



**UNICAMP**

**FABIO ENDO HIRATA**

**AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO *RS10490924* DO GENE *LOC387715* EM  
UMA POPULAÇÃO BRASILEIRA COM DEGENERAÇÃO MACULAR  
RELACIONADA À IDADE**

**CAMPINAS**

**2015**





**UNICAMP**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**Faculdade de Ciências Médicas**

**FABIO ENDO HIRATA**

**AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO *RS10490924* DO GENE *LOC387715* EM  
UMA POPULAÇÃO BRASILEIRA COM DEGENERAÇÃO MACULAR  
RELACIONADA À IDADE**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, área de concentração Oftalmologia.

**ORIENTADORA: PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. MÔNICA BARBOSA DE MELO**

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO FABIO ENDO HIRATA, E ORIENTADO PELA PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. MÔNICA BARBOSA DE MELO.

**CAMPINAS**

**2015**

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

H613a Hirata, Fabio Endo, 1980-  
Avaliação do polimorfismo rs10490924 do gene *loc387715* em uma população brasileira com degeneração macular relacionada à idade / Fabio Endo Hirata. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Mônica Barbosa de Melo.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Degeneração macular. 2. Polimorfismo genético. I. Melo, Mônica Barbosa de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Assessment of the *loc387715* gene polymorphism rs10490924 in a brazilian population with age-related macular degeneration

**Palavras-chave em inglês:**

Macular degeneration

Polymorphism, Genetic

**Área de concentração:** Oftalmologia

**Titulação:** Mestre em Ciências Médicas

**Banca examinadora:**

Mônica Barbosa de Melo [Orientador]

Marcelo Lima Ribeiro

Cláudia Vianna Maurer Morelli

**Data de defesa:** 26-06-2015

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

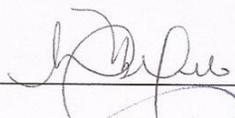
**BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO**

FABIO ENDO HIRATA

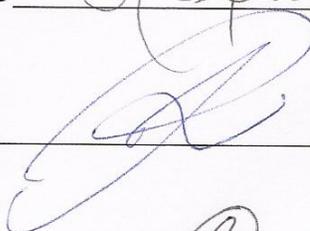
Orientador (a) PROF(A). DR(A). MONICA BARBOSA DE MELO

**MEMBROS:**

1. PROF(A). DR(A). MONICA BARBOSA DE MELO



2. PROF(A). DR(A). MARCELO LIMA RIBEIRO



3. PROF(A). DR(A). CLÁUDIA VIANNA MAURER MORELLI



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

Data: 26 de junho de 2015.



## RESUMO

**Introdução:** A degeneração macular relacionada à idade (DMRI) é uma doença crônica degenerativa que afeta a área macular da retina causando diminuição da visão central. É a causa mais comum de perda visual irreversível nos países desenvolvidos. A DMRI é caracterizada pela presença de drusas, anormalidades do epitélio pigmentar da retina (EPR), atrofia geográfica, descolamento do EPR, neovascularização de coróide e cicatriz disciforme. Sua etiologia permanece pouco esclarecida, entretanto fatores genéticos associados a fatores ambientais possuem papel na etiologia e na progressão da doença. Dentre as variações gênicas, uma associação entre o polimorfismo *A1a69Ser* do gene *LOC387715/ARMS2* (*rs10490924 C/T*) e o desenvolvimento da DMRI tem sido relatada em diferentes populações. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi avaliar se o polimorfismo *rs10490924* está associado com a DMRI em uma amostrada população brasileira. **Métodos:** Cento e vinte e seis pacientes, sem parentesco, com DMRI (idade média de  $74,17 \pm 7,64$ ) foram comparados com 86 controles saudáveis (idade média  $71,82 \pm 7,12$ ). Os sujeitos do estudo foram classificados de acordo com o tipo de DMRI em DMRI seca e DMRI exsudativa. O polimorfismo *LOC387715/ARMS2 rs10490924* foi avaliado através da reação em cadeia da polimerase e sequenciamento direto. **Resultados:** A frequência do alelo T foi significativamente maior em pacientes com DMRI do que nos controles (39,6% em comparação com 20,3%,  $p = 0,00002$ ). O odds ratio (OR) para DMRI foi de 2,05 (IC95 % 1,09-3,89) para os heterozigotos (TG) e 8,45 (IC95 % 2,21-37,82) para homozigotos (TT). **Conclusões:** Os resultados

sugerem que há uma contribuição do SNP *rs10490924* do gene *LOC387715/ARMS2* para susceptibilidade à DMRI nesta amostra da população brasileira.

**Palavras-chave:** Degeneração macular, polimorfismo genético.

## ABSTRACT

**Introduction:** Age-related macular degeneration (AMD) is a chronic degenerative disease that affects the macular area causing decreased central vision. It is the most common cause of irreversible vision loss in developed countries. It is characterized by the presence of drusen, abnormalities of the retinal pigment epithelium (RPE), geographic atrophy, RPE detachment, choroidal neovascularization, and disciform scar. The etiology of AMD remains poorly understood, but genetic factors associated with environmental factors have a role in the etiology and progression of the disease. Among the analyzed genetic variations, an association between *LOC387715/ARMS2 (rs10490924)* gene polymorphism and AMD has been reported in different populations.

**Purpose:** The aim of this study was to evaluate whether this polymorphism is associated with AMD in a Brazilian cohort. **Methods:** A hundred and twenty six unrelated AMD patients (mean age  $74.17 \pm 7.64$ ) were compared with 86 healthy controls (mean age  $71.82 \pm 7.12$ ). Study subjects were classified according to the type of AMD in dry and wet AMD. The *LOC387715/ARMS2 rs10490924* polymorphism was evaluated through polymerase chain reaction and direct sequencing. **Results:** The T allele frequency was significantly higher in AMD patients than controls (39.6% compared to 20.3%,  $p = 0.00002$ ). The odds ratio (OR) for AMD was 2.05 (CI95% 1.09-3.89) for heterozygotes (TG) and 8.45 (CI95% 2.21-37.82) for homozygotes (TT). **Conclusions:** These results suggest that there is a contribution of the rs10490924 SNP of the *LOC387715/ARMS2* gene to AMD susceptibility in this sample of Brazilian population.

**Key words:** Macular degeneration, genetic polymorphism.

# SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO.....  | 1  |
| 1.1. Definição da degeneração macular relacionada à idade (DMRI)..... | 1  |
| 1.2. Classificação da DMRI.....                                       | 2  |
| 1.3. Epidemiologia da DMRI.....                                       | 5  |
| 1.4. Etiologia da DMRI.....   | 8  |
| 1.4.1. Gene <i>LOC387715</i> .....                                    | 12 |
| 1.5. Tratamento da DMRI.....  | 14 |
| 1.5.1. Tratamento da DMRI atrófica.....                               | 14 |
| 1.5.2. Tratamento da DMRI exsudativa.....                             | 14 |
| 1.6. Justificativa.....   | 19 |
| 2. OBJETIVOS.....   | 21 |
| 3. MÉTODOS.....   | 22 |
| 3.1. Tipo de estudo.....  | 22 |
| 3.1.1. Casuística.....  | 22 |
| 3.1.1.1. Critérios de inclusão: Grupo DMRI.....                       | 22 |
| 3.1.1.2. Critérios de inclusão: Grupo controle.....                   | 23 |
| 3.1.1.3. Critérios de exclusão: Grupos DMRI e controle.....           | 23 |
| 3.1.2. Aspectos éticos.....   | 24 |
| 3.1.3. Métodos diagnósticos.....                                      | 25 |
| 3.1.4. Biologia molecular.....  | 26 |
| 3.1.4.1. Extração de DNA do sangue periférico.....                    | 26 |

|   |    |
|---|----|
| 3.1.4.2. Reação em cadeia da polimerase ..... | 28 |
| 3.1.4.3. Sequenciamento automático.....       | 28 |
| 3.1.5. Análise estatística.....               | 30 |
| 4. RESULTADOS.....                            | 31 |
| 5. DISCUSSÃO.....                             | 35 |
| 6. CONCLUSÕES.....                            | 40 |
| <br>  |    |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....              | 41 |
| <br>  |    |
| ANEXOS.....                                   | 52 |

## DEDICATÓRIA

*À minha esposa Jemima pelo amor, confiança, incentivo e apoio nos momentos mais difíceis.*

*À minha família, em especial ao meu irmão Fernando e à minha mãe Luci pelo auxílio e amizade.*

*Ao meu filho Lucas, que renovou minhas forças para terminar essa jornada.*



## **AGRADECIMENTOS**

À Prof. Dra. Mônica Barbosa de Melo pela paciência, compreensão e persistência durante todo o percurso.

Ao Prof. Dr. José Paulo Cabral de Vasconcellos pela sugestão do tema e colaboração.

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Leite Arieta e à Prof. Dra. Keila Miriam Monteiro de Carvalho pelo incentivo à pesquisa em Oftalmologia.

À Dra. Andréa Mara Simões Torigoe e ao Dr. Maurício Abujamra Nascimento pelos ensinamentos e pela ampla contribuição na avaliação e acompanhamento dos pacientes.

Ao Dr. Eugênio Santana de Figueiredo pelo incentivo e amizade.

Ao Sr. Anderson Tavares e à Sra. Daniela Stancato pelo apoio e constante companhia nas bancadas do laboratório.



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|               |   |
|---------------|---|
| <b>ANCHOR</b> | Anti-VEGF Antibody for the Treatment of Predominantly Classic Choroidal Neovascularization in AMD |
| <b>AREDS</b>  | Age-related eye disease study   |
| <b>ARMS2</b>  | Age-related macular susceptibility 2  |
| <b>C</b>      | Citosina  |
| <b>C2</b>     | Proteína do complemento 2   |
| <b>CARMS</b>  | Clinical age-related maculopathy staging system   |
| <b>CATT</b>   | Comparison of AMD Treatments Trials   |
| <b>CBMEG</b>  | Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética  |
| <b>CEP</b>    | Comitê de ética em pesquisa   |
| <b>CFB</b>    | Fator de complemento B  |
| <b>CFH</b>    | Fator de complemento H  |
| <b>CRP</b>    | Proteína C reativa  |
| <b>DMRI</b>   | Degeneração macular relacionada à idade   |
| <b>dNTP</b>   | Desoxirribonucleotídeo trifosfatado   |
| <b>EDTA</b>   | Ácido etilenodiaminotetraacético  |
| <b>EPR</b>    | Epitélio pigmentar da retina  |
| <b>ETDRS</b>  | Early Treatment Diabetic Retinopathy Study  |
| <b>FCM</b>    | Faculdade de Ciências Médicas   |
| <b>G</b>      | Guanina   |
| <b>H</b>      | Histidina   |

|                |   |
|----------------|---|
| <b>HTRA1</b>   | High-temperature requirement factor A1  |
| <b>IBGE</b>    | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística   |
| <b>IC</b>      | Intervalo de confiança  |
| <b>IVAN</b>    | A randomised controlled trial of alternative treatments to inhibit VEGF in Age-related choroidal Neovascularisation                   |
| <b>MARINA</b>  | Minimally Classic/Occult Trial of the Anti-VEGF Antibody Ranibizumab in the Treatment of Neovascular Age-Related Macular Degeneration |
| <b>MNVC</b>    | Membrana neovascular de coróide   |
| <b>NEI</b>     | National Eye Institute  |
| <b>OCT</b>     | Tomografia de coerência óptica  |
| <b>OMS</b>     | Organização mundial de saúde  |
| <b>OR</b>      | Odds ratio  |
| <b>p</b>       | Probabilidade estatística   |
| <b>PCR</b>     | Reação em cadeia da polimerase  |
| <b>PDT</b>     | Terapia fotodinâmica  |
| <b>PRN</b>     | Pro re nata   |
| <b>PrONTO</b>  | Prospective OCT Imaging of Patients with Neovascular AMD Treated with Intra-Ocular Lucentis   |
| <b>SNP</b>     | Single nucleotide polymorphism  |
| <b>T</b>       | Timina  |
| <b>TCLE</b>    | Termo de Consentimento Livre e Esclarecido  |
| <b>UNICAMP</b> | Universidade Estadual de Campinas   |

|             |  |
|-------------|--|
| <b>UV</b>   | Luz ultravioleta                         |
| <b>VEGF</b> | Fator de crescimento endotelial vascular |
| <b>Y</b>    | Tirosina                                 |



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Definição da DMRI

A degeneração macular relacionada à idade (DMRI) é uma doença crônica degenerativa que compromete a área macular da retina (Figura 1) causando diminuição da visão central <sup>(1)</sup>. Afeta indivíduos idosos, sendo a causa mais comum de perda visual irreversível nos países desenvolvidos <sup>(2,3)</sup>. A DMRI é caracterizada desde a presença de drusas passando por anormalidades do epitélio pigmentar da retina (EPR), atrofia geográfica, descolamento do EPR, neovascularização de coróide até a cicatriz disciforme. A neovascularização de coróide pode apresentar complicações como o descolamento seroso da retina sensorial, geralmente acompanhado por exsudatos duros e hemorragias subretinianas <sup>(4)</sup>.

