \mu\text{m}$ ). Significant differences were also found in subfoveal choroidal thickness ( $p = 0.046$ ), which was greatest in early AMD ( $242.5 \pm 106.7 \mu\text{m}$ ) and decreased in intermediate stages ( $169.1 \pm 66.2 \mu\text{m}$ ), atrophic ( $154.2 \pm 39.4 \mu\text{m}$ ), and neovascular stages ( $194.3 \pm 60.1 \mu\text{m}$ ).

Table 3 presents comparisons of inner retinal and choroidal

Na tabela 3 pode ser observada a comparação da espessura das camadas internas da retina e da coroide nos diferentes sectores da grelha ETDRS (central, anel interno e anel externo), de acordo com os diferentes estádios da DMI. Foram observadas diferenças significativas na espessura da RNFL no anel interno ( $p = 0,042$ ) e no anel externo ( $p = 0,013$ ). No anel interno, os valores médios mais elevados foram identificados na DMI neovascular ( $27,4 \pm 5,9 \mu\text{m}$ ), comparativamente à DMI inicial ( $20,3 \pm 1,6 \mu\text{m}$ ). De forma semelhante, no anel externo, os valores médios mais elevados foram observados nos estádios avançados, particularmente na DMI neovascular ( $44,9 \pm 8,9 \mu\text{m}$ ), quando comparados com a DMI inicial ( $30,3 \pm 2,9 \mu\text{m}$ ).

thickness across ETDRS sectors (central, inner, and outer) at different AMD stages. Differences were noted in RNFL inner circle ( $p = 0.042$ ) and RNFL outer circle ( $p = 0.013$ ). The highest mean thickness values were observed in neovascular AMD ( $27.4 \pm 5.9 \mu\text{m}$ ) compared with early AMD ( $20.3 \pm 1.6 \mu\text{m}$ ) in the inner circle. Similarly, in the outer circle, the highest mean thickness values were found in advanced stages, particularly in neovascular AMD ( $44.9 \pm 8.9 \mu\text{m}$ ) compared with early AMD ( $30.3 \pm 2.9 \mu\text{m}$ ).

**Tabela/Table 3:** Comparação da espessura das camadas internas da retina e da coroide nos diferentes sectores da grelha ETDRS, de acordo com os estádios da DMI/Comparison of inner retinal and choroidal thickness across ETDRS sectors in different AMD stages.

	<b>DMI precoce</b> n=4 (11,7%)	<b>DMI intermédia</b> n=13 (38,2%)	<b>DMI atrófica</b> n=5 (14,7%)	<b>DMI neovascular</b> n=12 (35,2%)	<b>p-value</b>
<b>RNFL anel central, <math>\mu\text{m}</math></b> Médin $\pm$ DP [min.-max]	10,8 $\pm$ 2,9 [14 – 7]	15,3 $\pm$ 2,8 [11 – 21]	14,5 $\pm$ 3,8 [11 – 20]	18,4 $\pm$ 7,1 [6 – 29]	0,074
<b>RNFL anel interno, <math>\mu\text{m}</math></b> Médin $\pm$ DP [min.-max]	20,3 $\pm$ 1,6 [18 – 21]	<b>23,7 <math>\pm</math> 5,3</b> [20 – 39]	25,4 $\pm$ 6,0 [19 – 36]	27,4 $\pm$ 5,9 [15 – 35]	0,042
<b>RNFL anel externo <math>\mu\text{m}</math></b> Médin $\pm$ DP [min.-max]	30,3 $\pm$ 2,9 [26 – 32]	39,7 $\pm$ 4,7 [34 – 46]	40,7 $\pm$ 11,1 [27 – 57]	44,9 $\pm$ 8,9 [32 – 59]	0,013
<b>GCL anel central, <math>\mu\text{m}</math></b> Médin $\pm$ DP [min.-max]	13,3 $\pm$ 5,7 [8 – 20]	13,3 $\pm$ 5,1 [9 – 27]	15,2 $\pm$ 4,3 [11 – 22]	21,3 $\pm$ 6,0 [11 – 29]	0,065
<b>GCL anel interno, <math>\mu\text{m}</math></b> Médin $\pm$ DP [min.-max]	40,8 $\pm$ 5,6 [34 – 48]	50,2 $\pm$ 4,9 [42 – 60]	45,1 $\pm$ 6,8 [38 – 56]	44,6 $\pm$ 10,3 [20 – 61]	0,055
<b>GCL anel externo, <math>\mu\text{m}</math></b> Médin $\pm$ DP [min.-max]	29,3 $\pm$ 2,3 [27 – 32]	34,2 $\pm$ 2,9 [30 – 40]	34,2 $\pm$ 2,4 [31 – 37]	31,9 $\pm$ 4,7 [21 – 40]	0,047
<b>GCL+IPL anel central, <math>\mu\text{m}</math></b> Médin $\pm$ DP [min.-max]	31,3 $\pm$ 9,3 [22 – 43]	37,3 $\pm$ 8,9 [25 – 50]	33,3 $\pm$ 6,3 [25 – 42]	44,0 $\pm$ 6,7 [33 – 52]	0,033
<b>GCL+IPL anel interno, <math>\mu\text{m}</math></b> Médin $\pm$ DP [min.-max]	76,6 $\pm$ 7,3 [70 – 86]	91,0 $\pm$ 9,3 [78 – 110]	84,2 $\pm$ 7,8 [72 – 93]	87,1 $\pm$ 17,7 [56 – 120]	0,106
<b>GCL+IPL anel externo, <math>\mu\text{m}</math></b> Médin $\pm$ DP [min.-max]	54,9 $\pm$ 3,5 [52 – 60]	62,7 $\pm$ 5,7 [54 – 74]	62,3 $\pm$ 2,7 [58 – 65]	63,6 $\pm$ 9,1 [49 – 75]	0,136
<b>Choroide anel central, <math>\mu\text{m}</math></b> Médin $\pm$ DP [min.-max]	223,3 $\pm$ 94,0 [138 – 357]	168,1 $\pm$ 36,8 [84 – 218]	152,5 $\pm$ 38,4 [105 – 215]	173,8 $\pm$ 62,7 [53 – 280]	0,469
<b>Choroide anel interno, <math>\mu\text{m}</math></b> Médin $\pm$ DP [min.-max]	211,8 $\pm$ 81,5 [135 – 326]	157,1 $\pm$ 37,1 [89 – 220]	149,7 $\pm$ 37,9 [93 – 201]	171,1 $\pm$ 54,3 [99 – 257]	0,480
<b>Choroide anel externo, <math>\mu\text{m}</math></b> Médin $\pm$ DP [min.-max]	189,8 $\pm$ 77,7 [129 – 302]	154,0 $\pm$ 35,3 [97 – 204]	154,6 $\pm$ 27,2 [107 – 191]	165,9 $\pm$ 41,1 [109 – 225]	0,813

**Legenda/Legend:** GCL+IPL = camada combinada de células ganglionares e camada plexiforme interna; RNFL = camada de fibras nervosas da retina; DMI = degenerescência macular relacionada com a idade; DP = desvio-padrão; Máx = máximo; Mín = mínimo. Os valores de p foram calculados utilizando o teste de Kruskal-Wallis. Os valores estatisticamente significativos encontram-se destacados a negrito ( $p \leq 0,05$ )/GCL+IPL = combined Ganglion Cell Layer and Inner Plexiform Layer; RNFL = Retinal Nerve Fiber Layer; AMD = Age-related Macular Degeneration; SD = Standard Deviation; Max = Maximum; Min = Minimum. p-values were calculated using the Kruskal-Wallis. Statistically significant values are shown in bold ( $p \leq 0.05$ ).

Na análise isolada da camada de células ganglionares (GCL) observaram-se apenas diferenças ligeiras no anel externo ( $p = 0,047$ ). De forma diferente, a avaliação combinada da camada de células ganglionares e da camada plexiforme interna (GCL+IPL) evidenciou diferenças mais consistentes no sector central ( $p = 0,033$ ), com valores médios de espessura superiores

Only slight differences were observed in the outer circle when analyzing the ganglion cell layer (GCL) in isolation ( $p = 0.047$ ). In contrast, combined Ganglion Cell Layer and Inner Plexiform Layer (GCL+IPL) revealed significant differences in the central circle ( $p = 0.033$ ), with higher mean thickness values detected in advanced neovascular AMD ( $44.0 \pm 6.7 \mu\text{m}$ )

na DMI neovascular ( $44,0 \pm 6,7 \mu\text{m}$ ) em comparação com os restantes estádios.

