



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

TAMIREZ PRATES LANA

**ANÁLISE DO SNP rs11200638 DO GENE HTRA1 E SEU
ENVOLVIMENTO NA ETIOLOGIA DA DEGENERAÇÃO MACULAR
RELACIONADA À IDADE (DMRI) EM UMA AMOSTRA DA POPULAÇÃO
BRASILEIRA**

CAMPINAS

2017

TAMIRES PRATES LANA

**ANÁLISE DO SNP rs11200638 DO GENE HTRA1 E SEU ENVOLVIMENTO NA ETIOLOGIA
DA DEGENERAÇÃO MACULAR RELACIONADA À IDADE (DMRI) EM UMA AMOSTRA DA
POPULAÇÃO BRASILEIRA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção de título de Mestre em Ciências, área de concentração Clínica Médica.

Orientadora: Prof^a. Dra. Mônica Barbosa de Melo

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO
ALUNO TAMIRES PRATES LANA, E ORIENTADO PELO
PROF^a. Dra. Mônica Barbosa de Melo

CAMPINAS

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CNPq, 40101002/3-2014

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

L22a Lana, Tamires Prates, 1992-
Análise do SNP rs11200638 do gene HTRA1 e seu envolvimento na etiologia da degeneração macular relacionada à idade (DMRI) em uma amostra da população brasileira / Tamires Prates Lana. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

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

1. Degeneração macular. 2. Genética. 3. Fenômenos genéticos. 4. Polimorfismo genético. I. Melo, Mônica Barbosa de, 1968-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Analysis of the rs11200638 SNP of the HTRA1 gene and its involvement in the etiology of age-related macular degeneration (AMD) in a sample of the Brazilian population

Palavras-chave em inglês:

Macular degeneration

Genetics

Genetic phenomena

Polymorphism, Genetic

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Mestra em Clínica Médica

Banca examinadora:

Monica Barbosa de Melo [Orientador]

Edmilson Ricardo Gonçalves

Edi Lucia Sartorato

Data de defesa: 22-02-2017

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

TAMIRES PRATES LANA

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). EDMILSON **RICARDO** GONÇALVES
3. PROF(A). DR(A). EDI **LUCIA** SARTORATO

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

A ata de **defesa** com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: 22 de fevereiro de 2017

DEDICATÓRIA

*Ao meus pais, Antonio e Sílvia, que são
meu porto seguro em toda minha
trajetória.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo seu amor incondicional e por todo cuidado em minha vida.

Aos meus pais, Antonio e Silvia, que me incentivaram, me apoiam e são fantásticos.

À minha orientadora Mônica, pela confiança, paciência e ajuda durante o desenvolvimento do projeto.

À Galina por toda ajuda na parte de estatística.

À Sueli por toda ajuda e disposição na parte prática.

Aos meus colegas do laboratório.

Agradeço a Capes pelo apoio financeiro concedido.

A Degeneração Macular Relacionada à Idade (DMRI) é uma condição degenerativa progressiva decorrente do envelhecimento que afeta a mácula, região central da retina, podendo causar problemas na visão central em indivíduos acima de 50 anos pela presença de drusas, atrofia geográfica, neovascularização de coróide ou cicatriz disforme. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), é a segunda causa mundial de cegueira irreversível. Sua etiologia não está completamente determinada, porém sabe-se que fatores genéticos exercem influência significativa no desenvolvimento da doença. Estudos de associação revelam que diversos genes e seus polimorfismos estão envolvidos e influenciam o desenvolvimento da DMRI, como é o caso do gene *HTRA1*, o qual modula serinas-proteases que atuam na degradação de proteoglicanos na matriz extracelular. Alterações neste gene podem levar à DMRI por meio da indução da apoptose. Através de estudos de associação foi possível a identificação de um polimorfismo de base-única, presente na região promotora do gene *HTRA1* (rs11200638), que em populações caucasianas, chinesas e japonesas foi associado ao risco aumentado de DMRI, mas em outras populações não foi relevante para a manifestação da doença. O presente estudo teve como objetivo principal verificar o papel do polimorfismo do gene *HTRA1*, rs11200638, na etiologia da DMRI em uma amostra da população brasileira. No estudo, concluiu-se que na amostra da população do estado de São Paulo, os genótipos GA (OR: 1,881; IC 95%: 1,160-3,074; P-valor: 0.011) e AA (OR: 5,365; IC 95%: 2,969-9,973; P-valor: 5,08e-08), assim como o alelo A (OR: 2,93; IC 95%: 1,784- 3,211; P-valor< 0,0000001) do SNP rs11200638 estão associados ao risco aumentado de desenvolvimento da doença. O resultado observado, aliado ao de outros SNPs avaliados na mesma população, possivelmente, contribuirá para sua aplicação na prática clínica.

PALAVRAS-CHAVE: DMRI; *HTRA1*; rs11200638, 10q26,SNP.

ABSTRACT

Age-Related Macular Degeneration (AMD) is a progressive degenerative condition that affects the macula, the central region of the retina. Central vision may be affected in individuals over 50 years old due to the presence of drusen, geographic atrophy, choroidal neovascularization, or disciform scar. According to the World Health Organization (WHO), it is the second cause of irreversible blindness worldwide. Its etiology is not completely determined, but it is known that genetic factors exert significant influence on the development of the disease. Association studies reveal that several genes and their polymorphisms influence the development of AMD, such as the *HTRA1* gene, which modulates serine proteases that act degrading proteoglycans in the extracellular matrix. Changes in this gene can lead to AMD through the induction of apoptosis. By means of association studies a single nucleotide polymorphism (SNP), present in the promoter region of the *HTRA1* gene (rs11200638), has been identified and associated with an increased risk of AMD in the Caucasian, Chinese and Japanese populations. However, these results have not been replicated in all populations. The main objective of this study was to verify the involvement of rs11200638 in the etiology of AMD in a sample of the Brazilian population. In this study, the GA (OR: 1.881, 95% CI: 1.160-3.074, P-value: 0.011) and AA (OR: 5.365, 95% CI: 2.969-9.973, P-value: 5.08e-08) genotypes, as well as the A allele (OR: 2.93; 95% CI: 1.784-3.211; P-value <0.0000001) of the SNP rs11200638 were associated with an increased risk of disease development. The observed results, together with that of other SNPs in the Brazilian population will possibly contribute to its application in the clinical practice.

Keywords: AMD, 10q26, SNP, complex disease, *HTRA1*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Compreensão da DMRI. A figura demonstra: (A) a anatomia do olho, (B) os depósitos de drusas que acometem a qualidade da visão e (C) crescimento anormal de vasos sanguíneos responsáveis pelo extravasamento de sangue e líquidos.....17

Figura 2. Diagrama das camadas de células da retina e evolução da DMRI. (A) DMRI inicial, quando ocorre o acúmulo de drusas sub-retinianas que bloqueiam a chegada de nutriente aos fotorreceptores, causando danos e morte aos mesmos e, eventualmente, levando à atrofia geográfica (AG). (B) Perda completa das células do epitélio pigmentar da retina (EPR) e neurodegeneração dos fotorreceptores. (C) DMRI úmida ou neovascular, formação e rompimento dos novos vasos sanguíneos anormais e infiltração de macrófagos na retina levando à degeneração celular dos fotorreceptores.....19

Figura 3. Processos que contribuem para a patogênese da DMRI: depósito de lipofuscina, formação de drusas, inflamação local e neovascularização.....21

Figura 4. Genes associados com a DMRI. A partir de estudos do tipo GWAS foi possível a identificação de diversos genes que estão associados à manifestação da doença.....24