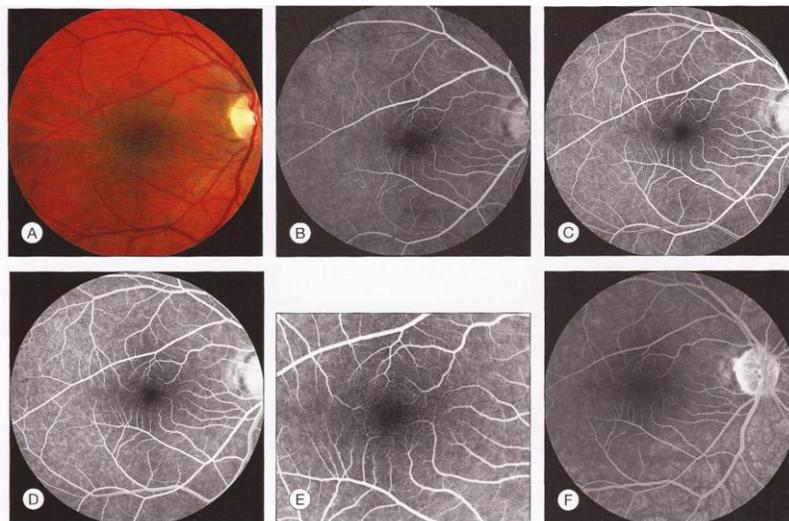


Figura 1. Retinografia e angiografia de uma área macular normal. Fonte: Ryan SJ, Schchat AP, editors. Retina. Los Angeles, CA, USA: Elsevier; 2006. p. 890.

## 1.2. Classificação da DMRI

A doença pode ser classificada em duas categorias: DMRI atrófica, seca, não-exsudativa e DMRI neovascular, exsudativa. A forma atrófica da doença é a mais comum e apresenta-se como uma diminuição lenta e progressiva da visão central caracterizada pela presença de drusas e atrofia geográfica do EPR. Drusas são depósitos de material extracelular localizadas tipicamente entre a membrana basal das células do EPR e a membrana de Bruch. As drusas podem ser classificadas de acordo com seu tamanho e aspecto. Drusas com diâmetro menor que  $63\mu\text{m}$  são consideradas pequenas, aquelas apresentando entre  $63\mu\text{m}$  e  $125\mu\text{m}$  são intermediárias e as maiores que  $125\mu\text{m}$  são drusas extensas. Quanto ao aspecto, as drusas podem ser duras, moles ou coalescentes (Figura 2). As duras são menores e apresentam limites bem definidos, já as moles apresentam bordas irregulares e mal definidas<sup>(5,6)</sup>.



Figura 2. DMRI seca com drusas moles. Fonte: Ryan SJ, Schchat AP, editors. Retina. Los Angeles, CA, USA: Elsevier; 2006. p. 1058.

O padrão exsudativo é menos frequente, entretanto é responsável pela maioria dos casos em que a perda visual é mais acentuada. Caracteriza-se pela presença de membrana neovascular de coróide (MNVC) (Figuras 3 e 4). Tais membranas podem ser divididas em três grupos distintos de acordo com critérios angiográficos: predominantemente clássica, minimamente clássica ou oculta <sup>(5,6)</sup>.

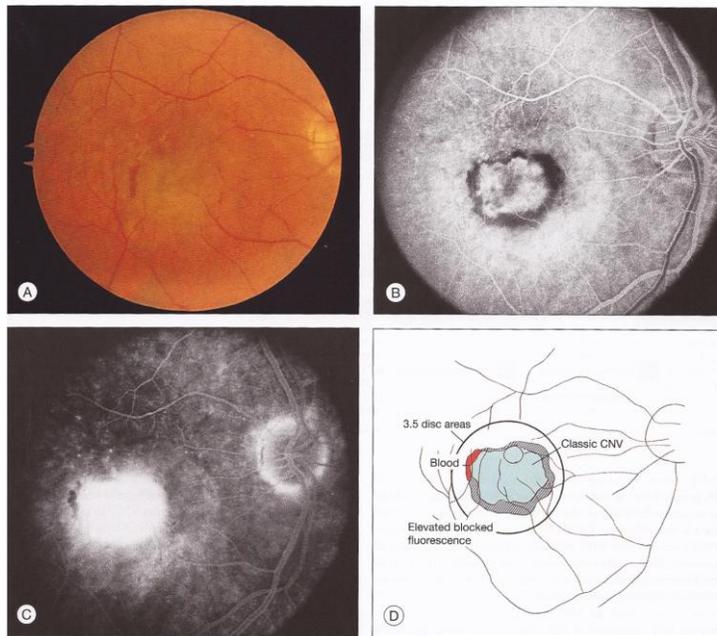


Figura 3. Figura 3. DMRI exudativa com MNVC clássica. Fonte: Ryan SJ, Schchat AP, editors. Retina. Los Angeles, CA, USA: Elsevier; 2006. p. 1085.

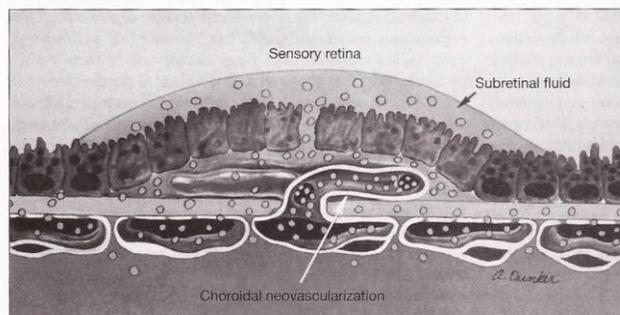


Figura 4. Desenho esquemático de uma MNVC demonstrando o crescimento de vasos a partir da coreocapilar, através de uma quebra na membrana de Bruch, até o espaço abaixo do EPR. Fonte: Ryan SJ, Schchat AP, editors. Retina. Los Angeles, CA, USA: Elsevier; 2006. p.

Existem diferentes sistemas de classificação de DMRI utilizados em estudos clínicos e epidemiológicos. Muitos desses estudos utilizam as definições do *International Epidemiological Age-related Maculopathy Study Group*, no qual a DMRI inicial é definida como uma desordem degenerativa em indivíduos com idade  $\geq 50$  anos e caracterizada pela presença de drusas moles (grande,  $\geq 63 \mu\text{m}$ ), áreas de hiperpigmentação associadas a drusas, excluindo pigmentos ao redor de drusas duras e áreas de despigmentação ou hipopigmentação associadas à drusas. Estas áreas, as quais comumente ocorrem com o desaparecimento das drusas, são frequentemente mais bem demarcadas e não expõem os vasos da coróide. Esta classificação excluiu da definição de DMRI a presença de drusas duras ou alterações de pigmentação isoladamente <sup>(6)</sup>.

O *Clinical Age-related Maculopathy Staging System (CARMS)* consiste de uma escala com cinco níveis clínicos baseados em fotografias de fundo e avaliação clínica. A DMRI intermediária ou avançada inclui os graus 3, 4 e 5 da escala. O grau 3 requer a presença de no mínimo 15 drusas intermediárias ou

uma drusa grande associados ou não a descolamento drusenóide do EPR. A presença de atrofia geográfica envolvendo a região central da mácula ou atrofia geográfica não central com pelo menos 350 µm define o estágio 4 da doença. O estágio 5 é caracterizado pela presença de doença do tipo exsudativo, incluindo descolamento do epitélio pigmentar não drusenóide, descolamento de retina hemorrágico ou seroso, MNVC com fibrose ou hemorragia subretiniana, cicatriz consistente com tratamento de DMRI, MNVC e cicatriz disciforme. Em 2006 foi publicada avaliação sobre o CARMS, a qual concluiu que tal sistema é válido e confiável tanto para a prática clínica quanto para uso em protocolos de pesquisa clínica envolvendo pacientes com DMRI <sup>(7)</sup>.

Um sistema de escala de severidade dividido em 9 estágios baseado nas alterações encontradas em fotografias de fundo estereoscópicas coloridas foi divulgado em 2005 no relatório número 17 do *Age-Related Eye Disease Study* (AREDS) <sup>(8)</sup>.

### **1.3. Epidemiologia da DMRI**

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que em 2010 havia cerca de 246 milhões de pessoas com baixa visão e aproximadamente 39 milhões de pessoas com cegueira, das quais 82% e 65%, respectivamente, corresponderiam a indivíduos com mais de 50 anos. A DMRI seria a terceira causa de cegueira na população mundial, atrás apenas de catarata e glaucoma, sendo responsável por 5% dos casos <sup>(9)</sup>.

No Brasil existem aproximadamente 1,4 milhão de cegos e cerca de 4 milhões de pessoas com perda visual grave. Estima-se que aproximadamente 3 milhões de idosos na população brasileira apresentem DMRI em diferentes estágios <sup>(10)</sup>. Estudo transversal envolvendo dois grupos de 100 indivíduos acima de 55 anos atendidos em dois hospitais oftalmológicos localizados no estado de Pernambuco descreveu uma frequência de DMRI de 23% e 30% das pessoas examinadas <sup>(11)</sup>. Já um estudo realizado no estado do Paraná publicado em 2008 avaliou 478 imigrantes japoneses e descendentes de japoneses com idade superior a 60 anos e encontrou uma prevalência de DMRI de 15,1% dos indivíduos <sup>(12)</sup>.

A prevalência de DMRI aumenta acentuadamente com a idade <sup>(2,3,11,12)</sup>. Segundo o *Framingham Eye Study* 2% dos americanos entre 52 e 64 anos são afetados pela doença, 11% daqueles entre 65 e 74 anos, atingindo 28% dos indivíduos com 75 anos ou mais <sup>(13)</sup>. A prevalência da doença está aumentando devido ao aumento da expectativa de vida e consequente envelhecimento da população. Estima-se que o número de indivíduos afetados pela doença nos Estados Unidos aumente em cerca de 50% entre os anos de 2000 e 2020, alcançando 2,95 milhões de pessoas <sup>(14)</sup>. No Brasil, a redução da taxa de fecundidade associada ao aumento da expectativa de vida da população tem como resultado o envelhecimento populacional, o qual é caracterizado pela redução da participação relativa de crianças e jovens, ao mesmo tempo em que se observa um aumento relativo dos adultos e, em especial, dos idosos. Enquanto os indivíduos com 65 anos de idade ou mais representavam 6,53% da

população brasileira em 2008, projeta-se que esse mesmo grupo etário corresponderá a 22,71% da população total em 2050 (Figura 5) <sup>(15)</sup>. Portanto, baseado na mudança do perfil etário da população brasileira para as próximas décadas, espera-se um aumento da incidência e prevalência da DMRI nesta população.