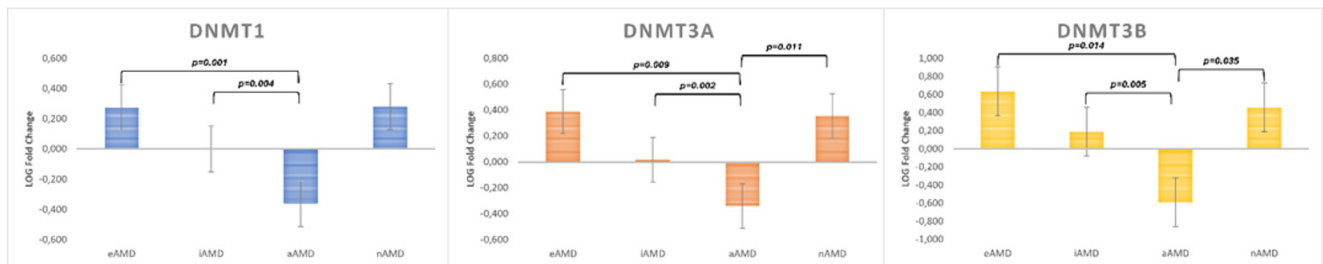
Embora as diferenças na espessura da coroide não tenham sido estatisticamente significativas, os estádios avançados da DMI apresentaram valores médios inferiores aos observados na DMI inicial. Entre os subtipos avançados, a DMI atrófica apresentou a menor espessura.

A Figura 3 ilustra os padrões de expressão transcricional dos moduladores epigenéticos avaliados na coorte estudada. Relativamente à *DNMT1*, observou-se uma redução significativa da expressão na DMI atrófica quando comparada com a DMI inicial ( $p = 0,001$ ) e intermédia ( $p = 0,004$ ). No caso da *DNMT3A*, foi igualmente identificada uma diminuição da expressão na DMI atrófica relativamente à DMI inicial ( $p = 0,009$ ), intermédia ( $p = 0,002$ ) e neovascular ( $p = 0,011$ ). Um padrão semelhante foi observado para a *DNMT3B*, com expressão significativamente reduzida na DMI atrófica em comparação com os estádios inicial ( $p = 0,014$ ), intermédio ( $p = 0,005$ ) e neovascular ( $p = 0,035$ ).

compared with the other stages.

Although differences did not reach statistical significance in choroidal thickness, the advanced AMD stages presented lower mean values than the early AMD group. Within the advanced subtypes, the lowest mean choroidal thickness was found in atrophic AMD.

Figure 3 illustrates the transcriptional patterns of epigenetic modulators obtained in the study cohort. For *DNMT1*, atrophic AMD expression was significantly reduced compared to early ( $p = 0.001$ ) and intermediate AMD ( $p = 0.004$ ). For *DNMT3A*, decreased expression was observed in atrophic AMD relative to early ( $p = 0.009$ ), intermediate ( $p = 0.002$ ), and neovascular AMD ( $p = 0.011$ ). A similar pattern was identified for *DNMT3B*, with reduced expression in atrophic AMD compared with early ( $p = 0.014$ ), intermediate ( $p = 0.005$ ), and neovascular stages ( $p = 0.035$ ).



**Figura/Figure 3:** Expressão relativa dos genes das DNA metiltransferases nos diferentes estádios da DMI/Relative expression of DNA methyltransferase genes across all AMD stages. **Legenda/Legend:** (a) Expressão da DNMT1; (b) expressão da DNMT3A; e (c) expressão da DNMT3B. O gene GAPDH foi utilizado para normalização (valores de  $\Delta\Delta\text{Ct}$  transformados em logaritmo). Os valores de p foram calculados pelo teste de Kruskal-Wallis com comparações múltiplas./ (a) DNMT1 expression; (b) DNMT3a expression; and (c) DNMT3b expression. GAPDH was used for normalization ( $\Delta\Delta\text{Ct}$  values were log-transformed). Significant p-values were calculated by Kruskal-Wallis using multiple comparisons.

A Tabela 4 apresenta as correlações entre a expressão das DNA metiltransferases e as principais variáveis do estudo, estratificadas por estádio de DMI. No grupo de DMI intermédia, foram observadas correlações relevantes entre a expressão das DNMTs e a estrutura retiniana. A expressão da *DNMT1* revelou uma correlação positiva estatisticamente significativa com a espessura central da camada de células ganglionares (GCL) ( $r = 0,561$ ;  $p = 0,045$ ) e com a espessura central combinada da GCL+IPL ( $r = 0,619$ ;  $p = 0,032$ ). Em contraste, as DNA metiltransferases de novo (*DNMT3A* e *DNMT3B*) apresentaram correlações negativas com a espessura central da RNFL ( $r = -0,658$ ;  $p = 0,020$ ) e com a MAVC ( $r = -0,625$ ;  $p = 0,030$ ).

Na DMI neovascular, foi identificado um padrão inverso, no qual a expressão da *DNMT1* apresentou correlações negativas estatisticamente significativas com a espessura média da GCL ( $r = -0,568$ ;  $p = 0,044$ ), com a espessura central combinada da GCL+IPL ( $r = -0,725$ ;  $p = 0,008$ ) e com a espessura da GCL+IPL no anel externo ( $r = -0,568$ ;  $p = 0,047$ ).

Table 4 presents the correlation between DNA methyltransferase expression and the main study variables, stratified by AMD stage. In intermediate AMD, relevant correlations were observed between DNMTs and retinal structure. *DNMT1* expression showed a significant positive correlation with central GCL thickness ( $r = 0.561$ ;  $p = 0.045$ ) and central GCL+IPL thickness ( $r = 0.619$ ;  $p = 0.032$ ). In contrast, the *de novo* methyltransferases *DNMT3A* and *DNMT3B* demonstrated negative correlations with central RNFL thickness ( $r = -0.658$ ;  $p = 0.020$ ) and BCVA ( $r = -0.625$ ;  $p = 0.030$ ).

**Tabela/Table 4:** Correlação entre variáveis clínicas e estruturais e a expressão das DNMTs nos grupos de DMI inicial, intermédia, atrófica e neovascular/Correlação entre variáveis clínicas e estruturais e a expressão das DNMTs nos grupos de DMI inicial, intermédia, atrófica e neovascular.