Figura 5. Região 10q26 e localização dos genes no cromossomo 10 associados à DMRI.....26

Figura 6. Padronização da PCR para o SNP rs11200638. A figura mostra na primeira coluna tanto na parte superior como na parte inferior o marcador de 100 pb e nas demais colunas as bandas amplificadas com 400 pb a partir de amostras de DNA de pacientes e controles.....33

Figura 7. Cromatogramas que demonstram os diferentes genótipos determinados pelo sequenciamento da região do gene HTRA1 que compreende o SNP rs11200638.....35

Figura 8. Padronização da digestão enzimática com *EagI*. Na presença do genótipo GG a enzima produz fragmentos de 219 pb e 181 pb), para o genótipo AA a enzima não corta, mantendo o produto de 400 pb igual ao da PCR e para o genótipo AG os três fragmentos podem ser identificados. Na imagem temos na primeira coluna o Marcador de 100pb (DNA Ladder Invitrogen™·Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e nas colunas subsequentes amostras com os genótipos AG, AG, GG, GG e AA.....35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados demográficos de pacientes e controles.....36

Tabela 2. Análise de regressão logística comparando casos e
controles.....37

Tabela 3. Regressão logística do polimorfismo rs11200638 e das formas fenotípicas da
DMRI.....39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADAMTS9: *ADAM Metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif 9*

AG: Atrofia Geográfica

APOE: *Apolipoprotein E*

ARMS2: *Age-related maculopathy susceptibility 2*

B3GALT1: *Beta 3-glucosyltransferase*

C3: *Complement component 3*

CARMS: *Clinical age-related maculopathy staging system*

CETP: *Cholesteryl ester transfer protein*

CFB: *Complement factor B*

CFH: *Complement factor H*

CFI: *Complement factor I*

COL8A1: *Collagen Type VIII Alpha 1*

DMRI: Degeneração Macular Relacionada à Idade

EPR: Epitélio Pigmentar da Retina

HTRA1: *High-temperature requirement A serine peptidase 1*

IER3: *Immediate Early Response 3*

LIPC : *Lipase hepatic*

MNSR: Membrana Neovascular Sub-retiniana

NC: Neovascularização Coroidal

NGS: Next Generation Sequencing

OR: Odds Ratio

PAR: Proliferação Angiomatosa Retiniana

RAD51B: *RAD51 Paralog B*

SLC16A8: *Solute Carrier Family 16 Member 8*

SNP: *Single nucleotide polymorphism*

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TGFBR1: *Transforming Growth Factor Beta Receptor 1*

TGF- β : *Transforming Growth Factor Beta*

TIMP3: *TIMP Metalloproteinase Inhibitor 3*

VEGF: *Vascular endothelial growth factor*

VEGFA: *Vascular endothelial growth factor A*

VPC: Vasculopatia Polipoidal Coroidal

INTRODUÇÃO.....	16
1.1. A degeneração macular relacionada à idade: definição.....	16
1.2. Classificação da DMRI.....	17
1.3. Epidemiologia.....	18
1.4. Fisiopatologia da DMRI.....	19
1.5. Associações a fatores de risco.....	21
1.6. Fatores genéticos e a DMRI.....	22
1.7. Região 10q26 e seu envolvimento na DMRI.....	24
1.8. O gene HTRA1 e o polimorfismo rs11200638.....	25
1.9. Justificativas.....	27
2. OBJETIVOS.....	29
2.1. Objetivo geral.....	29
2.2. Objetivos específicos.....	29
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	30
3.1. Casuística.....	30
3.1.1. Grupo caso.....	30
3.1.1.1. Critérios de inclusão.....	30
3.1.2. Grupo controle.....	30
3.1.2.1. Critérios de inclusão.....	30
3.1.2.2. Critérios de exclusão: grupos caso e controle.....	31
3.2. Métodos.....	31
3.2.1. Extração de DNA.....	31

3.2.2.	Avaliação da variante rs11200638.....	31
3.2.2.1.	PCR.....	31
3.2.2.2.	Reação de sequenciamento.....	33
3.2.2.3.	Purificação da reação de sequenciamento.....	33
3.2.2.4.	Digestão enzimática.....	34
3.2.2.5.	Análise estatística.....	35
4.	RESULTADOS.....	36
4.1.	Dados demográficos e estatística descritiva de rs11200638.....	36
4.2.	Distribuição quantitativa por sexo, idade e tabagismo em casos e controles.....	36
4.3.	Análise do SNP rs11200638 em relação à DMRI em casos e controles.....	37
5.	DISCUSSÃO.....	40
6.	CONCLUSÕES.....	42
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
	ANEXOS.....	52

1. INTRODUÇÃO

1.1. A DEGENERAÇÃO MACULAR RELACIONADA À IDADE: DEFINIÇÃO

A Degeneração Macular Relacionada à Idade (DMRI) é uma condição degenerativa progressiva decorrente do envelhecimento que afeta a mácula, região central da retina, acarretando problemas na visão central em indivíduos acima de 50 anos devido a presença de drusas, atrofia geográfica, neovascularização da coróide ou cicatriz disforme (figura 1).¹ Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), destaca-se como a terceira causa de cegueira global e a primeira em países industrializados.²

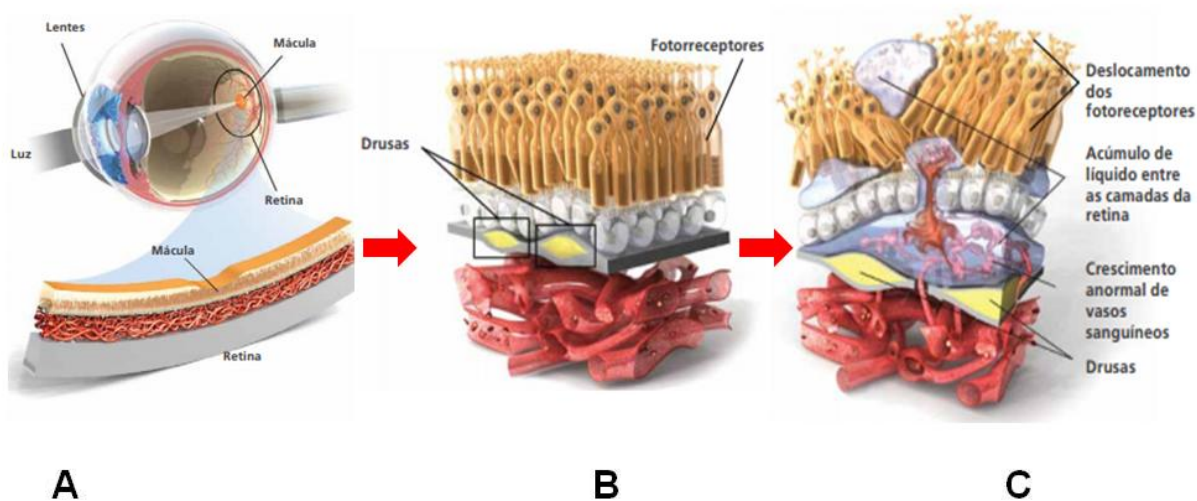


Figura 1. A figura demonstra: **(A)** a anatomia do olho, **(B)** os depósitos de drusas que acometem a qualidade da visão e **(C)** crescimento anormal de vasos sanguíneos responsáveis pelo extravasamento de sangue e líquidos. Adaptado de *Angiogenesis Foundation*, 2012.