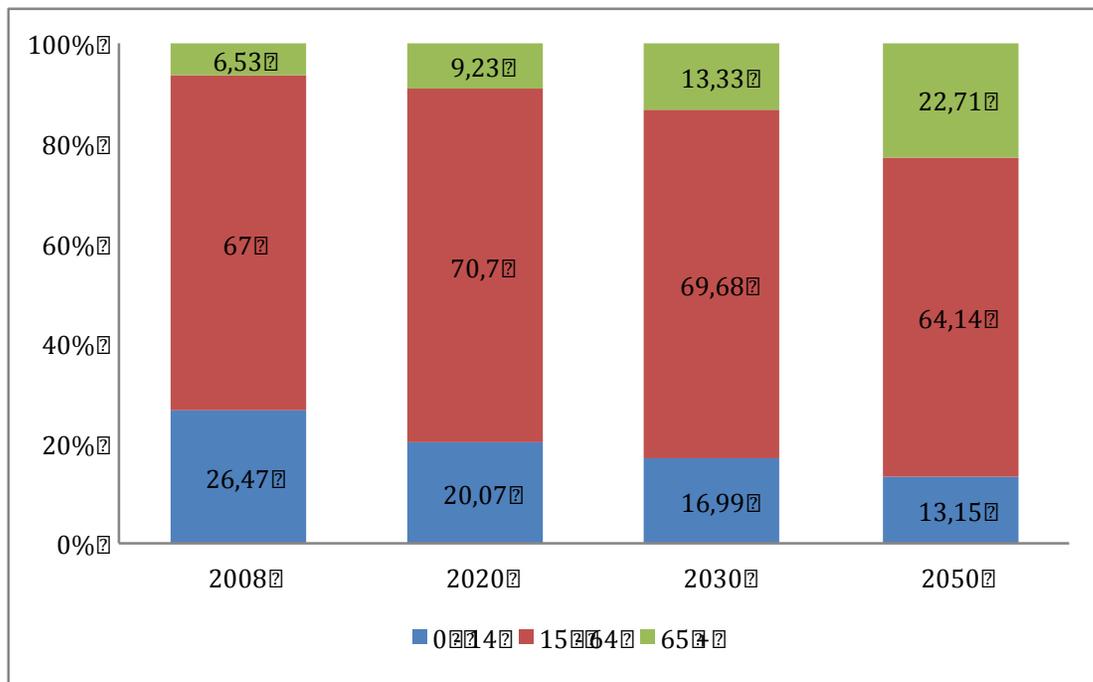


Figura 5. Projeção do contingente populacional, segundo a faixa etária em anos (0-14, 15-64 e mais de 65), no Brasil, 2008 – 2050. Fonte: IBGE, 2008

Estudos não evidenciaram diferença significativa na prevalência da doença entre os gêneros <sup>(13.14)</sup>. No entanto, em relação às características étnicas reportou-se menor prevalência das características da DMRI em uma população negra. <sup>(16)</sup> e prevalência acentuadamente maior entre brancos, esta última

relatada em estudo de revisão conduzido pelo *The Eye Diseases Prevalence Research Group*<sup>(17)</sup>.

#### **1.4. Etiologia da DMRI**

A etiologia da DMRI permanece pouco esclarecida, entretanto fatores ambientais associados a fatores genéticos possuem papel importante tanto na etiologia quanto na progressão da doença<sup>(17)</sup>. Entre os fatores de risco a idade situa-se como o principal fator para o desenvolvimento da DMRI. Demonstrou-se o aumento da prevalência, partindo de 0% em pacientes com menos de 55 anos para 18,5% em maiores de 85 anos em uma população australiana<sup>(18)</sup> e uma razão de chances de 4,2 por década de vida em uma população europeia<sup>(19)</sup>.

Entre os fatores ambientais, o tabagismo é um fator de risco bastante estudado, associado tanto ao diagnóstico quanto à progressão da doença. Outros fatores de risco como obesidade abdominal, aumento do índice de massa corpórea, hipertensão e outras doenças cardiovasculares, dieta rica em lipídeos também foram apontados como fatores de risco para a doença<sup>(17,20)</sup>.

Estudos de agregação familiar demonstraram a contribuição de fatores genéticos para o desenvolvimento da DMRI, relatando maior concordância entre gêmeos monozigóticos comparada a gêmeos dizigóticos<sup>(21)</sup>.

Diversas regiões cromossômicas apresentaram evidência de ligação à doença<sup>(22,23,24,25,26)</sup>. A região cromossômica 1q32 foi apontada como possível localização de genes candidatos ligados à DMRI<sup>(22,23,24,25,26)</sup>. Uma variante na

sequência do gene do *Fator de Complemento H (CFH)*, localizado nessa região, está relacionada à doença. Tal variação consiste em um polimorfismo genético. Polimorfismos representam variações nas sequências de bases nitrogenadas do DNA que estão presentes em mais de 1% da população. Esse polimorfismo de nucleotídeo único (single nucleotide polymorphism, SNP) é caracterizado por uma troca de timina (T) por citosina (C) na posição 1277 do gene e resulta na substituição de um aminoácido histidina (H) por uma tirosina (Y) no códon 402 da proteína. Pode-se referir a esse polimorfismo genético como 1277T>C ou T1277C e a mudança resultante no aminoácido como Y402H ou Tyr402His <sup>(27,28,29)</sup>.

CFH é um componente do sistema imunológico que possui uma ação imunomoduladora sobre a resposta inflamatória. Tal ação ocorre através da regulação do sistema de complemento, o qual atua na proteção contra infecções atacando células displásicas e doentes e poupando as células saudáveis. A ativação do complemento ocorre por diferentes vias, as quais determinam a formação de uma enzima convertase C3 e subsequente ativação da resposta imune. O resultado final da ativação destas vias é a lise celular através da formação de um complexo de ataque à membrana celular (C5b-9). O CFH presente nas células e no sistema circulatório regula a atividade do complemento inibindo a ativação de C3 em C3a e C3b e inativando o C3b existente. Depósitos de componentes do sistema complemento, como o complexo C5b-9, e outros marcadores inflamatórios foram identificados em drusas e na coróide de pacientes com DMRI <sup>(27)</sup>.

Uma resposta inflamatória inadequada, que inclui uma ativação inapropriada do sistema de complemento, tem sido implicada na patogenia da DMRI. O polimorfismo tirosina-histidina está localizado na região do *CFH* que se liga à heparina e à proteína c reativa (CRP). Níveis séricos elevados de CRP estão associados com a doença <sup>(28)</sup>.

Em um estudo de mapeamento genético do tipo caso controle, Klein et al. observaram um aumento no risco de DMRI de 7,4 vezes em pacientes homocigotos para o alelo de risco representado pela mudança histidina-tirosina na posição 402 do *CFH*, comparado ao grupo controle <sup>(27)</sup>. Haines et al. verificaram um aumento significativo do risco de DMRI, com intervalo de confiança entre 2,45 e 5,57, em pacientes portadores do polimorfismo histidina402-tirosina402 <sup>(28)</sup>. Associação significativa ( $P = 4,95 \times 10^{-10}$ ) com esse mesmo polimorfismo também foi identificada por Edwards et al. Segundo este autor, a presença de apenas um aminoácido histidina na posição 402 do *CFH* aumentou em 2,7 vezes o risco de DMRI <sup>(29)</sup>.

Estudos independentes também têm associado a região 10q26 com a DMRI <sup>(22,23,24,26)</sup>, sendo os genes candidatos *LOC387715* <sup>(30,31,32,33)</sup> e *HTRA1* (*high-temperature requirement factor A1*) <sup>(34,35,36,37)</sup>, presentes nessa região, os mais estudados. O gene *HTRA1* codifica um membro de uma família de proteases séricas. Um aumento na expressão do *HTRA1* resulta em mudanças estruturais na camada elástica da membrana de Bruch através da quebra de componentes da matriz extracelular <sup>(34)</sup>. Na DMRI exsudativa ocorre invasão da matriz

extracelular pelos capilares da coróide, a qual pode ser favorecida por um aumento na expressão do *HTRA1*<sup>(35)</sup>.

Diferentes autores demonstraram que o polimorfismo *rs11200638* na região promotora do gene *HTRA1* está associado com a DMRI<sup>(34,35,36,37)</sup>. Yang et al. estimaram um risco atribuído à população de 49,3% conferido por esse polimorfismo<sup>(35)</sup>. Outro estudo de mapeamento genético envolvendo o genoma completo (caso-controle) também reportou um risco 10 vezes maior em indivíduos portadores do genótipo de suscetibilidade *rs11200638* (DeWang et al.)<sup>(36)</sup>. Em estudo publicado por Yoshida et al. observou-se que esse polimorfismo está associado à DMRI exsudativa na população japonesa<sup>(37)</sup>.

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é uma das principais proteínas responsáveis pelo controle da angiogênese. Tal proteína pode apresentar isoformas de diferentes comprimentos contendo 189, 165 ou 121 aminoácidos. O VEGF165 é a isoforma predominante no olho e encontra-se em níveis aumentados no EPR e na camada nuclear externa da retina em olhos com DMRI exsudativa<sup>(38)</sup>. O gene responsável pela codificação do VEGF está localizado na região 21 do braço curto do cromossomo 6 (6p21) e também foi associado ao desenvolvimento da doença. Churchill e colaboradores, em estudo publicado em 2006 relataram que o genótipo CC na posição 674 do gene está associado com DMRI (OR = 2,40, IC95% 1,09-5,26, p = 0,027)<sup>(39)</sup>. Estudo publicado em 2012 envolvendo uma amostra da população brasileira também encontrou associação entre DMRI e o polimorfismo +674C>T do gene do *VEGF*. Observou-se uma prevalência de homozigose para o alelo de risco T de 18,1%

entre os casos com DMRI em comparação com 5,8% entre os controles (P <0,002). Os OR foram de 1,5 (IC95% 1,1-2,1, P <0,01) para heterozigotos TC e de 3,6 (IC95% 1,6-8,2) para indivíduos homozigóticos TT comparados com indivíduos sem o alelo de risco (GG)<sup>(40)</sup>.

Diversos outros genes foram estudados quanto à possibilidade de associação com a DMRI, entre eles podemos citar os genes do *fator de complemento B (CFB)* e do *componente do complemento 2 (C2)*, os quais codificam outras proteínas reguladoras do sistema complemento. Os polimorfismos L9H e R32Q do gene do *CFB* e E318D do gene do *C2* foram associados com uma redução do risco para DMRI em diferentes estudos<sup>(41,42)</sup>.

#### 1.4.1. Gene *LOC387715*

O gene *LOC387715*, também conhecido com *age-related maculopathy susceptibility 2 (ARMS 2)*, é formado por 2 exons e encontra-se na região 16 do braço longo do cromossomo 10. A proteína codificada é constituída por uma sequência de 107 aminoácidos e pode ser encontrada em diferentes órgãos e tecidos, incluindo a retina. Um SNP no qual ocorre a substituição de uma base nitrogenada guanina (G) por uma T resulta na produção de uma sequência diferente de aminoácidos com uma serina ocupando o lugar de uma alanina no códon 69. Esse SNP é identificado como *rs10490924* e a substituição do aminoácido pode ser descrita como *A69S* ou *Ala69Ser*<sup>(30)</sup>.

Os resultados obtidos por Rivera et al. em um estudo caso controle envolvendo uma população caucasiana indicaram que o polimorfismo do gene

*LOC387715* apresentava contribuição independente do polimorfismo do gene *CFH* para o risco de DMRI. Indivíduos homozigotos para o alelo de risco correspondente ao polimorfismo *Ala69Ser* apresentaram um risco 7,6 vezes maior de DMRI quando comparados aos controles <sup>(30)</sup>. Posteriormente Tanimoto et al. demonstraram que esse polimorfismo também está associado à DMRI na população japonesa <sup>(31)</sup>.

Uma meta-análise publicada em 2010 incluiu 13 estudos caso-controle envolvendo o polimorfismo *rs10490924* do gene *LOC387715/ARMS2* e DMRI. Segundo essa meta-análise indivíduos portadores dos genótipos TT e TG apresentavam uma OR de 7,51 e 2,35, respectivamente, em comparação com aqueles que carregavam o genótipo GG<sup>(32)</sup>.

Uma associação entre DMRI e polimorfismos presentes nos genes *CFH* e *LOC387715* foi recentemente descrita em uma amostra da população brasileira em estudo publicado por Almeida et al<sup>(33)</sup>.