	DMI precoce n=4 (11,7%)			DMI intermédia n=13 (38,2%)			DMI atrófica n=5 (14,7%)			DMI neovascular n=12 (35,2%)		
	DNMT1	DNMT3A	DNMT3B	DNMT1	DNMT3A	DNMT3B	DNMT1	DNMT3A	DNMT3B	DNMT1	DNMT3A	DNMT3B
<b>Idade, correlação</b> Valor p	-0,680 0,320	-0,862 0,132	-0,154 0,846	0,099 0,760	-0,229 0,474	-0,333 0,290	-0,259 0,620	-0,767 0,075	-0,336 0,515	-0,174 0,594	-0,076 0,815	<b>-0,158</b> <b>0,624</b>
<b>Fóvea, correlação</b> Valor p	-0,201 0,799	0,473 0,527	0,473 0,527	0,163 0,614	-0,273 0,390	-0,273 0,390	-0,428 0,397	-0,170 0,748	-0,170 0,748	0,255 0,423	-0,470 0,123	<b>-0,470</b> <b>0,123</b>
<b>CRT, correlação</b> Valor p	-0,426 0,574	0,527 0,473	0,527 0,473	0,385 0,217	-0,283 0,373	-0,283 0,373	0,407 0,424	0,171 0,746	0,171 0,746	0,281 0,376	-0,508 0,092	<b>-0,508</b> <b>0,092</b>
<b>MAVC, correlação</b> p-value	0,920 0,080	-0,448 0,552	-0,448 0,552	-0,322 0,307	<b>-0,625</b> <b>0,030</b>	<b>-0,625</b> <b>0,030</b>	0,483 0,332	0,422 0,405	0,422 0,405	-0,545 0,067	-0,141 0,661	<b>-0,142</b> <b>0,661</b>
<b>RFNL central, correlação</b> Valor p	-0,509 0,491	0,591 0,409	0,591 0,409	0,060 0,853	<b>-0,658</b> <b>0,020</b>	<b>-0,658</b> <b>0,020</b>	-0,368 0,472	0,774 0,071	0,774 0,071	-0,355 0,257	<b>0,602</b> <b>0,038</b>	<b>0,602</b> <b>0,038</b>
<b>RFNL interno, correlação</b> Valor p	0,561 0,439	-0,819 0,181	-0,819 0,181	0,057 0,859	-0,367 0,240	-0,367 0,240	0,303 0,559	0,569 0,239	0,569 0,239	-0,554 0,062	0,275 0,387	<b>0,275</b> <b>0,387</b>
<b>RFNL externo, correlação</b> Valor p	0,927 0,073	-0,808 0,192	-0,808 0,192	-0,088 0,786	-0,277 0,384	-0,277 0,384	0,368 0,473	0,429 0,396	0,429 0,396	-0,510 0,091	-0,162 0,615	<b>-0,162</b> <b>0,615</b>
<b>GCL central, correlação</b> p-value	-0,307 0,693	0,658 0,342	0,658 0,342	<b>0,561</b> <b>0,045</b>	-0,101 0,754	-0,101 0,754	0,326 0,529	-0,060 0,911	-0,060 0,911	<b>-0,568</b> <b>0,044</b>	0,283 0,373	<b>0,283</b> <b>0,373</b>
<b>GCL interno, correlação</b> p-value	0,455 0,545	0,131 0,869	0,131 0,869	0,448 0,144	-0,108 0,738	-0,108 0,738	0,614 0,195	0,279 0,592	0,279 0,592	-0,315 0,319	0,233 0,467	<b>0,233</b> <b>0,467</b>
<b>GCL externo, correlação</b> p-value	0,522 0,478	-0,026 0,974	-0,026 0,974	0,453 0,139	-0,400 0,197	-0,400 0,197	0,363 0,480	0,557 0,251	0,557 0,251	-0,452 0,141	0,445 0,147	<b>0,445</b> <b>0,147</b>
<b>GCL+IPL central, correlação</b> p-value	-0,291 0,709	0,553 0,447	0,553 0,447	<b>0,619</b> <b>0,032</b>	-0,218 0,497	-0,218 0,497	0,460 0,359	-0,254 0,627	-0,254 0,627	<b>-0,725</b> <b>0,008</b>	0,108 0,737	<b>0,108</b> <b>0,737</b>
<b>GCL+IPL interno, correlação</b> p-value	0,511 0,489	-0,063 0,937	-0,063 0,937	0,509 0,091	-0,129 0,690	-0,129 0,690	0,635 0,175	-0,157 0,766	-0,157 0,766	-0,317 0,315	0,133 0,681	<b>0,133</b> <b>0,681</b>
<b>GCL+IPL externo, correlação</b> p-value	0,442 0,558	-0,200 0,800	-0,200 0,800	0,548 0,065	-0,379 0,224	-0,379 0,224	0,304 0,558	0,302 0,561	0,302 0,561	<b>-0,568</b> <b>0,047</b>	0,390 0,210	<b>0,390</b> <b>0,210</b>
<b>Coroide subfoveal, correlação</b> p-value	0,246 0,754	0,038 0,962	0,038 0,962	-0,145 0,652	-0,427 0,166	-0,427 0,166	0,059 0,912	0,257 0,623	0,257 0,623	-0,340 0,280	0,069 0,832	<b>0,069</b> <b>0,832</b>
<b>Coroide central, correlação</b> p-value	0,475 0,525	-0,254 0,746	-0,254 0,746	-0,415 0,180	-0,361 0,249	-0,361 0,249	-0,331 0,521	0,005 0,992	0,005 0,992	-0,167 0,603	0,267 0,401	<b>0,267</b> <b>0,401</b>
<b>Coroide inner, correlação</b> p-value	0,507 0,493	-0,281 0,719	-0,281 0,719	-0,056 0,863	-0,474 0,120	-0,474 0,120	-0,461 0,358	-0,072 0,892	-0,072 0,892	-0,222 0,488	0,238 0,457	<b>0,238</b> <b>0,457</b>
<b>Coroide outer, correlação</b> p-value	<b>0,741</b> <b>0,529</b>	<b>-0,154</b> <b>0,846</b>	<b>-0,154</b> <b>0,846</b>	<b>0,006</b> <b>0,986</b>	<b>-0,446</b> <b>0,146</b>	<b>-0,446</b> <b>0,146</b>	<b>-0,417</b> <b>0,410</b>	<b>-0,340</b> <b>0,510</b>	<b>-0,340</b> <b>0,510</b>	<b>-0,435</b> <b>0,158</b>	<b>0,166</b> <b>0,606</b>	<b>0,166</b> <b>0,606</b>

**Legenda/Legend:** GCL+IPL = camada combinada de células ganglionares e camada plexiforme interna; RNFL = camada de fibras nervosas da retina; CRT = espessura retiniana central; DMI = degenerescência macular relacionada com a idade. Os valores correspondem aos coeficientes de correlação de Pearson (linha "correlação") e aos respetivos valores de significância estatística (linha "p-valor")/GCL+IPL = Combined Ganglion Cell Layer and Inner Plexiform Layer; RNFL = Retinal Nerve Fiber Layer; CRT = Central Retinal Thickness; AMD = Age-related Macular Degeneration. Values correspond to Pearson's correlation coefficients (row "correlation") and their respective significance values (row "p-value").

Na DMI neovascular, foi identificado um padrão inverso, no qual a expressão da *DNMT1* apresentou correlações negativas estatisticamente significativas com a espessura média da GCL ( $r = -0,568$ ;  $p = 0,044$ ), com a espessura central combinada da GCL+IPL ( $r = -0,725$ ;  $p = 0,008$ ) e com a espessura da GCL+IPL no anel externo ( $r = -0,568$ ;  $p = 0,047$ ).

In neovascular AMD, an inverse pattern was observed, with *DNMT1* expression showing significant negative correlations with mean central GCL thickness ( $r = -0,568$ ;  $p = 0,044$ ), central GCL+IPL thickness ( $r = -0,725$ ;  $p = 0,008$ ), and outer GCL+IPL thickness ( $r = -0,568$ ;  $p = 0,047$ ).

#### 4. DISCUSSÃO

Embora o envolvimento de genes específicos na DMI esteja bem documentado, estima-se que estes expliquem apenas cerca de 40–60% da variabilidade da doença (Fritsche et al., 2014), o que reforça a relevância dos fatores ambientais e potencialmente modificáveis. Neste contexto, os mecanismos epigenéticos têm suscitado um interesse crescente na compreensão da etiologia e progressão da DMI, ao constituírem uma interface dinâmica entre o genoma e o ambiente (Baird and Wei, 2013). Padrões diferenciais de expressão das DNMTs têm sido recentemente descritos ao longo dos diferentes estádios da DMI, sugerindo que vias moleculares distintas poderão desempenhar papéis específicos em fases particulares da doença.

Partindo desta premissa, o presente estudo avaliou se os níveis de expressão da DNMT1, DNMT3A e DNMT3B, previamente associados a diferentes estádios da DMI, se correlacionam com alterações vasculares e/ou neurodegenerativas, avaliadas através de parâmetros coróides e da camada combinada de células ganglionares e camada plexiforme interna (GCL+IPL), medidos por SD-OCT.

Apesar da dimensão da amostra relativamente reduzida, e distribuída de forma equilibrada entre DMI não avançada (50%) e avançada (50%), a estratificação pelos subgrupos resultou em alguma assimetria: DMI inicial (n = 4), intermédia (n = 13), atrófica (n = 5) e neovascular (n = 12). No entanto, não foram identificadas diferenças significativas quanto à idade e ao sexo, variáveis reconhecidamente associadas à prevalência e gravidade da DMI (Fleckenstein, Schmitz-Valckenberg e Chakravarthy, 2024), minimizando efeitos de viés na interpretação dos resultados.