Das quatro principais causas de cegueira (catarata, glaucoma, retinopatia diabética e DMRI), a DMRI é a única em que a prevenção e o tratamento não atingiram níveis satisfatórios, permanecendo ainda como um desafio a ser vencido pela oftalmologia. A dificuldade em se estabelecer a prevenção e o tratamento para a DMRI reside, em grande parte, no desconhecimento da sua etiologia e nos mecanismos fisiopatológicos envolvidos nas diferentes fases da doença.^{3,4}

As estimativas de prevalência variam de acordo com os critérios diagnósticos e sistemas de classificação utilizados na abordagem da DMRI, além da idade, da localização geográfica e da época do estudo populacional.^{5,6}

1.2. CLASSIFICAÇÃO DA DMRI

Fenotipicamente a DMRI é classificada como precoce ou tardia, com base em características clínicas específicas.⁷

A DMRI precoce caracteriza-se por mudanças pigmentares na retina e pelo depósito extracelular contendo restos celulares, lipídeos e proteínas no epitélio pigmentar da retina (EPR) gerando uma manifestação clínica denominada drusa.⁸

A DMRI tardia é sub-classificada em dois grandes grupos: A DMRI seca (atrófica) e a DMRI úmida (exsudativa). Embora a DMRI seca represente cerca de 80% dos casos de DMRI, a forma exsudativa responde por 80% dos casos de perda de visão significativa associada à doença.⁹

A forma seca determina-se por uma lesão progressiva do EPR, membrana de Bruch e coriocapilares levando a atrofia secundária dos fotorreceptores e perda gradativa da visão.¹⁰ Como consequência, a perda visual na forma seca ocorre gradualmente, dependendo da extensão das drusas na área macular, permanecendo muitas vezes assintomática ou evoluindo para a atrofia das células do EPR e levando à forma mais avançada denominada atrofia geográfica (AG).¹⁰

Na forma úmida há o aparecimento de uma membrana neovascular sub-retiniana (MNSR) que altera a anatomia macular, incluindo a interface fotorreceptor-EPR, permitindo o extravasamento de soro e/ou sangue e levando à perda irreversível dos fotorreceptores adjacentes. Como consequência há perda de visão, geralmente, mais rápida e acentuada do que a observada na forma seca.³ Esta forma ocorre com uma menor frequência porém, é considerada de maior gravidade, sendo caracterizada por um desequilíbrio entre os fatores pro-angiogênicos e anti-angiogênicos aumentando a produção de VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*).¹¹ A figura 2 demonstra os diferentes estágios da DMRI.

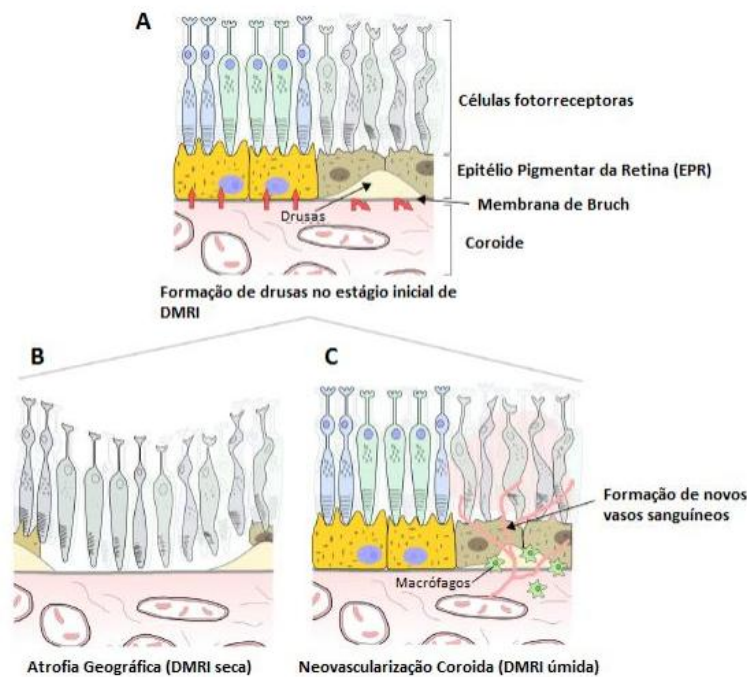


Figura 2. Diagrama das camadas de células da retina e evolução da DMRI. (A) DMRI inicial, quando ocorre o acúmulo de drusas sub-retinianas que bloqueiam a chegada de nutriente aos fotorreceptores, causando danos e morte aos mesmos e, eventualmente, levando à atrofia geográfica (AG). (B) Perda completa das células do epitélio pigmentar da retina (EPR) e neurodegeneração dos fotorreceptores. (C) DMRI úmida ou neovascular, formação e rompimento dos novos vasos sanguíneos anormais e infiltração de macrófagos na retina levando à degeneração celular dos fotorreceptores. Adaptado de Schramm e cols, 2014.

1.3. EPIDEMIOLOGIA

A DMRI é responsável por 8,7% de todas as cegueiras mundiais acima de 55 anos, principalmente em países desenvolvidos. Estima-se que em 2020 o número de casos de DMRI aumente para 196 milhões e em 2040 para 288 milhões.¹²

A forma atrófica (DMRI seca) é a mais frequentemente observada e corresponde a 15% dos casos com perda visual grave, enquanto a forma exsudativa (DMRI úmida) é responsável por 85% deles.¹³

Sabe-se que olhos com drusas grandes e moles se associam ao aumento do risco de progressão a DMRI avançada e apresentam probabilidade 6 vezes maior para o desenvolvimento de DMRI avançada quando comparados com olhos sem tais drusas.^{13, 14} Essas e outras observações de estudos populacionais e experimentos

clínicos forneceram uma forte razão para incluir a presença de drusas grandes e moles como uma das manifestações iniciais de DMRI e usam a área e tamanho dessas drusas como parte do critério para definir uma escala de gravidade da doença.¹⁴⁻¹⁶

Aproximadamente 90% da população branca mundial com 40 anos de idade ou mais tem uma ou duas drusas pequenas (<63 µm de diâmetro) e duras na mácula em um dos olhos.¹⁶ Quase não há risco de progressão para DMRI avançada nesses olhos, e estes não são considerados portadores de DMRI. No entanto, depois de 10 anos de acompanhamento, olhos com grandes áreas de drusas pequenas e duras apresentam 2 a 3 vezes o risco de desenvolver drusas grandes, moles e anormalidades pigmentares, lesões associadas com aumento do risco de desenvolvimento da DMRI avançada.¹⁶

No Brasil, existem aproximadamente 1,4 milhão de cegos e cerca de 4 milhões de pessoas com perda visual grave. Estima-se que 3 milhões de idosos na população brasileira apresentem DMRI em diferentes estágios. A prevalência da doença está aumentando devido ao aumento da expectativa de vida e consequente envelhecimento da população.¹⁵

No Brasil há uma escassez de estudos em relação à prevalência da DMRI. Entretanto, descreveu-se uma prevalência de 23-30% após os 55 anos de idade em um hospital de Pernambuco, onde observou-se associação da DMRI com a idade, gênero feminino, catarata, cirurgia de catarata e obesidade.⁴ Em um estudo realizado na cidade de Veranópolis, Rio Grande do Sul, a prevalência foi de 31,5% em pacientes acima de 80 anos.⁵ Já no estudo de Oguidio e colaboradores (2008), realizado na cidade de Londrina, no estado do Paraná com descendentes de japoneses, a prevalência de DMRI inicial foi de 13,8% e de DMRI avançada foi de 1,3% com uma frequência geral de 15,1% que aumentou com a idade.⁶

1.4. FISIOPATOLOGIA DA DMRI

Processos de degeneração decorrentes do envelhecimento contribuem para a patogênese da DMRI.¹⁷ Quatro processos estão associados para o desenvolvimento da doença: a formação da lipofuscina ligada ao estresse oxidativo, a formação de

drusas, a inflamação local e a neovascularização coroidal (na forma exsudativa), demonstrada na Figura 3.¹⁸