Estudo conduzido por Shuler et al. envolvendo os dois genes de suscetibilidade, *LOC387715 (Ala69Ser)* e *CFH (Tyr402His)*, indicou que pacientes homozigotos para os dois polimorfismos podem apresentar início mais precoce de DMRI neovascular que indivíduos heterozigotos para um dos genes <sup>(43)</sup>. Um outro estudo, realizado na população americana, concluiu que esses mesmos polimorfismos estão independentemente associados à progressão de DMRI leve a moderada para DMRI avançada <sup>(44)</sup>

Estudos recentes tem avaliado se o polimorfismo do gene *LOC387715* está associado às diferentes respostas ao tratamento da DMRI <sup>(45,46)</sup>. O trabalho

publicado por Kitchens et al. demonstrou uma associação estatisticamente significativa entre o polimorfismo *LOC387715A69S* e a resposta ao tratamento baseados exames de tomografia de coerência óptica (OCT), sendo que os portadores do genótipo de risco TT estavam associados a um maior risco de não responder ao tratamento <sup>(45)</sup>.

## **1.5. Tratamento da DMRI**

O tratamento da DMRI difere segundo sua categoria, atrófica ou exsudativa, e segundo a gravidade da doença.

### *1.5.1. Tratamento da DMRI atrófica*

Segundo o *Age-Related Eye Disease Study* (AREDS), indivíduos com DMRI atrófica intermediária (uma drusa extensa ou poucas drusas intermediárias ou atrofia geográfica não subfoveal) ou DMRI atrófica avançada unilateral foram beneficiados com o uso de suplementação em altas doses consistindo de antioxidantes, vitaminas e zinco, apresentando uma diminuição estatisticamente significativa no risco de progressão para DMRI avançada. Indivíduos sem alterações sugestivas de DMRI ou com alterações precoces (poucas drusas pequenas) não obtiveram tal benefício <sup>(47)</sup>.

### *1.5.2. Tratamento da DMRI exsudativa*

Recentemente o uso de medicações antiangiogênicas na prevenção e no tratamento da neovascularização de coróide tem sido estudado e atualmente o tratamento da DMRI exsudativa é realizado através da aplicação intra-vítrea dessas drogas<sup>(48,49,50)</sup>.

Foi demonstrado por estudo publicado em 1997 que pacientes portadores de DMRI exsudativa apresentavam aumento da expressão de fatores angiogênicos nas camadas externas da retina, entre estes fatores, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)<sup>(51)</sup>.

Estudo publicado em 2005 por Michels e colaboradores demonstrou que pacientes portadores de DMRI exsudativa apresentaram não apenas melhora da acuidade visual, como também melhora ao exame de tomografia de coerência óptica e à angiografia, após o uso sistêmico endovenoso de bevacizumabe (Avastin, Genentech Inc., South San Francisco, CA, EUA), um anticorpo monoclonal humanizado usado no tratamento de câncer colorretal metastatizado. Este anticorpo se liga a todas as isoformas do VEGF-A<sup>(52)</sup>.

O ranibizumabe (Lucentis, Novartis, South San Francisco, CA, EUA) é um fragmento de anticorpo monoclonal que se liga ao VEGF-A. Através dessa ligação, o ranibizumabe é capaz de inibir seletivamente o VEGF-A, impedindo a ligação do mesmo a seus receptores presentes nas células endoteliais resultando em inibição da neovascularização<sup>(48)</sup>.

Estudos de fase I/II concluíram que o ranibizumabe apresentava segurança aceitável para administração intravítrea por até seis meses e estava

associado com melhora da acuidade visual em indivíduos com DMRI neovascular<sup>(48)</sup>.

Um estudo de fase III, multicêntrico, randomizado, duplo-cego, controlado, conhecido como MARINA (*Minimally Classic/Occult Trial of the Anti-VEGF Antibody Ranibizumab in the Treatment of Neovascular Age-Related Macular Degeneration*), avaliou o uso de ranibizumabe durante dois anos em indivíduos apresentando neovascularização de coróide minimamente clássica ou oculta associada à DMRI. Aproximadamente 95% dos pacientes em tratamento mensal com ranibizumabe tanto com 0.3 mg como com 0.5 mg não apresentaram baixa de acuidade visual adicional comparados a 62% dos pacientes que receberam placebo ( $p < 0.001$ ). Houve melhora da acuidade visual em cerca de um quarto do grupo que recebeu doses de 0.3 mg e um terço do grupo que recebeu injeções de 0.5 mg. Apenas 5% do grupo controle apresentaram tal melhora ( $p < 0.001$ )<sup>(49)</sup>.

O estudo ANCHOR (*Anti-VEGF Antibody for the Treatment of Predominantly Classic Choroidal Neovascularization in AMD*) comparou injeções intravítreas mensais de ranibizumabe, nas doses de 0.3 mg e 0.5 mg, com o uso da PDT associada à verteporfina para o tratamento de indivíduos com DMRI neovascular predominantemente clássica. O estudo demonstrou superioridade do ranibizumabe após o primeiro ano de acompanhamento na prevenção de perda visual adicional com 96% dos pacientes recebendo 0.5 mg de ranibizumab mensais apresentando perda visual menor do que 15 letras de ETDRS comparado a 94% daqueles que receberam doses mensais de 0.3 mg e 64%

daqueles tratados com PDT e verteporfina. Além disso, ocorreu melhora da acuidade visual de mais de 15 letras de ETDRS em 40% dos pacientes tratados com 0.5 mg de ranibizumab, 35% daqueles tratados com doses mensais de 0.3 mg e 5% dos pacientes pertencentes ao grupo tratado com PDT e verteporfina<sup>(50)</sup>.

O acompanhamento desses pacientes por 2 anos confirmou a superioridade das aplicações mensais de ranibizumab frente ao tratamento com PDT e verteporfina. Quanto à prevenção de perda visual, em 90% dos casos tratados mensalmente com ranibizumabe não ocorreu perda visual maior que 15 letras comparado com 65,7% do grupo controle, tratado com PDT e verteporfina. Além disso, 34% dos pacientes do grupo ranibizumabe obtiveram um ganho visual maior que 15 letras, sendo que no grupo controle esse percentual foi de 6,3%. Avaliando-se a variação visual média, o grupo ranibizumabe apresentou um ganho visual médio de 8,1 letras, enquanto foi observada uma perda em média de 9,8 letras no grupo controle ao final de dois anos de acompanhamento<sup>(53)</sup>.

Diferentes estudos buscaram diminuir o número de aplicações intravítreas de antiangiogênicos em substituição ao regime de tratamento mensal. O estudo PrONTO (*Prospective OCT Imaging of Patients with Neovascular AMD Treated with Intra-Ocular Lucentis*) avaliou a eficácia do tratamento com ranibizumabe através de um regime de tratamento que incluiu três injeções mensais iniciais seguidas de retratamento *pro re nata* (PRN), ou seja, de acordo a necessidade. Uma perda visual maior que 5 letras ou aumento da espessura retiniana central

maior que 100 micrômetros foram os critérios de retratamento utilizados durante o primeiro ano de acompanhamento dos pacientes. Durante o segundo ano do estudo, os critérios de retratamento foram alterados para incluir o retratamento nos casos de qualquer aumento da quantidade de fluido intra ou sub-retiniano. O percentual de pacientes que apresentou uma melhora visual maior do que 15 letras após dois anos de acompanhamento foi de 43%, resultado semelhante aos encontrados nos estudos baseados em aplicações mensais. A utilização de critérios baseados na acuidade visual e na tomografia de coerência óptica (OCT) resultou em um número menor de injeções intravítreas, com uma média de 9,9 injeções por paciente em 24 meses<sup>(54)</sup>.

Foram realizados estudos comparando-se a eficácia do bevacizumabe e do ranibizumabe no tratamento da DMRI exsudativa<sup>(55,56)</sup>.

O estudo CATT (*Comparison of AMD Treatments Trials*) comparou a eficácia do tratamento utilizando-se duas medicações, ranibizumabe e bevacizumabe, usadas em diferentes regimes, mensal e PRN. Ranibizumabe e bevacizumabe apresentaram efeitos similares na acuidade visual após um período de dois anos de tratamento. Quanto ao regime de tratamento, a melhora visual média foi maior nos grupos que receberam aplicações mensais, quando comparada com aquela apresentada nos grupos tratados conforme a necessidade<sup>(55)</sup>. Em outubro de 2013 foram divulgados os resultados de dois anos do estudo IVAN (*A randomised controlled trial of alternative treatments to Inhibit VEGF in Age-related choroidal Neovascularisation*), com resultados semelhantes aos encontrados no CATT, com as medicações apresentando

resultados similares e o regime mensal de tratamento superior ao tratamento PRN<sup>(56)</sup>.

O aflibercept (Eyelia, Regeneron, Tarrytown, NY, and Bayer Health Care, Berlin, Germany) é outro anti-angiogênico disponibilizado recentemente para o tratamento da DMRI exsudativa. Estudo publicado em 2012 demonstrou que o aflibercept apresenta eficácia e segurança similares ao ranibizumabe. Tal estudo comparou o tratamento mensal com ranibizumabe com diferentes regimes de tratamento utilizando-se o aflibercept em pacientes apresentando DMRI exsudativa com MNVC subfoveal ou justafoveal com vazamento afetando a fóvea. Quanto à alteração média na acuidade visual, foi demonstrado que o aflibercept apresentou eficácia não inferior e foi clinicamente equivalente ao ranibizumabe mensal após o primeiro ano de acompanhamento. Todos os regimes de tratamento com aflibercept também resultaram em melhorias semelhantes ao ranibizumabe nas medidas anatômicas. Eventos adversos oculares e sistêmicos também foram semelhantes comparando-se todos os grupos de tratamento<sup>(57)</sup>.

## **1.6. Justificativa**

O papel do polimorfismo *rs10490924* no gene *LOC387715* tem sido bastante estudado em diversas populações que diferem etnicamente da população brasileira, principalmente pela alta miscigenação aqui presente. Logo, para que a informação sobre o risco desse polimorfismo em relação à DMRI na

população brasileira seja conhecido é necessária a avaliação de uma amostra de casos e controles, em princípio da população local e posteriormente de amostras de populações de diferentes regiões do Brasil. Estabelecer padrões genéticos de risco em nossa população poderá contribuir para o diagnóstico precoce da doença e para um tratamento personalizado dos pacientes em busca de melhores resultados.

## 2. OBJETIVOS

Os objetivos do estudo foram:

1. Avaliar a frequência do polimorfismo Ala69Ser encontrado no gene *LOC387715* em uma amostra de pacientes com DMRI e em indivíduos sem a doença provenientes da população brasileira do estado de São Paulo.
2. Comparar a presença dos alelos de risco do polimorfismo pesquisado nos pacientes com DMRI, levando-se em consideração afetados e não afetados e também por meio da divisão dos pacientes em subgrupos distintos de acordo com o subtipo de doença apresentada: atrófica ou exsudativa. Avaliar se tais variações genéticas apresentam maior relevância em um determinado subgrupo.

### **3. MÉTODOS**

#### **3.1. Tipo de estudo**

Foi realizado estudo do tipo caso-controle envolvendo indivíduos portadores de DMRI, tanto do tipo atrófica quanto do tipo exsudativa, e indivíduos que constituíram um grupo controle sem sinais da doença.

##### *3.1.1. Casuística*

Os participantes foram recrutados no Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) entre 2008 e 2010. Cada participante assinou o termo de consentimento, que fazia parte do protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade CEP 919/2007 (Anexo 1). Uma série consecutiva de 126 pacientes portadores de DMRI, sem parentesco, foi comparada com 86 indivíduos sem a doença.