Tal como esperado no contexto do envelhecimento, observaram-se diferenças funcionais e estruturais relevantes (Wood et al., 2011). Do ponto de vista funcional, a MAVC diferiu significativamente entre os estádios da DMI ( $p = 0,002$ ), com melhores valores obtidos na DMI inicial ( $74,3 \pm 6,9$ ) e intermédia ( $75,1 \pm 8,9$ ), e menores valores nas formas avançadas (atrófica:  $51,0 \pm 15,6$ ; neovascular:  $59,4 \pm 16,5$ ). De forma congruente, observaram-se diferenças significativas estruturais na CRT ( $p = 0,002$ ) e na espessura mínima foveal ( $p = 0,002$ ), evidenciando dois padrões distintos: um aumento marcado da CRT e da espessura foveal na DMI neovascular ( $420,8 \pm 205,7 \mu\text{m}$ ;  $368,1 \pm 196,3 \mu\text{m}$ ) e diminuição de espessura na DMI atrófica ( $204,2 \pm 56,8 \mu\text{m}$ ;  $142,5 \pm 71,0 \mu\text{m}$ ). Estes achados refletem características fenotípicas bem descritas, associadas à exsudação na DMI neovascular e à atrofia de diferentes estruturas na DMI atrófica (Salehi et al., 2023).

A análise do impacto das alterações relacionadas com a idade e com a DMI nas camadas neurais internas da retina (Nieves-Moreno et al., 2018) revelou-se metodologicamente desafiante, seja pelo reduzido tamanho da amostra quer pelo desequilíbrio entre os subgrupos estudados. Ainda assim, verificaram-se alguns padrões de estruturais relevantes, que justificam uma investigação adicional em estudos futuros com amostras mais robustas e com desenho longitudinal.

Na análise da RNFL verificou-se um aumento progressivo ao longo dos diferentes estádios da DMI. Embora o espessamento

#### 4. DISCUSSION

Although the involvement of specific genes in AMD is well documented, they are estimated to explain only 40–60% of disease variability (Fritsche et al., 2014). This highlights the importance of environmental and modifiable factors. In this context, epigenetic mechanisms have attracted increasing attention in the understanding of AMD etiology and progression (Baird and Wei, 2013). Differential DNMT expression patterns have recently been described across disease stages, suggesting that distinct molecular pathways may play specific roles in different phases.

Based on this premise, the present study evaluated whether the expression levels of DNMT1, DNMT3A, and DNMT3B, previously associated with various AMD stages, correlate with vascular and/or neurodegenerative changes assessed through choroidal and GCL+IPL parameters measured by SD-OCT.

Despite the relatively small sample size, equally distributed between non-advanced (50%) and advanced AMD (50%), stratification resulted in slightly uneven subgroups: early (n = 4), intermediate (n = 13), atrophic (n = 5), and neovascular (n = 12). However, no significant differences were found for age and sex, variables influencing AMD prevalence and severity (Fleckenstein, Schmitz-Valckenberg e Chakravarthy, 2024), minimizing potential bias in interpreting the results.

As expected with ageing, both functional and structural differences were observed (Wood et al., 2011). Functionally, BCVA differed significantly across AMD stages ( $p = 0.002$ ), with the best ETDRS letter scores in early ( $74.3 \pm 6.9$ ) and intermediate AMD ( $75.1 \pm 8.9$ ), and reduced scores in advanced forms (atrophic:  $51 \pm 15.6$ ; neovascular:  $59.4 \pm 16.5$ ). Structurally, significant differences were found in CRT ( $p = 0.002$ ) and minimum foveal thickness ( $p = 0.002$ ). Two distinct patterns were evident: markedly increased CRT and foveal thickness in neovascular AMD ( $420.8 \pm 205.7 \mu\text{m}$ ;  $368.13 \pm 196.3 \mu\text{m}$ ), and pronounced thinning in atrophic AMD ( $204.2 \pm 56.8 \mu\text{m}$ ;  $142.5 \pm 71.0 \mu\text{m}$ ). These results reflect well-described phenotypic features, with exudation in neovascular AMD and thinning in atrophic AMD (Salehi et al., 2023).

The possibility of investigating the impact of age-related characteristics and AMD on the inner neural layers (Nieves-Moreno et al., 2018) proved to be challenging due to the small sample size and subgroup imbalance. Nevertheless, some interesting thickness patterns emerged that warrant further exploration.

Analysis of total RNFL showed a progressive increase with disease stage. While thickening in neovascular AMD was expected due to intraretinal fluid, the higher values observed in atrophic AMD contrast with analogous studies reporting RNFL thinning in patients progressing to advanced atrophy, particularly in the inner and outer circles (Costa et al., 2025). Although the cross-sectional design prevents assessment of progression rate, the observed increases in the inner circle ( $p = 0.042$ ) and outer circle ( $p = 0.013$ ) may suggest an inflammatory contribution in intermediate and atrophic AMD. Inner circle values were highest in neovascular AMD ( $27.4 \pm 5.9 \mu\text{m}$ ), reflecting macular oedema, whereas intermediate ( $23.7 \pm 5.3 \mu\text{m}$ ) and atrophic ( $25.4 \pm 6.0 \mu\text{m}$ ) AMD also showed higher values than early AMD ( $20.3 \pm 1.6 \mu\text{m}$ ), supporting inflammatory

observado na DMI neovascular seja expectável, atendendo à presença de fluido intrarretiniano, os valores mais elevados identificados na DMI atrófica contrastam com estudos análogos que descrevem uma atrofia da RNFL em doentes em progressão para atrofia avançada, particularmente nos anéis interno e externo da grelha ETDRS (Costa et al., 2025). Apesar desta abordagem transversal não permitir avaliar a taxa de progressão, os aumentos observados no anel interno ( $p = 0,042$ ) e no anel externo ( $p = 0,013$ ) poderão sugerir um contributo inflamatório nas fases intermédia e atrófica da DMI. No anel interno, os valores mais elevados foram observados na DMI neovascular ( $27,4 \pm 5,9 \mu\text{m}$ ), refletindo edema macular, enquanto a DMI intermédia ( $23,7 \pm 5,3 \mu\text{m}$ ) e a DMI atrófica ( $25,4 \pm 6,0 \mu\text{m}$ ) apresentaram igualmente valores superiores aos da DMI inicial ( $20,3 \pm 1,6 \mu\text{m}$ ), reforçando a hipótese do envolvimento de mecanismos inflamatórios. Um padrão semelhante foi observado no anel externo, com maior espessamento na DMI neovascular ( $44,9 \pm 8,9 \mu\text{m}$ ) e na DMI atrófica ( $40,7 \pm 11,1 \mu\text{m}$ ), em comparação com a doença em fase inicial ( $30,3 \pm 2,9 \mu\text{m}$ ).

O estudo da GCL+IPL, atendendo à sua elevada densidade celular na região macular, tem suscitado interesse crescente no contexto da neurodegenerescência retiniana (Nguyen-Ba-Charvet and Rebsam, 2020). No presente estudo, a análise isolada da GCL revelou apenas diferenças ligeiras no anel externo ( $p = 0,047$ ), com valores superiores na DMI neovascular ( $31,9 \pm 4,7 \mu\text{m}$ ). Relativamente à GCL+IPL, foram identificadas diferenças significativas no sector central ( $p = 0,033$ ), novamente com maior espessura média na DMI neovascular avançada ( $44,0 \pm 6,7 \mu\text{m}$ ), quando comparada com os restantes estádios. Contudo, possivelmente devido à dimensão do grupo de DMI exsudativa na nossa coorte, estes resultados diferem parcialmente de outros estudos que descrevem adelgaçamento da GCL+IPL, sobretudo na DMI atrófica ou em fases mais precoces da doença (Farinha et al., 2021).

A avaliação da coroide apresentou desafios adicionais, decorrentes da elevada variabilidade associada à idade (Wood et al., 2011), das particularidades metodológicas da sua medição (Govetto et al., 2017; Manjunath et al., 2011) e da inconsistência de resultados descritos na literatura (Koh et al., 2017). Embora não tenham sido observadas diferenças estatisticamente significativas entre os sectores da grelha ETDRS, verificou-se uma tendência clara de diminuição de espessura progressiva da coroide ao longo dos diferentes estádios da DMI. A espessura da coroide subfoveal revelou diferenças significativas ( $p = 0,046$ ), com valores mais elevados na DMI inicial ( $242,5 \pm 106,7 \mu\text{m}$ ) e redução progressiva na DMI intermédia ( $169,1 \pm 66,2 \mu\text{m}$ ), neovascular ( $194,3 \pm 60,1 \mu\text{m}$ ) e atrófica ( $154,2 \pm 39,4 \mu\text{m}$ ). Estes resultados estão em consonância com os de Sadeghi, que atribuem uma diminuição de espessura da coroide à perda vascular e à atrofia do EPR nos estádios avançados, refletindo o padrão atrófico classicamente descrito (Sadeghi et al., 2025; Schmidt-Erfurth et al., 2024; Wood et al., 2011).