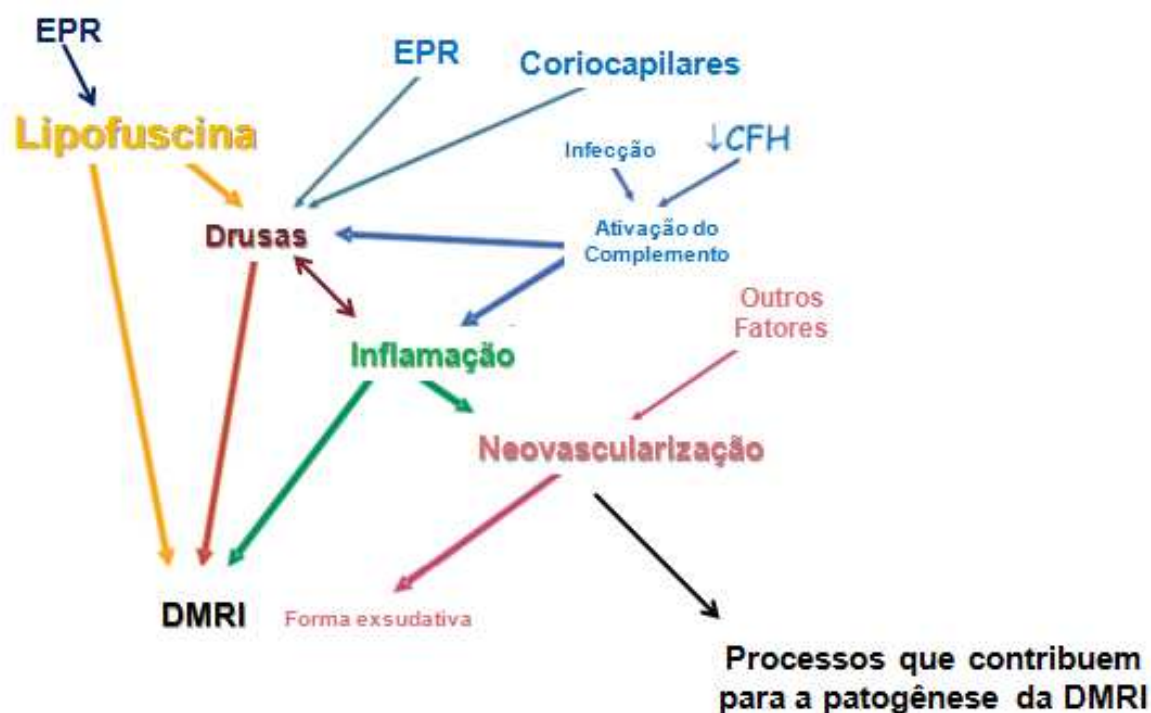


Figura 3. Processos que contribuem para a patogênese da DMRI: depósito de lipofuscina, formação de drusas, inflamação local e neovascularização. Adaptado de Nowak, 2006.

A retina apresenta dificuldade na eliminação dos resíduos gerados, causando uma reação inflamatória e consecutivamente o encapsulamento dos restos celulares (drusas), com proteínas e lipídios entre a membrana de Bruch e o epitélio pigmentado, caracterizado por depósitos insolúveis de lipofuscina. Estas drusas dificultam a difusão de oxigênio e nutrientes para a retina, gerando uma hipoxemia que evolui com neovascularização, causando o comprometimento da membrana de Bruch na região macular, o que justifica o comprometimento da visão central.^{17,19}

As reações fotoquímicas originadas na retina e no EPR tornam essas estruturas altamente suscetíveis aos danos causados pelo estresse oxidativo.²⁰ A perda da visão ocorre em consequência da disfunção dos fotorreceptores, a qual pode estar relacionada com a atrofia geográfica (AG) ou com a neovascularização coroidal (NC). Na AG ocorre a atrofia da rede coriocalpilar e do EPR a ele associado. Já na NC, os

neovasos do coriocabilar atravessam a membrana de Bruch e o EPR, invadindo a retina, onde podem sangrar e exsudar. Nos estágios tardios da doença, forma-se um tecido fibroso (cicatriz) na região macular, tendo como consequência o decréscimo da visão central.²⁰

1.5. ASSOCIAÇÕES A FATORES DE RISCO

A DMRI é uma doença multifatorial, cuja etiopatogenia não está totalmente esclarecida, sendo influenciada por condições genéticas poligênicas e ambientais.²¹

A idade é o maior fator de risco para a DMRI, mas outros fatores são associados com sua etiologia, a saber: sexo feminino, cor de pele clara, íris de cor clara, histórico familiar, catarata, tabagismo, índice de massa corpórea alto, doença cardiovascular, hipertensão arterial sistêmica, *diabetes mellitus*, dislipidemia, dieta, exposição à luz UV, etilismo e fatores genéticos.^{15,22-44}

Estudos epidemiológicos baseados na população fornecem estimativas da prevalência e incidência de DMRI neovascular e AG entre vários grupos raciais/étnicos no mundo.^{14,15} Impressões clínicas anteriores afirmam que a atrofia geográfica e DMRI neovascular são raras antes dos 55 anos de idade, que podem vir a ser comuns em pessoas com 75 anos de idade ou mais, e que elas são menos frequentes em negros do que em brancos.⁴⁵

Baseado em observações clínicas, os brancos apresentaram maior frequência de DMRI neovascular do que os negros.⁴⁵ Dados de estudos recentes que incluíram fotografia de fundo de olho de brancos e negros classificados de uma forma mascarada pelos mesmos classificadores, confirmaram a maior prevalência de DMRI neovascular e AG em brancos comparado com os negros. Esses dados epidemiológicos são vistos como paradoxais nos casos em que a frequência de sinais iniciais de DMRI, tais como drusas grandes, moles e anormalidades pigmentares, foram iguais em brancos e negros em alguns desses estudos.¹⁵

Até o momento não tem sido totalmente compreendido por que brancos com drusas grandes e moles estão sob maior risco de progressão à DMRI neovascular do que negros com tais drusas. Para explicar a raridade de DMRI em negros no estudo de

fotocoagulação macular, Jampol e Tielsch esp concluíram que a melanina agindo como um radical livre, ou em alguma outra via, poderia proteger o epitélio pigmentar, a membrana de Bruch, a coróide ou a retina exterior de mudanças degenerativas que predis põem o paciente à neovascularização coroidal.⁴⁶

A comparação de variações na frequência de DMRI por localização geográfica é limitada por possíveis diferenças nos fatores genéticos, ambientais e métodos aplicados. Para reduzir a fonte de variabilidade, é desejável usar métodos semelhantes de verificação (diagnóstico) e classificação de lesões de DMRI.²⁸

Estudos populacionais identificaram que aqueles que fumam ou já fumaram apresentam o risco até duas vezes maior de desenvolver DMRI do que não fumantes.⁴⁷ Parar de fumar, além de permitir a diminuição do risco de alguns cânceres, enfisema e doenças cardíacas, reduz o risco de DMRI. Já a exposição à fumaça de cigarro (fumantes passivos) aumenta a incidência de desenvolver a degeneração.⁴⁷