##### 3.1.1.1 Critérios de inclusão: Grupo DMRI

Os sujeitos do estudo foram avaliados de acordo com a classificação proposta pelo *International ARM Epidemiological Study Group*. Foram observados ambos os tipos de DMRI avançada. A DMRI exsudativa ou neovascular, que é definida pela presença de pelo menos uma das seguintes características: descolamento do EPR em um dos olhos; membrananeovascular

sub-retiniana ou sub-EPR; cicatriz ou tecido glial epirretiniano, intrarretiniano, sub-retiniano ou sub-EPR; hemorragia intrarretiniana, sub-retiniana ou sub-EPR; exsudatos duros lipídicos dentro da área macular relacionados com as características anteriores, cicatrizes de fotocoagulação de DMRI e atrofia geográfica (DMRI seca) do EPR com hipopigmentação e despigmentação bem delimitada ou aparente falta de EPR, onde os vasos da coróide são visíveis em uma área maior que 175 µm.

#### 3.1.1.2 Critérios de inclusão: Grupo controle

O grupo controle consistiu de 86 indivíduos recrutados no mesmo departamento com idade acima de 50 anos e ausência de qualquer evidência de DMRI, como drusas ou alterações do EPR. Pacientes com história familiar de cegueira foram excluídos do grupo controle.

#### 3.1.1.3 Critério de exclusão: Grupos DMRI e Controle

Indivíduos que apresentaram qualquer opacidade de meios que impediu fundoscopia e/ou retinografia de boa qualidade foram excluídos do estudo. Pacientes com alta miopia (equivalente esférico > -6 dioptrias), estrias angioides, doença coriorretiniana infecciosa e/ou inflamatória, trauma ou doenças coriorretinianas hereditárias também foram excluídos do estudo.

### *3.1.2. Aspectos éticos*

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

Após a informação, através da qual os pacientes souberam que seriam realizados procedimentos que não faziam parte da rotina do serviço, aqueles que aceitaram participar do estudo assinaram um “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” (TCLE), autorizando sua participação voluntária na pesquisa (Anexo 2). Todos os sujeitos da pesquisa tiveram a oportunidade de retirar seu consentimento, em qualquer fase do estudo, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu atendimento médico.

As coletas de sangue foram realizadas durante os atendimentos ambulatoriais, sendo retirada quantidade (5 a 10 ml) não prejudicial à saúde do paciente. O material biológico (sangue) coletado foi armazenado no Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) – UNICAMP e foi utilizado exclusivamente para a finalidade prevista neste projeto. A pesquisa laboratorial utilizando as amostras de sangue foi realizada durante um período máximo de dois anos após a coleta. Qualquer outro projeto utilizando as amostras de DNA só será levado a efeito mediante nova aprovação do CEP.

Não houve a necessidade de mudança da rotina dos pacientes. Não houve ônus para os mesmos. A identidade de todos os pacientes foi e será mantida em sigilo.

Foram respeitados os princípios enunciados na Declaração de Helsinque assim como as todas as determinações do CEP da FCM – UNICAMP.

### *3.1.3. Métodos diagnósticos*

Todos os indivíduos foram entrevistados com questionário padronizado contendo perguntas referentes a antecedentes patológicos, tanto oculares quanto sistêmicos, e história familiar de doença ocular (Anexo 3).

O antecedente referente ao tabagismo também foi obtido através de questionário aplicado por entrevista. Os participantes do estudo foram classificados em dois grupos: o primeiro grupo incluindo aqueles que nunca fumaram e o segundo com indivíduos tabagistas ou com antecedente de tabagismo. Como o objetivo do estudo foi avaliar a associação entre o polimorfismo *rs10490924* presente no gene *LOC387715/ARMS2* e a DMRI, a frequência de tabagistas e não tabagistas foi mantida similar nos grupos caso e controle com o objetivo de prevenir um possível viés causado pela associação de tabagismo com a DMRI.

Todos os participantes foram submetidos a exame oftalmológico incluindo medida da acuidade visual, refração, biomicroscopia e fundoscopia. A fundoscopia foi realizada em lâmpada de fenda com o uso de lente de 78 ou 90 dioptrias. Pacientes com suspeita de DMRI exsudativa também foram submetidos a retinografia e angiografia. A retinografia e a angiografia fluoresceínica foram realizadas em um retinógrafo modelo Topcon TRC 50X

(Topcon Inc., Tokyo, Japan). As angiografias foram realizadas com administração endovenosa de 5 mL de fluoresceína 10%.

#### *3.1.4. Biologia molecular*

##### 3.1.4.1 Extração de DNA do sangue periférico

Foram coletados de todos os indivíduos incluídos no estudo entre 5 e 10 mL de sangue periférico em frasco estéril com ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) 10% como anticoagulante. Após a coleta, todo o material biológico foi armazenado no Laboratório de Genética Molecular Humana do CBMEG – UNICAMP. Este material foi armazenado à temperatura ambiente por até 2 dias ou em geladeira (4°C) por até 1 semana.

A extração de DNA foi realizada pelo método de fenol clorofórmio o qual pode ser dividido em duas etapas.

Primeira etapa:

- Coleta de sangue em tubo contendo EDTA ou ACD;
- Centrifugação por 10 minutos a 2500rpm;
- Remoção da porção sobrenadante correspondente ao plasma, com pipeta Pasteur descartável, e descarte num Becker com solução de hipoclorito.
- Mistura das porções intermediária e inferior, correspondentes respectivamente aos leucócitos e às hemácias, com nova pipeta Pasteur.
- Transferência da mistura para um tubo do tipo “Falcon” de 15mL;
- Adição de tampão RBS 1X até um obtenção de um volume final de 11mL;

- Adição de 60µL de NONIDET – P40 (TRITON ou IGEFAL) e homogeneização;
- Centrifugação a 2500rpm por 10 minutos e descarte do sobrenadante;
- Ressuspensão do “pellet” em 0,5mL de tampão RSB 1X seguida de homogeneização;
- Lise das hemácias com 3,0mL de detergente SDS;
- Adição de 80µL de proteinase K;
- Incubação em estufa por 2 a 3 horas à 37°C ou *overnight*;

Segunda etapa:

- Adição de 3,0mL de fenol saturado em tubo Falcon;
- Homogeneização por 10 minutos;
- Centrifugação a 2500rpm por 10 minutos;
- Remoção da porção inferior do tubo (fenol) com nova pipeta Pasteur descartável sem misturá-la à porção superior do centrifugado;
- Repetição dos itens 1,2, 3 e 4 utilizando clorofórmio saturado com fenol (1:1), isto é, 1,5mL de clorofórmio e 1,5 mL de fenol;
- Adição de 3,0mL de clorofórmio-álcool iso-amílico seguida de homogeneização;
- Centrifugação a 2500rpm por 10 minutos seguida de remoção completa da porção inferior do tubo;
- Adição de 6,0mL de etanol a 100% para a precipitação do DNA;
- Coleta do DNA com pipeta e ressuspensão em 200 a 250µL de tampão TE;

#### 3.1.4.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Às amostras de DNA foram adicionados 20 pmol dos *primers sense* e *anti-sense*, em conjunto com 200 µmol de cada desoxirribonucleotídeo trifosfatado (dNTP), tampão da enzima 1X, 0,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), completando-se o volume final da reação para 25 µL com água deionizada estéril. A temperatura e a duração dos ciclos foram determinadas após testes de padronização. Foram realizados 35 ciclos de 94°C por um minuto, 57°C por um minuto e 72°C por um minuto, precedidos por uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos e finalizando com sete minutos de extensão a 72°C. Os *primers* usados na PCR foram: *sense* 5'-GCACCTTTGTCACCACATTA-3' e *anti-sense* 5'-GCCTGATCATCTGCATTTCT-3', ambos sintetizados pela Life Technologies™ Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Os produtos da PCR foram separados por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo e examinados sob luz ultravioleta (UV). Um fragmento de 356 pares de bases do exon 1 do gene *LOC387715/ARMS2* foi amplificado para o polimorfismo *rs10490924*.

Após a amplificação das respectivas regiões cromossômicas a serem analisadas, os produtos das PCRs foram purificados e sequenciados para identificação do polimorfismo.

#### 3.1.4.3 Sequenciamento automático

Para a reação de sequenciamento, adicionou-se a cada poço da placa específica para o sequenciador (96 – *well ultraplate*, Natural, Sorenson <sup>TM</sup>, Sollentuna, Sweden) 1,0µL do produto da PCR e 1,0µL do *primer sense* ou *anti-sense* a ser utilizado na concentração de 5 pmol, completando-se o volume final de 20µL em cada poço da placa com 18µL da mistura que se segue: 1350,0µL de água deionizada estéril, 400µL de tampão de sequenciamento 5X e 50µL de *Big Dye* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

As placas foram levadas ao termociclador sob as seguintes condições: ciclo único de 1 minuto e 30 segundos a 96°C, seguido por 24 ciclos da sequência 12 segundos a 96°C, 6 segundos a 50°C e 4 minutos a 60°C. Após essa reação, as amostras foram purificadas a fim de eliminar nucleotídeos não incorporados.

A purificação da reação de sequenciamento foi realizada adicionando-se 80 µL de etanol a 80% seguido de centrifugação a 4000 rpm por 45 minutos. Após o término da centrifugação foi realizado descarte por inversão colocando-se a placa invertida sobre papel toalha secando-se as bordas. A seguir, adicionou-se 150 µL de etanol a 70% seguido de novo descarte por inversão. Finalmente foi realizado “*spin*” invertido e deixado para secar em local escuro, envolto em papel alumínio, por 2 horas.

As amostras foram ressuspensas em 10µL de Formamida Hi-Di (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), desnaturadas por 5 minutos a 96°C, colocadas imediatamente no gelo e submetidas à eletroforese no sequenciador automático “ABI PRISM 3700 Genetic Analyser” (Applied Biosystems, Foster

City, CA, USA). A confirmação da região genômica analisada foi realizada através de buscas por similaridade, utilizando-se o *Blast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

### *3.1.5. Análise estatística*

Os dados foram digitados e armazenados em programa de gerenciador de banco de dados.

O teste exato de Fisher ou qui-quadrado foram usados para comparar as frequências alélicas e dos genótipos entre os casos e os controles, além de estimar o OR. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes. O teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg foi usado para a análise de distribuição dos genótipos tanto no grupo caso quanto no grupo controle.

Foi realizado o cálculo post-hoc através do software ClinCalc.com (<http://clincalc.com/Stats/Power.aspx>) para avaliação do poder da amostra.

#### 4. RESULTADOS

O presente estudo inclui uma população da região sudeste do Brasil. Foram selecionados 126 indivíduos portadores de DMRI e 86 indivíduos saudáveis com idade similar (idade média de  $74,17 \pm 7,64$  comparada a  $71,82 \pm 7,12$ , respectivamente). Entre os pacientes diagnosticados com DMRI, 74 apresentavam neovascularização de coróide ou cicatriz disciforme no olho com a doença mais avançada. Os 52 pacientes restantes apresentavam a forma atrófica da doença, com a presença de drusas e alterações do EPR ou atrofia geográfica. Esta amostra apresentou um poder calculado através de post-hoc de 93,4%, considerando uma erro alfa de 0,05%.

A distribuição dos genótipos do polimorfismo *rs10490924* foi significativamente diferente entre os casos e os controles. Entre 126 pacientes diagnosticados com DMRI, 77 pacientes apresentavam o alelo de risco T (61,1%), 23 eram homozigotos e 54 eram heterozigotos. No grupo controle, apenas 32 indivíduos apresentavam o alelo de risco (37,2%), dos quais três eram homozigotos (TT) e 29 eram heterozigotos (GT). O *odds ratio* (OR) para DMRI foi 2,05 (IC95% 1,13-3,71) para heterozigotos (GT) e 8,32 (IC95% 2,30-45,99) para homozigotos (TT), comparados com sujeitos homozigotos para o alelo G. O OR entre sujeitos portadores do alelo de risco (TT + GT) e aqueles homozigotos para o alelo G foi de 2,65 (IC95% 1,50-4,66) (Tabela 1). A distribuição dos genótipos para o polimorfismo *rs10490924* estava consistente com o equilíbrio de Hardy-Weinberg em ambos os grupos.

A frequência do alelo T foi significativamente maior em pacientes com DMRI quando comparada com os indivíduos do grupo controle ( $p= 0,00002$ ) (Tabela 1). A Figura 6 ilustra o sequenciamento da região do gene *LOC387715* que compreende o polimorfismo rs10490924.