Em contraste, o aumento da espessura da coroide frequentemente descrito na DMI neovascular, associado a processos inflamatórios e angiogénicos, não foi observado no presente estudo. Tal facto poderá ser explicado pela utilização generalizada de terapêutica anti-VEGF na nossa coorte de DMI neovascular, a qual está associada à diminuição da coroide secundária à regressão neovascular e/ou a processos de

involvement. A similar pattern was seen in the outer circle, with the greatest thickening in neovascular ( $44.9 \pm 8.9 \mu\text{m}$ ) and atrophic AMD ( $40.7 \pm 11.1 \mu\text{m}$ ) compared with early disease ( $30.3 \pm 2.9 \mu\text{m}$ ).

The GCL+IPL, given its higher cellular density in the macula, has also drawn increasing interest (Nguyen-Ba-Charvet and Rebsam, 2020). In this study, isolated GCL thickness showed slight differences in the outer circle ( $p = 0.047$ ), with greater values in neovascular AMD ( $31.9 \pm 4.7 \mu\text{m}$ ). For the GCL+IPL, differences were detected in the central circle ( $p = 0.033$ ), again with higher mean thickness in advanced neovascular AMD ( $44.0 \pm 6.7 \mu\text{m}$ ) compared with other stages. However, possibly due to the overrepresentation of exudative AMD in our cohort, these findings differed slightly from other reports that have shown GCL+IPL thinning, particularly in atrophic AMD or earlier stages (Farinha et al., 2021).

Choroidal assessment posed additional challenges, given age-related (Wood et al., 2011), measurement particularities (Govetto et al., 2017; Manjunath et al., 2011), and inconsistent findings in the literature (Koh et al., 2017). Although no significant differences were observed across ETDRS sectors, a clear trend of progressive thinning emerged across AMD stages. Subfoveal choroidal thickness did show significant differences ( $p = 0.046$ ), with the highest values in early AMD ( $242.5 \pm 106.7 \mu\text{m}$ ) and reduced values in intermediate ( $169.1 \pm 66.2 \mu\text{m}$ ), atrophic ( $154.2 \pm 39.4 \mu\text{m}$ ), and neovascular AMD ( $194.3 \pm 60.1 \mu\text{m}$ ). These results align with Sadeghi, who attributed thinning to vascular loss and RPE atrophy in advanced stages, consistent with the classic atrophic pattern already described (Sadeghi et al., 2025; Schmidt-Erfurth et al., 2024; Wood et al., 2011). Conversely, the choroidal thickening often reported in neovascular AMD, associated with inflammatory and angiogenic processes, was not observed here—likely due to the widespread use of anti-VEGF therapy in our neovascular cohort, known to induce choroidal thinning through neovessel regression and fibrotic remodeling (Koh et al., 2017; Sadeghi et al., 2025). Our findings support the hypothesis of vascular impairment in AMD progression, with choroidal thinning reflecting hypoxic and ischemic processes at the RPE (Govetto et al., 2017).

#### 4.1 CORRELATION OF DNMT EXPRESSION WITH STRUCTURAL FINDINGS ACROSS AMD STAGES

In the epigenetic framework of AMD, several studies have identified both hyper- and hypomethylation marks, underscoring the complexity of the pathways involved (Wu et al., 2024). Our group has recently reported differential expression of epigenetic regulators (DNMTs) across AMD stages, with distinct patterns in advanced forms (atrophic and neovascular AMD) highlighting potentially divergent mechanisms (Camacho et al., 2025).

Consistent with previous work, significant downregulation of DNMT1 was found in atrophic AMD compared with intermediate ( $p = 0.004$ ) and early AMD ( $p = 0.001$ ). This downregulation may reflect changes in maintenance methylation in advanced atrophic stages characterized by increased chronic oxidative stress, complement activation, and RPE cell loss. This may be linked to upregulation of the

remodelação fibrótica (Koh et al., 2017; Sadeghi et al., 2025). No seu conjunto, estes achados sustentam a hipótese de compromisso vascular na progressão da DMI, com a diminuição de espessura da coróide a refletir processos hipóxicos e isquémicos ao nível do EPR (Govetto et al., 2017)

#### 4.1 CORRELAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS DNMTS COM OS ACHADOS ESTRUTURAIS AO LONGO DOS DIFERENTES ESTÁDIOS DA DMI

No enquadramento epigenético da DMI, vários estudos têm identificado marcas tanto de hipermetilação como de hipometilação, sublinhando a complexidade das vias moleculares envolvidas na doença (Wu et al., 2024). O nosso grupo descreveu recentemente padrões diferenciais de expressão de reguladores epigenéticos (DNMTs) ao longo dos diferentes estádios da DMI, com perfis distintos nas formas avançadas (atrófica e neovascular), sugerindo a ativação de mecanismos patofisiológicos divergentes (Camacho et al., 2025).

De forma consistente com trabalhos prévios, foi observada uma diminuição significativa da expressão da DNMT1 na DMI atrófica, quando comparada com a DMI intermédia ( $p = 0,004$ ) e inicial ( $p = 0,001$ ). Esta redução poderá refletir alterações nos mecanismos de metilação de manutenção em fases atróficas avançadas, caracterizadas pelo aumento do stress oxidativo crónico, da ativação do sistema complemento e pela perda progressiva de células do EPR. Este fenómeno poderá estar relacionado com a sobre-expressão da cascata do complemento, reconhecida como um dos principais motores da patogénese da DMI pathogenesis (Kumar-Singh, 2019). Embora não tenham sido observadas diferenças estatisticamente significativas entre a DMI atrófica e a DMI neovascular, foi identificada uma tendência para aumento da expressão da DNMT1 nesta última. A hipermetilação associada à DNMT1 já foi associada à diminuição da expressão de SIRT1 e Oct4 em retinas envelhecidas e células do EPR de doentes com DMI (Peng et al., 2011) podendo estar associada a vias de sinalização inflamatória, proliferação celular e processos angiogénicos característicos da DMI neovascular. Atendendo ao papel predominante do stress oxidativo (Maugeri et al., 2018) e do sistema complemento na DMI atrófica, era igualmente expectável a diminuição da expressão das DNMTs de novo, em concordância com estudos anteriores que associam a redução da DNMT3A e DNMT3B à disfunção do EPR e ao stress oxidativo em estádios avançados da doença (Camacho et al., 2025).

No presente estudo, as DNMTs de novo apresentaram um perfil semelhante, com uma diminuição significativa da expressão da DNMT3A na DMI atrófica em comparação com a DMI inicial ( $p = 0,009$ ), intermédia ( $p = 0,002$ ) e neovascular ( $p = 0,011$ ). A DNMT3B seguiu o mesmo padrão, com expressão reduzida relativamente aos estádios inicial ( $p = 0,014$ ), intermédio ( $p = 0,005$ ) e neovascular ( $p = 0,035$ ). Embora a diminuição da expressão da DNMT3A/3B seja consistente com achados anteriores, o aumento observado na DMI neovascular poderá estar em consonância com os resultados anteriores (Li et al., 2020) que descreveram a ativação de vias inflamatórias e angiogénicas associadas à hipermetilação do gene TGFB2. O aumento da expressão de TGFB2 em células do EPR tem sido implicado na promoção de processos fibróticos semelhantes à

complement cascade, a recognized driver of AMD pathogenesis (Kumar-Singh, 2019). Although differences were not significant in neovascular AMD compared to aAMD, an upregulation trend of DNMT1 was observed. DNMT1 hypermethylation has been associated with decreased SIRT1 and Oct4 expression in AMD patients' ageing retinas and RPE cells (Peng et al., 2011) and may be related to inflammatory signaling, cellular proliferation and angiogenic processes present in neovascular AMD stages. Given the predominant role of oxidative stress (Maugeri et al., 2018) and complement in atrophic AMD, downregulation of de novo DNMTs was also anticipated, consistent with previous reports linking reduced DNMT3A/3B expression with RPE dysfunction and oxidative stress in advanced stages (Camacho et al., 2025).