A ligação entre exposição à radiação ultravioleta e dano celular foi demonstrada em alguns estudos, levando à teoria de que a exposição lesa a mácula e acarreta a DMRI.^{48,49} Os estudos realizados para confirmar tal teoria apresentaram resultados inconclusivos até o momento, o que gera a necessidade de estudos adicionais.⁴⁹ Não só para prevenir a DMRI, alguns oftalmologistas recomendam a proteção dos olhos contra esses raios.^{1,50,51} A pesquisa sobre a influência da dieta na DMRI mostrou que o alto consumo de gorduras monoinsaturadas, poli-insaturadas e de gorduras vegetais está relacionado ao alto risco de desenvolver a forma neovascular da doença e que o alto consumo de peixe reduz o risco de DMRI.^{49,52}

1.6. FATORES GENÉTICOS RELACIONADOS A DMRI

A compreensão de fatores genéticos na DMRI se deu a partir de 2005, quando Traboulsi e colaboradores mostraram que o fator genético desempenha um papel fundamental na manifestação da mesma.⁵³ Sabe-se que existe um grande grau de concordância na incidência de DMRI em gêmeos, particularmente em univitelinos, demonstrando a importância do genótipo para a ocorrência da doença.^{29,54} A partir de

estudos de associação genômica ampla (GWAS) foi possível melhor compreensão da genética e identificação de *loci* associados (figura 4).⁵⁵⁻⁵⁸



Figura 4. Genes associados com a DMRI. A partir de estudos do tipo GWAS foi possível a identificação de diversos genes que estão associados à manifestação da doença. Adaptado de Fritsche et al, 2014.

As regiões cromossômicas 1q31 e 10q26 estão repetidamente associadas à DMRI em diversos estudos e compreendem 50% das causas de manifestações genéticas na DMRI.⁵⁹

Em 2005, a variante Y402H (rs1061170) no gene do *Complement Factor H* (*CFH*) na região 1q32 foi descoberta como a primeira variante de suscetibilidade à doença.^{44,54} Paralelamente à associação do polimorfismo Y402H no gene *CFH* ao risco aumentado de desenvolvimento de DMRI, outras variantes foram identificadas. Dessa forma, SNPs associados à DMRI foram identificados em genes como: *Complement Factor B* (*CFB*)⁶¹⁻⁶⁴; *Complement Component 3* (*C3*)^{65,66}; *Complement Factor I* (*CFI*)⁶⁷; *Age-related maculopathy susceptibility protein 2* (*ARMS2*)/ *HtrA Serine Peptidase 1* (*HTRA1*)^{43,62,68}; *Metalloproteinase inhibitor 3* (*TIMP3*)⁶⁹; *Apolipoprotein E* (*APOE*)⁷⁰;

*Vascular endothelial growth factor A (VEGFA)*⁷¹; *Lipase C (LIPC)*⁷²; *Cholesteryl ester transfer protein (CETP)*¹⁰, entre outros.

Na maioria das populações, os genes *CFH* e *ARMS2/HTRA1* surgiram como os *loci* mais significativamente associados ao risco de DMRI, proteção ou ambos.⁷³ Além do genoma nuclear, pesquisas envolvendo o genoma mitocondrial também revelaram a presença de SNPs associados à DMRI.⁷⁴

No início de 2010, dezoito grupos de pesquisa se uniram e formaram o *AMD Gene Consortium*, com o objetivo de identificar novos *loci* de susceptibilidade para a DMRI.⁷⁵ Para isso, eles realizaram uma meta-análise de diversos GWAS, incluindo mais de 17.100 casos de DMRI no estágio avançado e mais de 60.000 controles de ancestralidades Européia e Asiática. A meta-análise identificou e validou 19 *loci* associados à DMRI, incluindo 7 novos *loci* próximos aos genes *Collagen Type VIII Alpha 1 (COL8A1)*, *Immediate Early Response 3 (IER3)*, *Solute Carrier Family 16 Member 8 (SLC16A8)*, *Transforming Growth Factor Beta Receptor 1 (TGFB1)*, *RAD51 Paralog B (RAD51B)*, *ADAM Metalloproteinase With Thrombospondin Type 1 Motif 9 (ADAMTS9)* e *Beta 3-glucosyltransferase (B3GALT1)*.⁵⁸

Avanços recentes nas tecnologias de sequenciamento de próxima geração ou *Next Generation Sequencing* (NGS) estão tornando possível a identificação de alelos raros associados à DMRI através de projetos de sequenciamento completo de genomas e exomas.^{73,76} O sequenciamento de uma região de 106,7 kb próxima ao gene *CFH* identificou uma variante rara, R1210C, em pacientes com DMRI.⁷⁷ Outro alelo funcional, G119R no gene *CFI*, também foi associado ao aumento de risco para a mesma.⁷⁸

1.7. REGIÃO 10q26 E SEU ENVOLVIMENTO NA DMRI

A região 10q26 foi identificada como segunda região cromossômica mais importante na suscetibilidade à DMRI por Weeks e colaboradores no ano de 2004, importância confirmada em outros estudos e validada em 2006 por uma meta-análise

de seis estudos genômicos realizada por Fisher e colaboradores que forneceu uma forte evidência para a suscetibilidade à DMRI no *locus* 10q26.⁷⁹⁻⁸²

Os principais genes associados à DMRI que residem no braço longo do cromossomo 10 são o *HTRA1* (*High-temperature Requirement Factor A1*), *ARMS2* (*Age-related Maculopathy Susceptibility 2*) e *PLEKHA1* (*Pleckstrin Homology Domain-containing Protein*), figura 5.^{59,63}

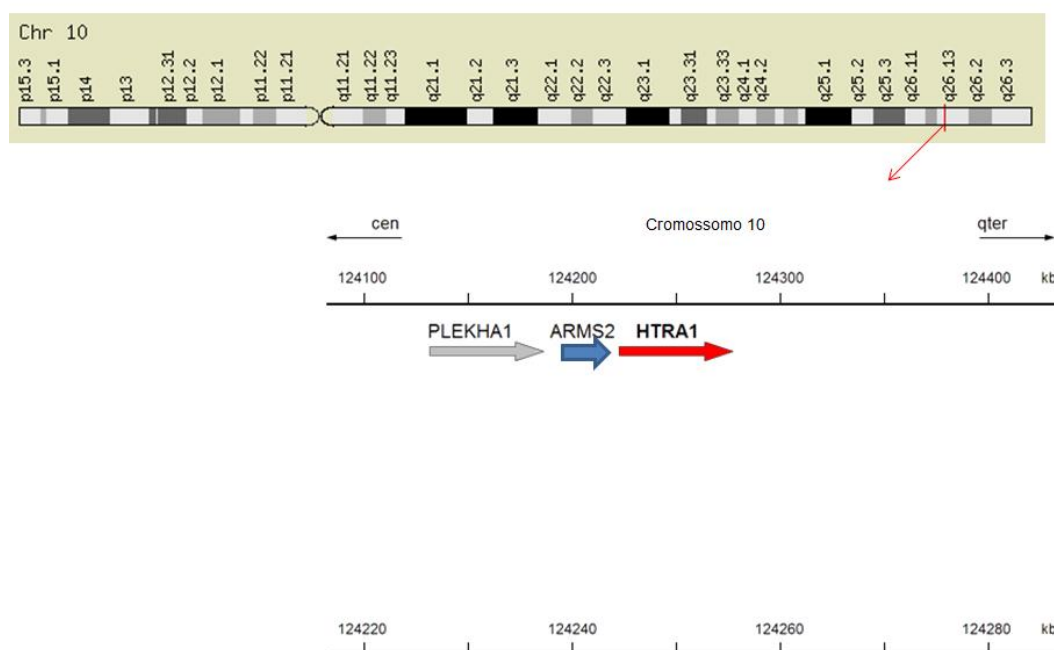


Figura 5. Região 10q26 e localização dos genes no cromossomo 10 associados à DMRI. Adaptado de [HTTP://www.genecard.com](http://www.genecard.com)