**Tabela 1.** Distribuição, odds ratio e frequência alélica do polimorfismo (*rs10490924*) do gene *LOC387715/ARMS2* em casos e controles de DMRI.

|           |               |            | DMRI ATRÓFICA E EXSUDATIVA |         |
|-----------|---------------|------------|----------------------------|---------|
| Genótipos | Controles (%) | Casos (%)  | OR (IC95%) vs. GG          | P       |
| GG        | 54 (62,7)     | 49 (38,8)  | Referência                 | 1       |
| GT        | 29 (33,7)     | 54 (42,8)  | 2,05 (1,13-3,71)           | 0,01708 |
| TT        | 3 (3,4)       | 23 (18,2)  | 8,32 (2,30-45,99)          | 0,00020 |
| GT + TT   | 32 (37,2)     | 77 (61,1)  | 2,65 (1,50-4,66)           | 0,00062 |
| Total     | 86 (100)      | 126 (100)  |                            |         |
| Alelos    | Controles (%) | Casos (%)  | OR                         | P       |
| G         | 137 (79,6)    | 152 (60,3) | Referência                 | 1       |
| T         | 35 (20,3)     | 100 (39,6) | 2,57 (1,64-4,03)           | 0,00002 |
| Total     | 172 (100)     | 252 (100)  |                            |         |

OR = Odds Ratio

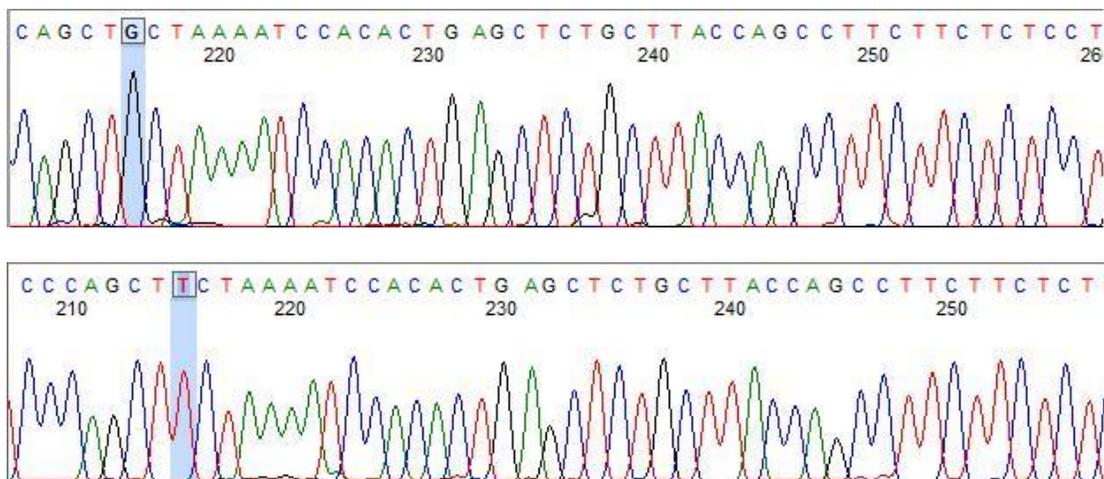


Figura 6. Eletroferograma do gene LOC387715 demonstrando a troca da base nitrogenada G por T, realçada na figura.

O OR também foi calculado após a estratificação da amostra de acordo com o tipo de DMRI (exsudativa ou atrófica). O OR para DMRI exsudativa foi de 2,11 (IC95% 1,08-4,15) para heterozigotos (GT) e 7,29 (IC95% 1,77-43,48) para homozigotos (TT), quando comparados com indivíduos homozigotos para o alelo G. O OR entre pacientes com DMRI exsudativa portadores do alelo de risco (TT + GT) e os indivíduos sem o alelo de risco (GG) foi de 2,61 (IC95% 1,38-4,96) (Tabela 2). Como o número de participantes com DMRI atrófica foi pequeno, foi calculado apenas o OR entre os indivíduos portadores do alelo de risco (TT + GT) e os indivíduos homozigotos para o alelo G, resultando em um OR de 2,70 (IC95% 1,32-5,48). Após a estratificação da amostra, a frequência do alelo de risco T manteve-se significativamente maior nos pacientes com DMRI quando comparados aos controles. Entre os 74 pacientes diagnosticados com DMRI exsudativa, 45 pacientes apresentavam o alelo de risco (60,8%), 12 homozigotos e 33 heterozigotos. No grupo controle apenas 32 indivíduos

apresentavam o alelo de risco (37,2%), dos quais três indivíduos eram homozigotos (TT) e 29 eram heterozigotos (GT) (Tabela 2).

**Tabela 2.** Distribuição, odds ratio e frequência alélica do polimorfismo *rs1049092* do gene *LOC387715/ARMS2* após a estratificação segundo o tipo de DMRI em casos e controles.

| Genótipos | Controles (%) | Casos (%)  | DMRI SECA CASOS |                   |        | DMRI EXSUDATIVA CASOS |                   |        |
|-----------|---------------|------------|-----------------|-------------------|--------|-----------------------|-------------------|--------|
|           |               |            | Casos (%)       | OR (IC95%) vs. GG | P      | Casos (%)             | OR (IC95%) vs. GG | P      |
| GG        | 54 (62,7)     | 49 (38,8)  | 20 (38,4)       | Referência        | 1      | 29 (39,1)             | Referência        | 1      |
| GT        | 29 (33,7)     | 54 (42,8)  | 21 (40,3)       | 1,95 (0,91-4,18)  | 0,0821 | 33 (44,5)             | 2,11 (1,08-4,15)  | 0,0276 |
| TT        | 3 (3,4)       | 23 (18,2)  | 11 (21,1)       | 9,60 (2,23-59,11) | 0,0008 | 12 (16,2)             | 7,29 (1,77-43,48) | 0,0028 |
| GT + TT   | 32 (37,2)     | 77 (61,1)  | 32 (61,5)       | 2,70 (1,32-5,48)  | 0,0054 | 45 (60,8)             | 2,61 (1,38-4,96)  | 0,0028 |
| Total     | 86 (100)      | 126 (100)  | 52 (100)        |                   |        | 74 (100)              |                   |        |
| Alelos    | Controles (%) | Casos (%)  | Casos (%)       | OR                | P      | Casos (%)             | OR                | P      |
| G         | 137 (79,6)    | 152 (60,3) | 61 (58,6)       | Referência        | 1      | 91 (61,4)             | Referência        | 1      |
| T         | 35 (20,3)     | 100 (39,6) | 43 (41,3)       | 2,75 (1,61-4,72)  | 0,0001 | 57 (38,5)             | 2,45 (1,49-4,03)  | 0,0003 |
| Total     | 172 (100)     | 252 (100)  | 104 (100)       |                   |        | 148 (100)             |                   |        |

## 5. DISCUSSÃO

Rivera e colaboradores publicaram que o *LOC387715/ARMS2* é expresso na placenta e pouco expresso na retina <sup>(30)</sup>. Até recentemente, a função biológica da proteína *LOC387715* era desconhecida, mas um estudo publicado recentemente sugere que tal proteína tenha um papel na função de fagocitose das células do EPR <sup>(58)</sup>. Apesar de estudos adicionais sobre sua função serem necessários para confirmar seu papel e sua contribuição na patogênese da DMRI, diversos autores têm relatado que a associação entre o polimorfismo *rs10490924* presente no gene *LOC387715/ARMS2* com a DMRI ocorre em diferentes populações de maneira independente de outros fatores genéticos previamente estudados, entre eles os polimorfismos encontrados no gene *CFH* <sup>(30-32, 59-62)</sup>.

Tal associação descrita em populações na Alemanha, Austrália, Estados Unidos da América, Turquia, Japão, leste asiático e Índia <sup>(30-32, 59-62)</sup> foi demonstrada nesta amostra da população brasileira. O OR observado neste análise também foi similar àqueles observados em outras publicações <sup>(59, 63, 64)</sup>.

Rivera e colaboradores foram os primeiros a descrever a associação entre *LOC387715/ARMS2* e DMRI na população alemã, reportando um OR de 2,69 (IC95% 2,22-3,27) para heterozigotos (GT) e 8,21 (IC95% 5,79-11,65) para homozigotos (TT), comparado a sujeitos homozigotos para o alelo G <sup>(30)</sup>. Um estudo publicado por Ross e colaboradores analisou a associação entre *LOC387715/ARMS2* e DMRI em três diferentes amostras, uma da Austrália e

duas dos Estados Unidos. Quando combinadas, o OR observado nas amostras norte americanas foi de 2,61 (IC95% 1,89-3,61) para heterozigotos (GT) e 8,59 (IC95% 4,49-16,46) para homozigotos (TT), comparados com sujeitos homozigotos para o alelo G. O OR na amostra australiana foi de 1,69 (IC95% 1,25-2,28) para heterozigotos (GT) e 2,20 (IC95% 1,05-4,62) para homozigotos (TT), comparados a sujeitos homozigotos para o alelo G <sup>(59)</sup>. Os resultados encontrados nesta amostra de indivíduos da população brasileira se aproximaram mais daqueles obtidos para as populações européia e americana em detrimento da população australiana (Tabela 3). Recentemente outro estudo na população brasileira foi publicado e reportou um OR de 5,5 (IC95% 2,6-11,8;  $p < 0.0001$ ) para o *LOC387715/ARMS2* (TT) <sup>(33)</sup>.

**Tabela 3.** Odds ratio da frequência genotípica do polimorfismo (*rs10490924*) do gene *LOC387715/ARMS2* em casos e controles de DMRI em amostras de diferentes populações.

|                   | GT/GG |           | TT/GG |            |
|-------------------|-------|-----------|-------|------------|
|                   | OR    | IC95%     | OR    | IC95%      |
| Rivera et al. ALE | 2,69  | 2,22-3,27 | 8,21  | 5,79-11,65 |
| Ross et al. EUA   | 2,61  | 1,89-3,61 | 8,59  | 4,49-16,46 |
| Hirata et al. BRA | 2,05  | 1,13-3,71 | 8,32  | 2,30-45,99 |
| Ross et al. AUS   | 1,69  | 1,25-2,28 | 2,20  | 1,05-4,62  |

A estratificação da amostra confirmou que a associação entre o gene *LOC387715/ARMS2* e a DMRI estava presente independentemente do subtipo

de DMRI. Ross e colaboradores estudaram uma amostra do *National Eye Institute* (NEI) combinada com uma amostra do AREDS e reportou uma OR para DMRI exsudativa de 2,48 (IC95% 1,70-3,61) para heterozigotos (GT) e 10,12 (IC95% 5,12-20,01) para homozigotos (TT), comparados com sujeitos homozigotos para o alelo G. O mesmo estudo relatou uma OR para DMRI atrófica de 3,24 (IC95% 2,20-4,78) para sujeitos com ao menos um alelo T (GT + TT), comparados a sujeitos homozigotos para o alelo G<sup>(59)</sup> (Tabela 4).

**Tabela 4.** Odds ratio com intervalo de confiança do polimorfismo *rs1049092* do gene *LOC387715/ARMS2* após a estratificação segundo o tipo de DMRI em casos e controles em amostras de diferentes populações.

|        | DMRI atrófica |           | DMRI exsudativa |           |
|--------|---------------|-----------|-----------------|-----------|
|        | OR            | IC95%     | OR              | IC95%     |
| EUA    | 2,64          | 1,97-3,54 | 3,10            | 2,37-4,06 |
| BRASIL | 2,75          | 1,61-4,72 | 2,45            | 1,49-4,03 |
| JAPÃO  | 0,53          | 0,32-0,88 | 4,39            | 2,69-7,17 |

O polimorfismo no gene *LOC387715/ARMS2* e sua associação com a DMRI também foi descrita na população turca na qual os genótipos do grupo DMRI eram GG (30,6%), GT (38,1%) (OR = 1,88, IC95% 1,07-3,30) e TT (31,3%) (OR = 8,61, IC95% 3,55-20,87). Os sujeitos controle eram GG 59% (p = 0,027), GT 39% (p = 0,0001), e TT 2% (p = 0,0001), respectivamente <sup>(60)</sup>. Em estudos de coorte realizados na população japonesa foi demonstrada uma forte

associação com DMRI exsudativa ( $p = 0,00000031$ ), porém, diferentemente dos resultados obtidos no presente estudo, apenas uma associação marginal com DMRI seca ( $p = 0,04$ )<sup>(61)</sup>. Também foi observada associação com acometimento do olho contra-lateral pela DMRI (risco relativo 2,67,  $p = 0,0013$ ) e com o tempo entre o acometimento do primeiro e do segundo olho. Pacientes homocigotos para o alelo de risco (TT) apresentam DMRI no olho contra-lateral significativamente mais cedo comparados àqueles com os outros genótipos ( $p = 0,0028$ )<sup>(62)</sup>.