In this study, de novo DNMTs showed a similar profile, with significant DNMT3A downregulation in atrophic AMD compared with early ( $p = 0.009$ ), intermediate ( $p = 0.002$ ), and neovascular ( $p = 0.011$ ) stages. DNMT3B followed the same pattern, with reduced expression relative to early ( $p = 0.014$ ), intermediate ( $p = 0.005$ ), and neovascular ( $p = 0.035$ ) AMD. While DNMT3A/3B downregulation is consistent with previous findings, the upregulation observed in neovascular AMD may align with previous data (Li et al., 2020) who described inflammatory and angiogenic pathways associated with TGFB2 hypermethylation. Increased TGFB2 expression in RPE cells has been shown to promote fibrotic processes resembling scar formation in advanced AMD (Radeke et al., 2015). Together, these findings suggest that DNMT upregulation in neovascular AMD may be associated to pro-angiogenic and pro-fibrotic epigenetic reprogramming.

After characterizing DNMT expression, this study sought to correlate these findings with structural alterations assessed by SD-OCT. In intermediate AMD, significant positive correlations were observed between DNMT1 expression and central GCL thickness ( $r = 0.561$ ;  $p = 0.045$ ) and central GCL+IPL thickness ( $r = 0.619$ ;  $p = 0.032$ ). Particularly in patients with good BCVA, higher DNMT1 levels appeared associated with preserved structural integrity, though longitudinal studies are needed to clarify this relationship and the balance with de novo DNMTs. These associations support a potential role for DNMT1 as a marker of structural resilience in intermediate disease stages. Conversely, higher DNMT3A/3B expression correlated negatively with central RNFL thickness ( $r = -0.658$ ;  $p = 0.020$ ) and BCVA ( $r = -0.625$ ;  $p = 0.030$ ), suggesting a potential detrimental effect on both structural and functional integrity in intermediate stages.

In neovascular AMD, the opposite trend was observed: DNMT1 expression correlated negatively with central GCL thickness ( $r = -0.568$ ;  $p = 0.044$ ), central GCL+IPL thickness ( $r = -0.725$ ;  $p = 0.008$ ), and outer GCL+IPL thickness ( $r = -0.568$ ;  $p = 0.047$ ). Compared with intermediate AMD, this suggests that above a certain threshold, increased DNMT expression may reflect pathophysiological processes that directly or indirectly contribute to neural layer degeneration. This stage-dependent inversion reinforces the concept of DNMTs as dynamic biomarkers reflecting divergent biological pathways rather than uniform disease severity.

It is important to note that, despite structural and functional characterization in early and atrophic AMD, no

formação de cicatriz nos estádios avançados da DMI (Radeke et al., 2015). Em conjunto, estes dados sugerem que a sobre-expressão das DNMTs na DMI neovascular poderá estar associada a um processo de reprogramação epigenética pró-angiogénica e pró-fibrótica.

Após a caracterização da expressão das DNMTs, o presente estudo procurou correlacionar estes achados com as alterações estruturais avaliadas por SD-OCT. Na DMI intermédia, foram observadas correlações positivas estatisticamente significativas entre a expressão da DNMT1 e a espessura central da GCL ( $r = 0,561$ ;  $p = 0,045$ ), bem como com a espessura central combinada da GCL+IPL ( $r = 0,619$ ;  $p = 0,032$ ). Em particular, nos doentes com melhor acuidade visual corrigida, níveis mais elevados de DNMT1 pareceram associar-se à preservação da integridade estrutural, embora sejam necessários estudos longitudinais para clarificar esta relação e o seu equilíbrio com as DNMTs de novo. Estas associações sustentam um potencial papel da DNMT1 como marcador de resiliência estrutural nos estádios intermédios da doença. Em contraste, níveis mais elevados de expressão das DNMT3A e DNMT3B correlacionaram-se negativamente com a espessura central da RNFL ( $r = -0,658$ ;  $p = 0,020$ ) e com a acuidade visual corrigida ( $r = -0,625$ ;  $p = 0,030$ ), sugerindo um possível efeito deletério, simultaneamente estrutural e funcional, nos estádios intermédios da DMI.

Na DMI neovascular, foi observado um padrão oposto, com a expressão da DNMT1 a apresentar correlações negativas com a espessura central da GCL ( $r = -0,568$ ;  $p = 0,044$ ), com a espessura central da GCL+IPL ( $r = -0,725$ ;  $p = 0,008$ ) e com a espessura da GCL+IPL no anel externo ( $r = -0,568$ ;  $p = 0,047$ ). Em comparação com a DMI intermédia, estes resultados sugerem que, acima de determinado limiar, o aumento da expressão das DNMTs poderá refletir processos fisiopatológicos que contribuem direta ou indiretamente para a degenerescência das camadas neurais. Esta inversão dependente do estágio reforça o conceito das DNMTs como biomarcadores dinâmicos, refletindo vias biológicas divergentes, mais do que uma progressão linear da gravidade da doença.

Importa salientar que, apesar da caracterização estrutural e funcional realizada nos grupos de DMI inicial e atrófica, não foram identificadas correlações estatisticamente significativas com a expressão das DNMTs. Ainda assim, os perfis de correlação distintos observados sugerem que os fenótipos avançados (atrófico e neovascular) poderão ser impulsionados por mecanismos patológicos divergentes. Do ponto de vista clínico, estes achados indicam que os perfis de expressão das DNMTs poderão ter utilidade como biomarcadores epigenéticos específicos por estágio, contribuindo para uma melhor compreensão da progressão da doença e para o desenvolvimento de futuras estratégias terapêuticas.

Este estudo apresenta ainda limitações adicionais. Uma limitação relevante deste estudo prende-se com o tamanho reduzido da amostra, particularmente nos grupos de DMI inicial e atrófica, o que poderá ter condicionado a deteção de associações consistentes e limitado o poder estatístico. A distribuição assimétrica dos subgrupos, embora inevitável no contexto clínico real, restringe igualmente a interpretação de associações específicas por estágio e a generalização dos resultados. Estudos futuros com coortes mais alargadas

significant correlations with DNMT expression were identified. Nevertheless, the distinct correlation profiles suggest that advanced phenotypes (atrophic and neovascular) may be driven by divergent pathological mechanisms. From a clinical perspective, these findings suggest that DNMT expression profiles may have potential utility as stage-specific epigenetic biomarkers, contributing to a better understanding of disease progression and informing future therapeutic strategies.

A relevant limitation of this study relates to the relatively small sample size, particularly in the early and atrophic AMD groups, which may have reduced statistical power and limited the detection of consistent associations. The uneven distribution of subgroups, although reflective of real-world clinical settings, further constrains stage-specific interpretations and the generalizability of the findings. Future studies with larger and more balanced cohorts will be essential to minimize bias and strengthen the robustness of the conclusions. In addition, the cross-sectional design precludes causal inference and limits the assessment of temporal relationships between epigenetic alterations and structural retinal changes during AMD progression. Potential clinical and biological confounders, including heterogeneity in treatment exposure, particularly anti-VEGF therapy, and the presence of systemic comorbidities, could not be fully controlled and may have influenced DNMT expression profiles.

Another methodological limitation concerns the use of peripheral blood samples for molecular analyses, which may not fully reflect the local retinal or RPE microenvironment. Nevertheless, previous studies have reported concordant systemic epigenetic signatures in AMD, supporting the relevance of this approach.

Finally, although semi-automated segmentation of SD-OCT-derived structural parameters reduces variability compared with fully manual methods, a residual degree of observer-dependent subjectivity remains. Future research should incorporate intra- and inter-observer reproducibility analyses, as well as longitudinal study designs, to further enhance methodological validity and clinical applicability.

## 5. CONCLUSION

This study highlights AMD's multifactorial complexity and epigenetics' potential contribution to its progression (Camacho et al., 2025). The results suggest that advanced phenotypes (atrophic and neovascular) may arise from distinct pathological pathways, reflected in divergent DNMT expression patterns and their correlations with structural retinal and choroidal parameters. Downregulation of *DNMT1*, *DNMT3A*, and *DNMT3B* in atrophic AMD points to mechanisms related to oxidative stress and retinal pigment epithelium dysfunction, whereas the upregulation observed in neovascular AMD may be linked to inflammatory and angiogenic processes.

The correlations identified between DNMTs and structural measures obtained by SD-OCT reinforce the importance of integrating epigenetic and imaging biomarkers in AMD characterization. Such an integrative approach may allow for more accurate patient stratification and the identification of potential therapeutic targets. Despite limitations related to sample size and cross-sectional design, this work provides

e equilibradas serão essenciais para reduzir potenciais enviesamentos e reforçar a robustez das conclusões.