Um forte desequilíbrio de ligação entre os genes *ARMS2* e *HTRA1* gera uma controvérsia sobre qual gene desempenha o papel mais importante na manifestação da doença.^{59,83,84}

1.8. GENE *HTRA1* E O POLIMORFISMO, rs11200638

O gene *HTRA1* abrange 53384 bases de DNA e a parte codificada é composta por nove éxons. O *HTRA1* é um modulador de serinas-proteases que atuam

na degradação de proteoglicanos na matriz extracelular, podendo ser ativado durante o estresse celular, permitindo a atividade proteolítica de outras enzimas de degradação, tais como collagenases e metaloproteinases, para acessar seus substratos.^{68,86}

A família de enzimas HTRA são responsáveis por reconhecer proteínas com conformação incorreta e destiná-las ao redobramento ou degradação.⁸⁷⁻⁸⁹ Essa família foi primeiramente identificada em procariotos como chaperonas/proteases essenciais para sobrevivência em elevadas temperaturas, por isso nomeadas *High temperature requirement 1*.⁸⁸ A estrutura dessas proteínas compreende um domínio de serina-protease e um ou mais domínios PDZ (domínio de interação proteína-proteína) na região C-terminal.^{90,91}

A HTRA1 foi a primeira serina-protease humana descrita nesta família. Essa protease é expressa como um precursor de peso molecular de 51 kDa, com uma sequência sinal inicial de 22 aminoácidos, provavelmente responsável por direcionar a HtrA1 à secreção. A estrutura da HTRA1 consiste em um domínio N-terminal regulatório, um domínio de serina-protease e um domínio PDZ C-terminal, que pode mediar a ligação a proteínas alvo. O papel específico do domínio PDZ da HTRA1 não é claro, entretanto, sabe-se que ele reconhece sequências C-terminais e internas de caráter hidrofóbico.⁹¹⁻⁹⁴

A HTRA1 é uma proteína expressa em vários tecidos e com uma variedade de alvos, sendo a maioria proteínas da matriz extracelular, como colágeno tipo III, fibronectina e certos componentes da cartilagem, sugerindo um papel em promover a degeneração dos componentes da matriz extracelular. Diferentes trabalhos demonstram o envolvimento da HtrA1 na sinalização de TGF β .^{92,93} A proteína HTRA1 se liga às proteínas da família “*Transforming Growth Receptor Beta*” ou Fator de Transformação do Crescimento Beta (TGF- β) e inibe a sua capacidade para enviar sinais químicos.⁶⁸ As proteínas TGF- β normalmente ajudam a controlar muitas funções celulares críticas, incluindo proliferação celular, diferenciação celular, motilidade celular e apoptose. A sinalização de TGF- β também desempenha um papel importante na formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese) e alterações em sua regulação estão relacionadas com a patogênese da DMRI.⁶⁸

A expressão da proteína HTRA1 é observada em vários tecidos humanos adultos normais, tais como epiderme, onde a expressão é muito alta, endotélio vascular, onde a expressão é alta e células neuronais, onde a expressão é muito baixa. A expressão da HTRA1 foi associada ao aumento do EPR e ao aumento da presença de drusas em pacientes que apresentavam o polimorfismo rs11200638.⁹⁵

O SNP rs11200638 está localizado na região promotora do gene.^{64,86} Esta alteração é decorrente de uma substituição de G para A no nucleotídeo -497.⁹⁶ O polimorfismo é reportado como uma variante causal para o risco de DMRI na região 10q26 com um risco atribuído à população de 49,3%.⁹⁵

O alelo de risco A pode comprometer o padrão CG da região, alterando a transcrição do gene.⁹⁵ Um estudo inicial mostrou que o alelo de risco deste SNP foi correlacionado com o aumento do nível de RNAm em linfócitos de sangue total por RT-PCR e um nível mais elevado da proteína humana HTRA1 no EPR por *immunoblot*.⁴³ Posteriormente, essa correlação foi replicada em retinas e tecidos placentários por imuno-histoquímica e RT-PCR.⁹⁵⁻⁹⁸ Em contraste, vários estudos de grupos independentes demonstraram que os genótipos do rs11200638 e de outras variantes da região 10q26 não são correlacionadas com a expressão de RNAm e da proteína HTRA1 em retinas humanas e outros tecidos.^{84,98-100} A discordância de resultados ressalta a necessidade de mais estudos de SNPs da região 10q26 e de como essas variantes alteram a expressão do *HTRA1*.⁹⁵

1.9. JUSTIFICATIVA

A DMRI é uma causa prevalente de perda visual em países industrializados. O avanço da idade e história familiar são os dois maiores fatores de risco para o desenvolvimento da doença. No entanto, um número de fatores ambientais pode também contribuir para manifestações clínicas da DMRI, entre eles, o tabagismo, doença vascular, exposição à UV e estado nutricional.

A DMRI afeta mais de 1,7 milhão de pessoas só nos EUA, com perspectiva de se chegar a 3 milhões em 2020, e há aproximadamente 50 milhões de pessoas com DMRI em todo o mundo. É uma das causas de cegueira em que a prevenção e o

tratamento ainda não foram bem estabelecidos devido ao desconhecimento da sua etiologia e dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos nas diferentes fases da doença.

Segundo dados do IBGE, dos 184 milhões de habitantes do país, 36 milhões estão na faixa de idade superior aos 50 anos de idade. Em 2036, o total de idosos deve superar o de crianças e estima-se que a incidência da DMRI no mundo seja três vezes maior em 2025. Ainda não existem estudos sobre a incidência da doença no Brasil, no entanto, sabe-se que essa é a principal causa de cegueira em pessoas acima de 60 anos no mundo ocidental.

Para que se conheça o impacto das variações genéticas e o risco de desenvolvimento da DMRI na população brasileira, muitos estudos são necessários, com um grande número de pacientes, provenientes de diferentes regiões do Brasil. Com a compreensão do perfil genético desta amostra da população do estado de São Paulo em relação à DMRI, espera-se contribuir para possíveis aplicações deste conhecimento na prática clínica.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Compreender a contribuição do SNP rs11200638 em relação à etiologia da DMRI.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a frequência do rs11200638 no gene *HTRA1* em uma amostra da população do Estado de São Paulo, de pacientes portadores de DMRI e de controles sem a doença.
- Verificar se o envolvimento da variante rs11200638 confere risco ou proteção para o desenvolvimento da doença na amostra estudada.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Casuística

Este trabalho se refere a um estudo do tipo caso-controle. Foram estudados 204 pacientes com DMRI (grupo caso) e 166 pacientes sem DMRI (grupo controle) selecionados no Ambulatório de Oftalmologia do Hospital das Clínicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). O estudo passou por aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp e o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi assinado pelos participantes do estudo (Anexos 1 e 2).

3.1.1 Grupo caso

3.1.1.1 Critérios de inclusão

Os 204 pacientes incluídos no estudo preencheram os critérios necessários para diagnóstico de DMRI graus 3, 4 ou 5 (DMRI intermediária ou avançada), tanto do tipo exsudativa, quanto do tipo atrófica, segundo o sistema de classificação do *Clinical age-related maculopathy staging system* (CARMS). O grau 3 requer a presença de no mínimo 15 drusas intermediárias ou uma drusa grande associada 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 μ 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, membrana neovascularcoroidal (MNVC) com fibrose ou hemorragia sub-retiniana, cicatriz consistente com tratamento de DMRI e cicatriz disciforme.

Foi classificado como portador de DMRI avançada o pior olho que apresentasse AG, MNV e DMRI disciforme. O pior olho que apresentasse DMRI seca leve ou moderada, atrofia do EPR, hipopigmentação ou hiperpigmentação foi classificado como portador de DMRI não avançada.