Uma metanálise realizada com 13 estudos incluindo as populações norte americana, europeia, do leste asiático e indiana demonstrou que indivíduos portadores dos genótipos TT e TG do polimorfismo *rs10490924* G→T do gene *LOC387715/ARMS2* apresentaram 7,51 e 2,35 vezes o risco de desenvolver DMRI, respectivamente, comparados aqueles portadores do genótipo GG<sup>(32)</sup>, resultados semelhantes aos encontrados nesta amostra de população brasileira.

Estudos caso-controle apresentam limitações intrínsecas. Apesar da estratificação dos pacientes de acordo com o tipo de DMRI, não foi realizada nenhuma análise levando-se em consideração a gravidade da doença. Além disso, não foram avaliados fatores ambientais associados à DMRI, como tabagismo, exposição solar e índice de massa corporal e suas possíveis interações com o polimorfismo *rs10490924*. O baixo número de sujeitos do grupo controle homocigotos para o alelo de risco TT nesta amostra limita os resultados do estudo, o que pode ser verificado pela ampla variação apresentada nos intervalos de confiança.

A heterogeneidade da população brasileira, a qual possui suas raízes ancestrais formadas principalmente por índios, europeus e africanos, dificulta a extrapolação de resultados de estudos realizados em outras populações. Ross e colaboradores avaliaram a associação da DMRI com o polimorfismo *rs10490924* em duas amostras norte americanas e uma australiana, encontrando uma maior associação da doença nas amostras americanas quando comparadas à amostra australiana<sup>(59)</sup>. Os resultados encontrados neste estudo foram semelhantes àqueles encontrados nas amostras norte americanas. Enquanto na população japonesa foi demonstrada uma forte associação com DMRI exsudativa ( $p = 0,00000031$ ), mas uma associação marginal com DMRI seca ( $p = 0,04$ )<sup>(62)</sup>, na amostra da população brasileira estudada foi encontrada forte associação tanto para DMRI seca ( $p = 0,0054$ ) quanto para DMRI exsudativa ( $p = 0,0028$ ). As diferenças encontradas em diferentes populações trazem implicações clínicas importantes dificultando desde a interpretação de ensaios clínicos até a implementação de conhecimentos na área da farmacogenética, os quais visam um tratamento mais individualizado em busca de melhores resultados.

## 6. CONCLUSÕES

A frequência do polimorfismo *Ala69Ser* encontrado no gene *LOC387715* nesta amostra de pacientes da população brasileira do estado de São Paulo foi de 61,1% em indivíduos com DMRI e de 37,2% em indivíduos sem a doença. A análise desta amostra sugere uma associação entre o polimorfismo *rs10490924* do gene *LOC387715/ARMS2* e DMRI, como descrito anteriormente em outras populações.

A estratificação da amostra confirmou que a associação entre o gene *LOC387715/ARMS2* e a DMRI estava presente independentemente do subtipo de DMRI.

A determinação de genótipos de alto risco em diferentes populações pode contribuir para uma melhor compreensão da etiopatogenia da DMRI, para o desenvolvimento de novos métodos e estratégias para o diagnóstico precoce e para o tratamento, o qual pode se tornar um modelo de medicina personalizada.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Martidis A, Tennant MTS. Age-related Macular Degeneration. In: Yanoff M, Duker JS. Ophthalmology. Saint Louis, MO, USA: Mosby; 2013. p. 925-33.
2. Muñoz B, West SK, Rubin GS, et al. Causes of blindness and visual impairment in a population of older Americans: The Salisbury Eye Evaluation Study. Archives of ophthalmology. 2000; **118**(6): 819-25.
3. Wang JJ, Foran S, Mitchell P. Age-specific prevalence and causes of bilateral and unilateral visual impairment in older Australians: the Blue Mountains Eye Study. Clinical and experimental ophthalmology. 2000;**28**(4): 268-73.
4. Age-Related Eye Disease Study Research G. Design Implications: the Age-Related Eye Disease Study Report Number 1. Controlled clinical trials. 1999; **20**(6): 573-600.
5. Seddon JM, Chen CA. Epidemiology of Age-related Macular Degeneration. In: Ryan SJ, Schachat AP, editors. Retina. Los Angeles, CA, USA: Elsevier; 2006. p. 1017-8.
6. Bird AC, Bressler NM, Bressler SB, Chisholm IH, Coscas G, Davis MD, et al. An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. Survey of ophthalmology. 1995; **39**(5): 367-74.

7. Seddon JM, Sharma S, Adelman RA. Evaluation of the clinical age-related maculopathy staging system. *Ophthalmology*. 2006; **113**(2): 260-6.
8. Age-Related Eye Disease Study Research G. The Age-Related Eye Disease Study severity scale for age-related macular degeneration: the Age-Related Eye Disease Study Report Number 17. *Archives of ophthalmology*. 2005; **123**(11): 1484-98.
9. Pascolini D, Mariotti SP. Global estimates of visual impairment: 2010. *British journal of ophthalmology*. 2012; **96**(5):614-8.
10. Taleb A, Ávila M, Moreira H. As condições de saúde ocular no Brasil. Rio de Janeiro, RJ, BR: Walprint Gráfica e Editora. 2009;10.
11. Santos L, Diniz J, Leão A, Sena MI. Degeneração macular relacionada à idade: prevalência e fatores de risco em dois centros oftalmológicos de referência em Pernambuco. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*. 2005; **68**(2): 229-33.
12. Oguido AP, Casella AM, Matsuo T, Ramos Filho EH, Berbel R, Silva RM. Prevalência da maculopatia relacionada à idade, em japoneses e descendentes, na cidade de Londrina-PR. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*. 2008; **71**(3): 375-80.
13. Leibowitz HM, Krueger DE, Maunder LR, et al. The Framingham Eye Study monograph: An ophthalmological and epidemiological study of cataract, glaucoma, diabetic retinopathy, macular degeneration, and visual acuity in a general population of 2631 adults, 1973-1975. *Survey of ophthalmology*. 1980; **24**(Suppl): 335-610.

14. Friedman DS, O'colmain BJ, Munõz B, et al. Prevalence of age-related macular degeneration in the United States. *Archives of ophthalmology*. 2004;**122**: 564-72.
15. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Diretoria de pesquisas. Coordenação de população e indicadores sociais. Gerência de estudos e análises da dinâmica demográfica. *Projeção da população do Brasil por sexo e idade para o período 1980-2050 - Revisão 2008*.
16. Schachat AP, Hyman L, Leske MC, et al. Features of age-related macular degeneration in a black population. The Barbados Eye Study Group. *Archives of ophthalmology*. 1995; **113**(6): 728-35.
17. Age-Related Eye Disease Study Research G. Risk factors associated with age-related macular degeneration: A case-control study in the age-related eye disease study: the Age-Related Eye Disease Study Report Number 3. *Ophthalmology*. 2000; **107**(12): 2224-32.
18. Mitchell P, Smith W, Attebo K, Wang JJ. Prevalence of age-related maculopathy in Australia. The Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology*. 1995; **102**(10): 1450-60.
19. Rudnicka AR, Jarrar Z, Wormald R, Cook DG, Fletcher A, Owen CG. Age and gender variations in age-related macular degeneration prevalence in populations of European ancestry: a meta-analysis. *Ophthalmology*. 2012;**119**(3): 571-80.
20. Age-Related Eye Disease Study Research G. Risk factors for the incidence of advanced age-related macular degeneration in the age-related eye

- disease study:the Age-Related Eye Disease Study Report Number 19.Ophthalmology. 2005; **112**(4): 533-9.
- 21.Hammond CJ, Webster AR, Snieder H, Bird AC, Gilbert CE, Spector TD. Genetic influence on early age-related maculopathy: a twin study. Ophthalmology. 2002; **109**(4): 730-6.
- 22.Majewski J, Schultz DW, Weleber RG, et al. Age-related macular degeneration -a genome scan in extended families.American journal of human genetics. 2003;**73**(3):540-50.
- 23.Seddon JM, Santangelo SL, Book K, et al.A genomewide scan for age-related macular degeneration provides evidence for linkage to several chromosomal regions.American journal of human genetics. 2003; **73**(4):780-90.
- 24.Iyengar SK, Song D, Klein BE, et al. Dissection of genomewide-scan data in extended families reveals a major locus and oligogenic susceptibility for age-related macular degeneration. American journal of human genetics. 2004;**74**(1):20-39.
- 25.Abecasis GR, Yashar BM, Zhao Y, et al. Age-related macular degeneration: a high-resolution genome scan for susceptibility loci in a population enriched for late-stage disease. American journal of human genetics. 2004;**74**(3):482-94.
- 26.Weeks DE, ConleyYP, Tsai HJ, et al. Age-related maculopathy: a genomewide scan with continued evidence of susceptibility loci within the

- 1q31, 10q26, and 17q25 regions. American journal of human genetics. 2004;**75**(2):174-89.
27. Klein RJ, Zeiss C, Emily YC, et al. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. Science. 2005; **308**: 385-89.
28. Haines JL, Hauser MA, Schmidt S, et al. Complement factor H increases the risk of age-related macular degeneration. Science. 2005;**308**: 419-21.
29. Edwards AO, Ritter III R, Abel KJ, et al. Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. Science. 2005;**308**: 421-24.
30. Rivera A, Fisher SA, Fritsche LG, et al. Hypothetical LOC387715 is a second major susceptibility gene for age-related macular degeneration, contributing independently of complement factor H to disease risk. Human molecular genetics. 2005;**14**(21): 3227-36.
31. Tanimoto S, Tamura H, Ue T, Yamane K, et al. A polymorphism of LOC387715 gene is associated with age-related macular degeneration in the Japanese population. Neuroscience letters. 2007; **414**(1): 71-4.
32. Tong Y, Liao J, Zhang Y, Zhou J, Zhang H, Mao M. LOC387715/HTRA1 gene polymorphisms and susceptibility to age-related macular degeneration: A HuGE review and meta-analysis. Molecular vision. 2010; **16**:1958-81.
33. Almeida LN, Melilo-Carolino R, Veloso CE, Pereira PA, Bastos-Rodrigues L, Sarubi H, et al. Association analysis of CFH and ARMS2 gene

- polymorphisms in a Brazilian cohort with age-related macular degeneration. *Ophthalmic research*. 2013;**50**: 117-22.
34. Vierkotten S, Muether PS, Fauser S. Overexpression of HTRA1 leads to ultrastructural changes in the elastic layer of Bruch's membrane via cleavage of extracellular matrix components. *PLoS One*. 2011; **6**(8): e22959.
35. Yang Z, Camp NJ, Sun H, et al. A variant of the *HTRA1* gene increases susceptibility to age-related macular degeneration. *Science*. 2006; **314**(5801): 992-3.
36. Dewan A, Liu M, Hartman S, et al. HTRA1 promoter polymorphism in wet age-related macular degeneration. *Science*. 2006; **314**(5801):989-992.
37. Yoshida T, Dewan A, Zhang H, et al. HTRA1 promoter polymorphism predisposes japanese to age-related macular degeneration. *Molecular Vision*. 2007; **13**:545-8.
38. Kliffen M, Sharma HS, Mooy CM, Kerkvliet S, de Jong PTVM. Increased expression of angiogenic growth factors in age-related maculopathy. *British journal of ophthalmology*. 1997;**81**: 154-62
39. Churchill AJ, Carter JG, Lovell HC, Ramsden C, Turner SJ, Yeung A, et al. VEGF polymorphisms are associated with neovascular age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet*. 2006; **15**(19): 2955-61.
40. Almeida LN, Melilo-Carolino R, Veloso CE, Pereira PA, Miranda DM, De Marco LA, et al. Homozygosity for the +674C>T polymorphism on VEGF gene is associated with age-related macular degeneration in a Brazilian