Adicionalmente, o desenho transversal do estudo impede inferências causais e limita a avaliação das relações temporais entre alterações epigenéticas e modificações estruturais da retina ao longo da progressão da DMI. A presença de potenciais fatores de confundimento clínicos e biológicos, nomeadamente a heterogeneidade na exposição terapêutica (particularmente a terapêutica anti-VEGF) e a coexistência de comorbilidades sistémicas, não pôde ser totalmente controlada e poderá ter influenciado os perfis de expressão das DNMTs.

Outra limitação metodológica reside no facto de as análises moleculares terem sido realizadas em amostras de sangue periférico, que podem não refletir integralmente o microambiente local da retina ou do EPR. No entanto, estudos prévios têm demonstrado a existência de assinaturas epigenéticas sistémicas concordantes na DMI, sustentando a relevância desta abordagem.

Por fim, embora a segmentação semi-automática dos parâmetros estruturais obtidos por SD-OCT reduza a variabilidade face a métodos totalmente manuais, subsiste um grau residual de subjetividade dependente do observador. Investigações futuras deverão integrar análises de reprodutibilidade intra e interobservador, bem como desenhos longitudinais, de modo a reforçar a validade metodológica e a aplicabilidade clínica dos resultados.

## 5. CONCLUSÃO

O presente estudo evidencia a complexidade multifatorial DMI e o potencial contributo dos mecanismos epigenéticos para a sua progressão (Camacho et al., 2025). Os resultados sugerem que os fenótipos avançados (atrófico e neovascular) poderão resultar de vias patológicas distintas, refletidas em padrões divergentes de expressão das DNMTs e nas suas correlações com parâmetros estruturais da retina e da coróide. A diminuição da expressão da *DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B* na DMI atrófica aponta para mecanismos associados ao stress oxidativo e à disfunção do EPR enquanto a sobre-expressão observada na DMI neovascular poderá estar relacionada com processos inflamatórios e angiogénicos.

As correlações identificadas entre as DNMTs e as métricas estruturais obtidas por SD-OCT reforçam a relevância da integração de biomarcadores epigenéticos e imagiológicos na caracterização da DMI. Esta abordagem integrativa poderá permitir uma estratificação mais precisa dos doentes e a identificação de potenciais alvos terapêuticos. Apesar das limitações inerentes ao tamanho da amostra e ao desenho transversal, este trabalho fornece contributos relevantes para a investigação futura no domínio da epigenética e dos biomarcadores imagiológicos da retina. Estudos longitudinais, com coortes mais alargadas e equilibradas, serão essenciais para validar estes resultados e aprofundar o conhecimento do envolvimento epigenético nos diferentes estádios da doença.

## CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram não existir conflitos de interesse que possam ter influenciado o trabalho apresentado.

relevant perspectives for future research in epigenetics and retinal imaging biomarkers. Longitudinal studies, with larger and more balanced cohorts, will be essential to validate these findings and to deepen the understanding of epigenetic involvement across different disease stages.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest that could have influenced the work reported in this article.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This project was partially supported by the IDI&CA grant IPL/IDI&CA2024/INSYDE\_AMD\_ESTeSL, by the Health & Technology Research Center (H&TRC), Lisbon School of Health Technology (ESTeSL), Polytechnic Institute of Lisbon, and by national funding from FCT/MCTES through projects UIDP/05608/2020 (<https://doi.org/10.54499/UIDP/05608/2020>)

## AUTHORS' CONTRIBUTIONS

Conceptualisation, PC, ER, BP, and MB; methodology, PC, AA, LL, DN, CG, ER, CS, and MB; software, AA, LL, DN, PC, and BP; validation, PC, ER, BP, CG, CS, and MB; formal analysis, PC, ER, BP, CG, CS, and MB; research, PC, BP, AA, LL, DN, CG, ER, CS, and MB; writing – preparation of the original draft, PC, ER, BP, CG, CS, and MB; research, PC, BP, AA, LL, DN, CG, ER, CS, and MB; writing – revision and editing, PC, ER, BP, CG, CS and MB; research, PC, BP, AA, LL, DN, CG, ER, CS and MB; supervision, PC, ER, CG, BP and MB; project coordination, PC; obtaining funding, PC. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**AGRADECIMENTOS**

Este projeto foi parcialmente financiado pelo IDI&CA grant IPL/IDI&CA2024/INSYDE\_AMD\_ESTeSL, pelo Health & Technology Research Center (H&TRC), Lisbon School of Health Technology (ESTeSL), Polytechnic Institute of Lisbon, e por financiamento nacional da FCT/MCTES através do projeto UIDP/05608/2020 (<https://doi.org/10.54499/UIDP/05608/2020>).

**CONTRIBUIÇÕES AUTORAIS**

Conceptualização, PC, ER, BP, e MB; metodologia, PC, AA, LL, DN, CG, ER, CS e MB; software, AA, LL, DN, PC e BP; validação, PC, ER, BP, CG, CS e MB; análise formal, PC, ER, BP, CG, CS e MB; investigação, PC, BP, AA, LL, DN, CG, ER, CS e MB; redação - preparação do draft original, PC, ER, BP, CG, CS e MB; investigação, PC, BP, AA, LL, DN, CG, ER, CS e MB; redação - revisão e edição, PC, ER, BP, CG, CS e MB; investigação, PC, BP, AA, LL, DN, CG, ER, CS e MB; supervisão, PC, ER, CG, BP e MB; coordenação do projeto, PC; obtenção de financiamento, PC. Todos os autores leram e concordaram com a versão publicada do manuscrito.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS/REFERENCES**

- Baird, P.N., Wei, L. Age-related macular degeneration and DNA methylation. *Epigenomics*. 2013 <https://doi.org/10.2217/epi.13.19>
- Cachulo, M. da L., Lains, I., Lobo, C., Figueira, J., Ribeiro, L., Marques, J.P., Costa, J., Vieira, A., Rodrigues, J., Alves, D., Nunes, S., Costa, M., Rodrigues, V., Cunha-Vaz, J., Delcourt, C., Silva, R.. Age-related macular degeneration in Portugal: Prevalence and risk factors in a coastal and an inland town. The Coimbra Eye Study - Report 2. *Acta Ophthalmol.* 1–12, 2016. <https://doi.org/10.1111/aos.12950>
- Camacho, P., Dutra-Medeiros, M., Cabral, D., Silva, R. Outer Retina and Choroidal Thickness in Intermediate Age-Related Macular Degeneration: Reticular Pseudodrusen Findings. *Ophthalmic Res.* 59, 212–220, 2018. <https://doi.org/10.1159/000484349>
- Camacho, P., Dutra-Medeiros, M., Páris, L. Ganglion Cell Complex in Early and Intermediate Age-Related Macular Degeneration: Evidence by SD-OCT Manual Segmentation. *Ophthalmologica* 238, 31–43, 2017. <https://doi.org/10.1159/000468965>
- Camacho, P., Ribeiro, E., Pereira, B., Nascimento, J., Caldeira Rosa, P., Henriques, J., Barrão, S., Sadio, S., Quendera, B., Delgadinho, M., Ginete, C., Silva, C., Brito, M. DNA Methyltransferase Expression (DNMT1, DNMT3a, and DNMT3b) as a Potential Biomarker in Age-Related Macular Degeneration. *J. Clin. Med.* 14, 559, 2025. <https://doi.org/10.3390/jcm14020559>
- Corradetti, G., Corvi, F., Nittala, M.G., Nassisi, M., Alagorie, A.R., Scharf, J., Lee, M.Y., Sadda, S.R., Sarraf, D. Natural history of incomplete retinal pigment epithelial and outer retinal atrophy in age-related macular degeneration. *Canadian Journal of Ophthalmology* 56, 325–334, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.cjco.2021.01.005>
- Costa, I., Andrade, H., Pereira, B., Camacho, P. Neurodegeneration and choroidal vascular features on OCT in the progression to advanced age-related macular degeneration. *Int. J. Ophthalmol.* 18, 103–110, 2025. <https://doi.org/10.18240/ijo.2025.01.12>
- Farinha, C., Silva, A.L., Coimbra, R., Nunes, S., Cachulo, M.L., Marques, J.P., Pires, I., Cunha-Vaz, J., Silva, R. Retinal layer thicknesses and neurodegeneration in early age-related macular degeneration: insights from the Coimbra Eye Study. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 259, 2545–2557, 2021. <https://doi.org/10.1007/s00417-021-05140-0>
- Flaxel, C.J., Adelman, R.A., Bailey, S.T., Fawzi, A., Lim, J.I., Vemulakonda, G.A., Ying, G. shuang. Age-Related Macular Degeneration Preferred Practice Pattern®. *Ophthalmology* 127, P1–P65, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2019.09.024>
- Fleckenstein, M., Schmitz-Valckenberg, S., Chakravarthy, U. Age-Related Macular Degeneration: A Review. *JAMA* 331, 147–157, 2024. <https://doi.org/10.1001/jama.2023.26074>
- Fritsche, L.G., Fariss, R.N., Stambolian, D., Abecasis, G.R., Curcio, C.A., Swaroop, A. Age-Related Macular Degeneration: Genetics and Biology Coming Together. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 15, 151–171, 2014. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-090413-025610>
- Govetto, A., Sarraf, D., Figueroa, M.S., Pierro, L., Ippolito, M., Risser, G., Bandello, F., Hubschman, J.P. Choroidal thickness in non-neovascular versus neovascular age-related macular degeneration: A fellow eye comparative study. *British Journal of Ophthalmology* 101, 764–769, 2017. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2016-309281>
- Koh, L.H.L., Agrawal, R., Khandelwal, N., Sai Charan, L., Chhablani, J. Choroidal vascular changes in age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmol.* 95, e597–e601, 2017. <https://doi.org/10.1111/AOS.13399>
- Kumar-Singh, R. The role of complement membrane attack complex in dry and wet AMD - From hypothesis to clinical trials. *Exp. Eye Res.* 184, 266–277, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2019.05.006>
- Li, X., Wang, J., Wang, L., Feng, G., Li, G., Yu, M., Li, Y., Liu, C., Yuan, X., Zang, G., Li, Z., Zhao, L., Ouyang, H., Quan, Q., Wang, G., Zhang, C., Li, O., Xiang, J., Zhu, J.-K., Li, W., Zhou, Q., Zhang, K. Impaired lipid metabolism by age-dependent DNA methylation alterations accelerates aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2020. <https://doi.org/10.1073/pnas.1919403117>
- Manjunath, V., Goren, J., Fujimoto, J.G., Duker, J.S. Analysis of Choroidal Thickness in Age-Related Macular Degeneration Using Spectral-Domain Optical Coherence Tomography. *Am. J. Ophthalmol.* 152, 663, 2011. <https://doi.org/10.1016/J.AJO.2011.03.008>
- Maugeri, A., Barchitta, M., Mazzone, M.G., Giuliano, F., Basile, G., Agodi, A. Resveratrol modulates SIRT1 and DNMT functions and restores LINE-1