3.1.2 Grupo controle

3.1.2.1 Critérios de inclusão

Os indivíduos que compuseram o grupo controle apresentavam idade de 55 anos ou mais e ausência de qualquer evidência de DMRI, como drusas ou alterações no EPR.

3.1.2.2 Critérios de exclusão: grupos caso e controle

Pacientes com história familiar de cegueira, que apresentassem qualquer opacidade de meios que impedissem fundoscopia e/ou retinografia de boa qualidade foram excluídos do estudo. Pacientes com vasculopatia polipoidal coroidal (VPC), alta miopia (equivalente esférico >-6 dioptrias), estrias angióides, doença coriorretiniana infecciosa, inflamatória ou hereditária, trauma, presença de hemorragia macular de qualquer causa e casos de neovascularização suspeita de proliferação angiomasosa retiniana (PAR) também foram excluídos.

3.2. Métodos

3.2.1. Extração de DNA

Foram coletados 10 mL de sangue periférico em frasco estéril, com EDTA 10% como anticoagulante, de todos os indivíduos submetidos ao estudo. O DNA foi extraído segundo o método fenol/clorofórmio. As amostras foram identificadas e estocadas a -20°C.

3.2.2. Avaliação da variante rs11200638

A análise da variante rs11200638 foi realizada por meio de PCR e digestão enzimática. O sequenciamento direto de algumas amostras, com os diferentes genótipos apresentados na digestão foi realizado para a validação da padronização.

3.2.2.1. PCR

A PCR foi padronizada utilizando-se os seguintes reagentes, no mínimo: um par de cada iniciador compreendendo a variante rs11200638 do gene *HTRA1* cuja sequência direta foi 5'-TTCCCATCTGAGACCGCT-3' e reversa foi 5'-GGAAAGTTCCTGCAAATCG-3', tampão da enzima (Tris-HCl 20mM (pH 8,4), KCl

50mM, MgCl₂ 1.5mM, gelatina 0,01%, DMSO (5%), mistura de nucleotídeos (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) 0,2mM e 1 unidade de Taq DNA polimerase (Invitrogen Life Technology, Gaithersburg, MD, EUA), somados a 2,0µg de DNA genômico. A seguir as amostras foram amplificadas por meio de aparelho termociclador. As temperaturas e duração dos ciclos foram: desnaturação inicial a 94°C durante 5 minutos; 35 ciclos de desnaturação a 94°C durante 60 segundos, anelamento a 60°C durante 60 segundos e extensão a 72°C durante 60 segundos; extensão final de 72°C durante 5 minutos e conservação a 4°C.

Ao final da reação, 3µL do produto da PCR foram misturados a 1µL do tampão de corrida *10X Blue Juice Gel Loading Buffer* (Invitrogen™. LifeTechnologies, Carlsbad, CA, USA) e submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo e observados sob iluminação ultravioleta. Os fragmentos amplificados foram comparados ao marcador de peso molecular *100 bp DNA Ladder* (Invitrogen™.Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) (figura 6).

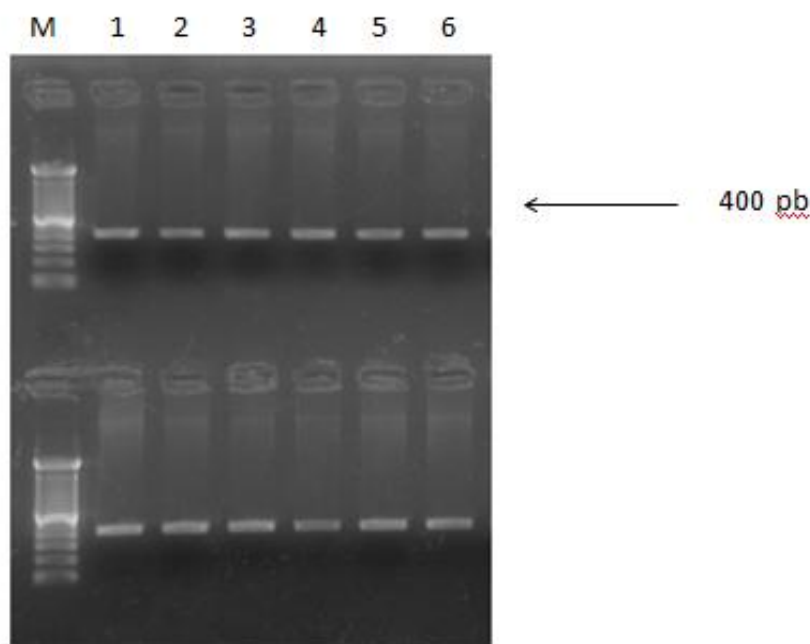


Figura 6. Padronização da PCR para o SNP rs11200638. A figura mostra na primeira coluna tanto na parte superior como na parte inferior o marcador de 100 pb e nas demais colunas as bandas amplificadas com 400 pb a partir de amostras de DNA de pacientes e controles.

3.2.2.2. Reação de Sequenciamento

Para a reação de sequenciamento utilizou-se de 10 a 40ng do produto da PCR para um volume final de reação de 10µL, contendo 1µL de “*Big Dye Terminator Ready Reaction v3.0*” (ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems Foster City, CA, USA), 3µL do tampão de sequenciamento 5X (Applied Biosystems Foster City, CA, USA) e 1,6 pmol de um dos iniciadores (“sense” ou “antisense”) utilizados na PCR, sendo o volume final completado com água deionizada estéril. As condições das reações de sequenciamento foram: 25 ciclos a 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos.

3.2.2.3. Purificação da reação de Sequenciamento

Após a realização da reação de sequenciamento, aos 10 µl do produto final foram adicionados 50 µl de isopropanol 65%, permanecendo em repouso em ambiente escuro por 20 minutos e logo em seguida submetidos à centrifugação por 25 minutos a 25°C a 13000 rpm. Após centrifugação o sobrenadante foi retirado por pipetagem. Foram adicionados, em seguida, 250 µl de etanol 60%, levando-se à centrifugação por 10 minutos a 25°C a 13000 rpm. Após centrifugação o sobrenadante foi retirado por pipetagem. Em seguida os tubos foram levados ao banho seco a 90°C por 4 minutos para evaporação do etanol residual, permanecendo no tubo apenas o “pellet” do material tratado aderido à parede do tubo.

As amostras foram ressuspensas em 17 µl de Formamida Hi-Di (Applied Bio Systems, Foster City, CA, USA), desnaturadas a 95°C por 3 minutos, colocadas em gelo e submetidas à eletroforese no analisador automático de DNA “ABI PRISM 3500” (Applied Bio Systems, Foster City, CA, USA). Para confirmação da região genômica analisada, as sequências foram submetidas a buscas por similaridade, utilizando-se o “algoritmo de buscas” *Blast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) (figura 7).