- cohort. Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv für klinische und experimentelle Ophthalmologie. 2011.
41. Spencer KL, Hauser MA, Olson LM, Schmidt S, Scott WK, Gallins P, et al. Protective effect of complement factor B and complement component 2 variants in age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet.* 2007; **16**(16): 1986-92.
42. Gold B, Merriam JE, Zernant J, Hancox LS, Taiber AJ, Gehrs K, et al. Variation in factor B (BF) and complement component 2 (C2) genes is associated with age-related macular degeneration. *Nature genetics.* 2006; **38**(4): 458-62.
43. Shuler Jr RK, Hauser MA, Caldwell J, et al. Neovascular age-related macular degeneration and its association with *LOC387715* and complement factor H polymorphism. *Archives of ophthalmology.* 2007; **125**: 63-7.
44. Seddon JM, Francis PJ, George S, Schultz DW, Rosner B, Klein ML. Association of CFH Y402H and LOC387715 A69S with progression of age-related macular degeneration. *The journal of the american medical association.* 2007; **297**(16):1793-800.
45. Kitchens JW, Kassem N, Wood W, et al. A pharmacogenetics study to predict outcome in patients receiving anti-VEGF therapy in age related macular degeneration. *Clinical ophthalmology.* 2013;**7**:1987-93.

46. Brantley MA, Jr, Fang AM, King JM, Tewari A, Kymes SM, Shiels A. Association of complement factor H and LOC387715 genotypes with response of exudative age-related macular degeneration to intravitreal bevacizumab. *Ophthalmology*. 2007;**114**(12):2168-73.
47. Age-Related Eye Disease Study Research G. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: the Age-Related Eye Disease Study Report Number 8. *Archives of ophthalmology*. 2001; **119**(10): 1417-36.
48. Heier JS, Antoszyk AN, Pavan PR, et al. Ranibizumab for treatment of neovascular age-related macular degeneration: a phase I/II multicenter, controlled, multidose study. *Ophthalmology*. 2006; **113**(4): 633-42.
49. Rosenfeld PJ, Brown DM, Heier JS, Boyer DS, Kaiser PK, Chung CY, et al. Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *The New England journal of medicine*. 2006; **355**(14): 1419-31.
50. Brown DM, Kaiser PK, Michels M, Soubrane G, Heier JS, Kim RY, et al. Ranibizumab versus verteporfin for neovascular age-related macular degeneration. *The New England journal of medicine*. 2006; **355**(14): 1432-44.
51. Kliffen M, Sharma HS, Mooy CM, et al. Increased expression of angiogenic growth factors in age-related maculopathy. *British journal of ophthalmology*. 1997;**81**: 154-62.

52. Michels S, Rosenfeld PJ, Puliafito CA, Marcus EN, Venkatraman AS. Systemic bevacizumab (Avastin) therapy for neovascular age-related macular degeneration twelve-week results of an uncontrolled open-label clinical study. *Ophthalmology*. 2005; **112**(6):1035-47.
53. Brown DM, Michels M, Kaiser PK, Heier JS, Sy JP, Ianchulev T, et al. Ranibizumab versus verteporfin photodynamic therapy for neovascular age-related macular degeneration: Two-year results of the ANCHOR study. *Ophthalmology*. 2009; **116**(1): 57-65 e5.
54. Lalwani GA, Rosenfeld PJ, Fung AE, Dubovy SR, Michels S, Feuer W, et al. A variable-dosing regimen with intravitreal ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration: year 2 of the PrONTO Study. *American journal of ophthalmology*. 2009; **148**(1): 43-58 e1.
55. Comparison of Age-related Macular Degeneration Treatments Trials Research G, Martin DF, Maguire MG, Fine SL, Ying GS, Jaffe GJ, et al. Ranibizumab and bevacizumab for treatment of neovascular age-related macular degeneration: two-year results. *Ophthalmology*. 2012; **119**(7): 1388-98.
56. Investigators IS, Chakravarthy U, Harding SP, Rogers CA, Downes SM, Lotery AJ, et al. Ranibizumab versus bevacizumab to treat neovascular age-related macular degeneration: one-year findings from the IVAN randomized trial. *Ophthalmology*. 2012; **119**(7): 1399-411.

57. Heier JS, Brown DM, Chong V, Korobelnik JF, Kaiser PK, Nguyen QD, et al. Intravitreal aflibercept (VEGF trap-eye) in wet age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. 2012; **119**(12): 2537-48.
58. Xu YT, Wang Y, Chen P, Xu HF. Age-related maculopathy susceptibility 2 participates in the phagocytosis functions of the retinal pigment epithelium. *International journal of ophthalmology*. 2012;**5**:125-32.
59. Ross RJ, Bojanowski CM, Wang JJ, Chew EY, Rochtchina E, Ferris FL 3rd, et al. The LOC387715 polymorphism and age-related macular degeneration: replication in three case-control samples. *Investigative ophthalmology and visual science*. 2007;**48**:1128-32.
60. Soysal Y, Inan UU, Kusbeci T, Imirzalioglu N. Age-related macular degeneration and association of CFH Y402H and LOC387715 A69S polymorphisms in a Turkish population. *DNA and cell biology*. 2012;**31**:323-30.
61. Fuse N, Mengkegale M, Miyazawa A, Abe T, Nakazawa T, Wakusawa R. Polymorphisms in ARMS2 (LOC387715) and LOXL1 genes in the Japanese with age-related macular degeneration. *American journal of ophthalmology*. 2011;**151**: 550-6.
62. Tamura H, Tsujikawa A, Yamashiro K, Akagi-Kurashige Y, Nakata I, Nakanishi H. Association of ARMS2 genotype with bilateral involvement of exudative age-related macular degeneration. *American journal of ophthalmology*. 2012;**154**: 542-8.

63. Schmidt S, Hauser MA, Scott WK. Cigarette smoking strongly modifies the association of LOC387715 and age-related macular degeneration. *American journal of human genetics*. 2006;**78**: 852-64.
64. Jakobsdottir J, Conley YP, Weeks DE, Mah TS, Ferrell RE, Gorin MB. Susceptibility genes for age-related maculopathy on chromosome 10q26. *American journal of human genetics* 2005;**77**:389-407.

# ANEXOS

## ANEXO 1



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

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

CEP, 15/01/08.  
(Grupo III)

**PARECER CEP:** N° 919/2007 (Este n° deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)  
**CAAE:** 0668.0.146.000-07

### I - IDENTIFICAÇÃO:

**PROJETO:** "AVALIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS NOS GENES CFH, LOC387715 E HTRA1 EM UMA POPULAÇÃO BRASILEIRA COM DEGENERAÇÃO MACULAR RELACIONADA À IDADE".

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Fábio Endo Hirata

**INSTITUIÇÃO:** HC/UNICAMP

**APRESENTAÇÃO AO CEP:** 04/12/2007

**APRESENTAR RELATÓRIO EM:** 18/12/08 (O formulário encontra-se no *site* acima)

### II - OBJETIVOS

Avaliar a frequência e os tipos de polimorfismos encontrados nos genes CFH, LOC387715 e HTRA 1 em uma população brasileira de pacientes com degeneração macular relacionada a idade (DMRI) intermediária e avançada, e determinar o papel dessas mutações como fatores de risco para o desenvolvimento da doença. Pretende também comparar os alelos de risco dos genes pesquisados nos pacientes com DMRI, dividindo-os em subgrupos distintos de acordo com o subtipo da doença (atrófica ou exsudativa) e avaliar se estas variações genéticas apresentam maior relevância em um determinado subgrupo e verificar se as variações genéticas encontradas são fatores de risco independentes dos fatores ambientais, como tabagismo e dieta, para o desenvolvimento da doença.

### III - SUMÁRIO

Trata-se de projeto de pesquisa, com desenho transversal, tipo caso-controle. Serão selecionados 100 pacientes com diagnóstico de DMRI atendidos no Serviço de Oftalmologia do HC/UNICAMP. Os pacientes que preencham os critérios diagnósticos de DMRI 3, 4 ou 5 (intermediária ou avançada), tanto exsudativa como atrófica, serão convidados a participar do estudo. O grupo controle será composto por 100 indivíduos recrutados no mesmo serviço, com idade > 50 anos e sem evidência de DMRI. Todos os pacientes serão entrevistados com questionários padronizados, em relação a antecedentes oftalmológicos e sistêmicos, submetidos a exame oftalmológico completo (medida de acuidade visual, refração, avaliação com tela de Amsler, teste de sensibilidade de contraste, biomicroscopia, fundoscopia, retinografia e angiografia. Serão coletados 20 a 30 ml de sangue periférico dos sujeitos de estudo e controles, para pesquisa dos genes reguladores por biologia molecular, no Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética da UNICAMP.

#### IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O projeto encontra-se adequado à Resolução CNS/MS 196/96 e complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

#### V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada. O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

#### VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

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

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

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

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

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

VI - DATA DA REUNIÃO

Homologado na XII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 18 de dezembro de 2007.

*Prof. Dra. Cármen Silvia Bertuzzo*  
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP

## ANEXO 2



### FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

✉ Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP  
☎ (0\_19) 3521-8936  
FAX (0\_19) 3521-7187

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

✉ [cep@fcm.unicamp.br](mailto:cep@fcm.unicamp.br)

### Termo de consentimento livre e esclarecido

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

#### Informações sobre a pesquisa:

**Título do projeto:** Avaliação dos Polimorfismos nos Genes CFH, LOC387715 e HTRA1 em uma População Brasileira com Degeneração Macular Relacionada à Idade.

**Pesquisador responsável:** Fabio Endo Hirata

**Telefone para contato:** 019 3521-7936

A degeneração macular relacionada à idade (DMRI) é uma das principais causas de visão baixa em idosos em todo o mundo. Nos últimos anos, muitas alterações genéticas têm sido encontradas em pacientes com esta doença. O principal objetivo de estudar estas alterações é que no futuro seja possível prevenir estas doenças e evitar que idosos tenham problemas visuais por DMRI.

Para participar do estudo é necessário colher uma amostra de 20 a 30 ml de sangue (o equivalente a duas colheres de sopa), como é feito em exames para anemia ou glicose. O exame é muito seguro e fora o desconforto da injeção não costuma causar efeitos colaterais. O sangue será colhido apenas uma vez. O exame oftalmológico realizado será o de costume no ambulatório.

O participante do estudo não receberá qualquer valor em dinheiro. Os resultados serão publicados, mas sua identidade será preservada.

#### Consentimento

Eu, \_\_\_\_\_ RG \_\_\_\_\_, abaixo assinado, estou de acordo em participar do estudo proposto acima, como sujeito. Fui devidamente informado(a) e esclarecido pelo pesquisador \_\_\_\_\_ sobre a pesquisa e os procedimentos nela envolvidos. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer instante, sem prejuízo em meu acompanhamento ou tratamento.

**Local e data:** \_\_\_\_\_

**Nome do paciente:** \_\_\_\_\_

**Nome e assinatura do responsável legal:** \_\_\_\_\_

## ANEXO 3

### QUESTIONÁRIO

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_

Sexo: ( ) Masculino ( ) Feminino

Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

História ocular progressiva: ( ) Sim ( ) Não

Especificar: \_\_\_\_\_

História sistêmica progressiva: ( ) Sim ( ) Não

Especificar: \_\_\_\_\_

História familiar de doença ocular: ( ) Sim ( ) Não

Especificar: \_\_\_\_\_

Tabagismo: ( ) Ex-tabagista ou tabagista ( ) Não tabagista