- methylation levels in ARPE-19 cells under oxidative stress and inflammation. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 1–14, 2018. <https://doi.org/10.3390/ijms19072118>
- More, P., Almuhtaseb, H., Smith, D., Fraser, S., Lotery, A.J. Socio-economic status and outcomes for patients with age-related macular degeneration. *Eye* 33, 1224–1231, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41433-019-0393-3>
- Nashine, S., Kenney, M.C. Further understanding of epigenetic dysfunction of the retinal pigment epithelium in AMD. *Expert Rev. Ophthalmol.* 15, 221–231, 2020. <https://doi.org/10.1080/17469899.2020.1767597>
- Nguyen-Ba-Charvet, K.T., Rebsam, A. Neurogenesis and Specification of Retinal Ganglion Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 451, 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21020451>
- Nieves-Moreno, M., Martínez-de-la-Casa, J.M., Morales-Fernández, L., Sánchez-Jean, R., Sáenz-Francés, F., García-Feijoó, J. Impacts of age and sex on retinal layer thicknesses measured by spectral domain optical coherence tomography with Spectralis. *PLoS One* 13, 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194169>
- Peng, C.H., Cherng, J.Y., Chiou, G.Y., Chen, Y.C., Chien, C.H., Kao, C.L., Chang, Y.L., Chien, Y., Chen, L.K., Liu, J. hon, Chen, S.J., Chiou, S.H. Delivery of Oct4 and SirT1 with cationic polyurethanes-short branch PEI to aged retinal pigment epithelium. *Biomaterials* 32, 9077–9088, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.08.008>
- Radeke, M.J., Radeke, C.M., Shih, Y.H., Hu, J., Bok, D., Johnson, L. V., Coffey, P.J. Restoration of mesenchymal retinal pigmented epithelial cells by TGF $\beta$  pathway inhibitors: Implications for age-related macular degeneration. *Genome Med.* 7, 1–19, 2015. <https://doi.org/10.1186/s13073-015-0183-x>
- Sadeghi, E., Valsecchi, N., Rahmanipour, E., Ejlalidiz, M., Hasan, N., Vupparaboina, K.K., Ibrahim, M.N., Rasheed, M.A., Baek, J., Iannetta, D., Chhablani, J. Choroidal biomarkers in age-related macular degeneration. *Surv. Ophthalmol.* 70, 167–183, 2025. <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2024.10.004>
- Salehi, M.A., Mohammadi, S., Gouravani, M., Rezagholi, F., Arevalo, J.F. Retinal and choroidal changes in AMD: A systematic review and meta-analysis of spectral-domain optical coherence tomography studies. *Surv. Ophthalmol.* 68, 54–66, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2022.07.006>
- Schmidt-Erfurth, U., Mai, J., Reiter, G.S., Riedl, S., Vogl, W.-D., Sadeghipour, A., McKeown, A., Foos, E., Scheibler, L., Bogunovic, H. Disease activity and therapeutic response to pegcetacoplan for geographic atrophy identified by deep learning-based analysis of OCT. *Ophthalmology* 1–13, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2024.08.017>
- Sitnilska, V., Enders, P., Cursiefen, C., Fauser, S., Altay, L. Association of imaging biomarkers and local activation of complement in aqueous humor of patients with early forms of age-related macular degeneration. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 259, 623–632, 2021. <https://doi.org/10.1007/s00417-020-04910-6>
- Wei, L., Liu, B., Tuo, J., Shen, D., Chen, P., Li, Z., Liu, X., Ni, J., Dagur, P., Sen, H.N., Jawad, S., Ling, D., Park, S., Chakrabarty, S., Meyerle, C., Agron, E., Ferris, F.L., Chew, E.Y., McCoy, J.P., Blum, E., Francis, P.J., Klein, M.L., Guymier, R.H., Baird, P.N., Chan, C., Nussenblatt, R.B. Hypomethylation of the IL17RC Promoter Associates with Age-Related Macular Degeneration. *Cell Rep.* 2, 1151–1158, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.10.013>
- Wong, W.L., Su, X., Li, X., Cheung, C.M.G., Klein, R., Cheng, C.Y., Wong, T.Y. Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob. Health* 2, e106–e116, 2014. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(13\)70145-1](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(13)70145-1)
- Wood, A., Binns, A., Margrain, T., Drexler, W., Povaay, B., Esmaeelpour, M., Sheen, N. Retinal and choroidal thickness in early age-related macular degeneration. *Am. J. Ophthalmol.* 152, 1030–1038.e2, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2011.05.021>
- Wu, J., Liu, L. lin, Cao, M., Hu, A., Hu, D., Luo, Y., Wang, H., Zhong, J. ning. DNA methylation plays important roles in retinal development and diseases. *Exp. Eye Res.* 211, 108733, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2021.108733>
- Wu, X., Yang, X., Dai, X., Chen, X., Shen, M., Dai, J., Yuan, F., Wang, L., Yuan, Y., Feng, Y. 5-Aza-2'-Deoxycytidine Ameliorates Choroidal Neovascularization by Inhibiting the Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Pathway. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 65, 23, 2024. <https://doi.org/10.1167/iovs.65.2.23>
- Zhang, S., Ren, J., Chai, R., Yuan, S., Hao, Y. Global burden of low vision and blindness due to age-related macular degeneration from 1990 to 2021 and projections for 2050. *BMC Public Health* 24, 2024. <https://doi.org/10.1186/s12889-024-21047-x>
- Zhao, M., Alonso-caneiro, D., Lee, R., Cheong, A.M.Y., Yu, W., Wong, H., Lam, A.K.C. Comparison of Choroidal Thickness Measurements Using Semiautomated and Manual Segmentation Methods 97, 121–127, 2020. <https://doi.org/10.1097/OPX.0000000000001473>