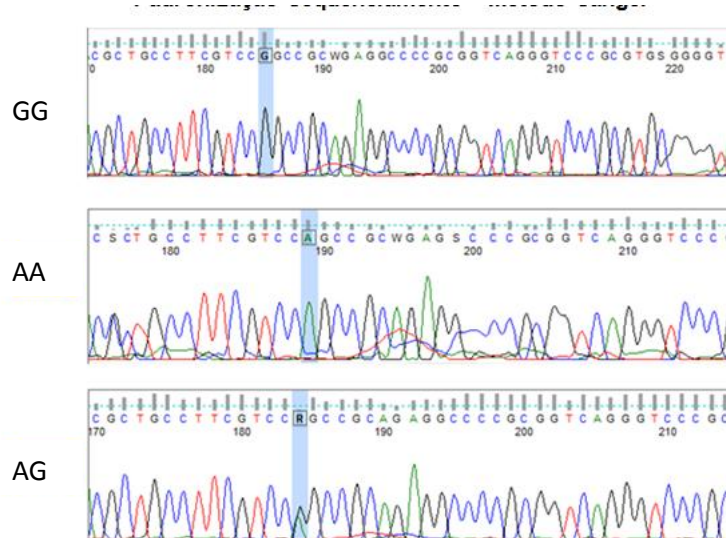


Figura 7. Cromatogramas que demonstram os diferentes genótipos determinados pelo sequenciamento da região do gene *HTRA1* que compreende o SNP rs11200638.

3.2.2.4. Digestão Enzimática

Os produtos de PCR foram submetidos à digestão pela enzima de restrição *Eag* I (BioLabs®, New England, EUA) por 2 horas a 37°C. Foram utilizados 8,5 µl do produto de PCR, 1,0 µl do Tampão 3.1 e 0,5 µl de enzima (1000 unidades por µl) para uma reação final de 10 µl e os produtos foram aplicados em gel de agarose 3%. A análise foi realizada de acordo com o tamanho dos fragmentos de digestão (figura 8).

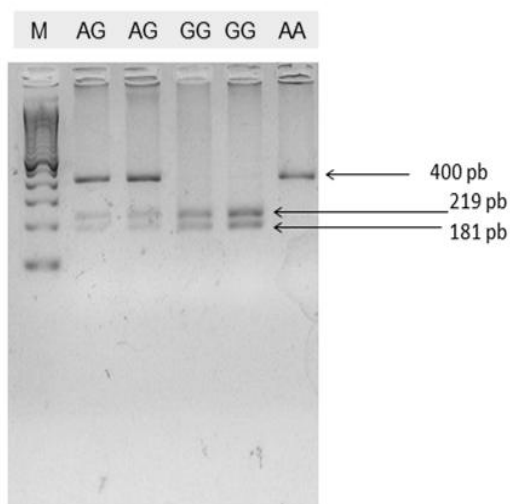


Figura 8. Padronização da digestão enzimática com *Eag* I. Na presença do genótipo GG a enzima produz fragmentos de 219 pb e 181 pb), para o genótipo AA a enzima não corta, mantendo o produto de 400 pb igual ao da PCR e para o genótipo AG os três fragmentos podem ser identificados. Na imagem temos na primeira coluna o Marcador de 100pb (DNA Ladder Invitrogen™·Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e nas colunas subsequentes amostras com os genótipos AG, AG, GG, GG e AA.

3.2.2.5. Análise estatística

A análise estatística foi realizada por meio da regressão logística utilizando o *software* "R".¹⁰¹ O teste chi-quadrado e o equilíbrio de *Hardy-Weinberg* foram utilizados para analisar a distribuição genotípica nos grupos caso e controle. Valores menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

4. RESULTADOS

4.1. Dados Demográficos e Estatística Descritiva do rs11200638

Trezentos e setenta indivíduos não relacionados foram envolvidos nesse estudo, sendo 204 pacientes com DMRI e 166 sem DMRI (grupo controle). A idade média dos pacientes com DMRI e controles, distribuição de gênero e características clínicas quanto a forma da DMRI são apresentadas na Tabela 1, abaixo.

Tabela 1. Dados demográficos de pacientes e controles.

Parâmetro	DMRI	Controles	P-valor	OR (95% IC)
Tamanho Amostral	204	166		
Masculino (%)	83 (41,20%)	87 (52,40%)	0,0315*	1,573 (1,042-2,382)
Feminino (%)	120 (58,80%)	79 (47,60%)		
Idade (± DP)	74,23 ± 8,166	71,17 ± 7,531	3,32e-04***	1,050 (1,023-1,079)
Características Clínicas				
DMRI Seca	87 (42,65%)			
DMRI Úmida	117 (57,35%)			
DMRI Avançada	147 (72,06%)			
DMRI Não Avançada	57 (27,94%)			

DMRI, Degeneração Macular Relacionada à Idade; OR, *Odds Ratio*; IC, intervalo de confiança; DP, desvio padrão.

* Nível de significância: $p < 0.05$

*** Nível de significância: $p < 0.001$

4.2. Distribuição quantitativa por sexo e idade e tabagismo em casos e controles

Ao comparar casos e controles em relação ao sexo por meio do teste chi-quadrado, observa-se uma diferença significativa entre homens e mulheres, $p = 0,04$ (Tabela 2), demonstrando que na amostra estudada havia mais mulheres com DMRI que homens (Gráfico 1).

Ao analisar a distribuição de casos e controles por análise de regressão logística, observa-se um resultado significativo entre idade e DMRI (Tabela 2). A média de casos foi de $74,23 \pm 8,166$ anos e de controles $71,17 \pm 7,531$ anos (Gráfico 2).

O tabagismo não foi avaliado nesta população de casos e controles, uma vez que os dados presentes nos prontuários estavam incompletos e não permitiam uma análise acurada.

Tabela 2. Análise por regressão logística comparando casos e controles em relação a sexo, idade e tabagismo.

Variável	N	Categorias	P-valor	OR	95% IC
Sexo	370	M x F	0,0315 *	1,573	1,042 – 2,382
Idade	370	–	3,32e-04 ***	1,050	1,023 – 1,079

N, número; M, masculino; F, feminino; OR, *Odds Ratio*; IC, intervalo de confiança.

* Nível de significância: $p < 0.05$

*** Nível de significância: $p < 0.001$

4.3. Análise do SNP rs11200638 em relação à DMRI em casos e controles.

Para a análise do polimorfismo rs11200638 comparando-se os genótipos AA e AG versus GG entre casos e controles utilizou-se a análise por regressão logística. Os genótipos AA (OR: 5,293 IC 95%: 2,904- 9,933) e AG (OR: 1,843 IC 95%: 1,131- 3,029) mostraram-se significativamente associados com a doença quando comparados ao genótipo GG. Para a análise do alelo A, que é o alelo mutante do rs11200638, o *Odds Ratio* apresentado foi de 2,369 (IC 95%: 1,759- 3,029) e $p < 0,0000001$; a significância da diferença na proporção alélica foi estimada aplicando-se o teste chi-quadrado.

Ao comparar as variáveis DMRI úmida versus controles observamos que o genótipo AA esteve significativamente associado à forma úmida da doença (OR:4,685 IC 95%: 2,379-9,488), o que não foi observado para o genótipo AG (p-valor: 0,068).

Para o alelo A foi observado também um resultado estatisticamente significativo (OR:2,218 IC 95%: 1,759- 3,029). De forma semelhante, ao compararmos as variáveis DMRI seca versus controles, observamos que os genótipos AA e AG estavam significativamente associados à DMRI seca (OR:6,281 IC 95%: 2,968- 13,843; OR: 2,066 IC 95%: 1,073- 4,122, respectivamente), o que também foi observado para o alelo A (OR: 2,591 IC 95%: 1,778- 3,775). No entanto, quando avaliamos os tipos seca x úmida não obtivemos resultados estatisticamente significativos para os genótipos AA (p-valor: 0,458) e AG (p-valor: 0,618) e para o alelo A (p-valor: 0,586) em relação às diferentes formas de DMRI.

Ao comparar as variáveis DMRI avançada x controles observamos que os genótipos AA (OR: 5,108 IC 95%: 2,686- 10,000) e AG (OR: 1,796 IC 95%: 1,052- 3,104) estiveram significativamente associados à forma avançada da doença, o mesmo observado para o alelo A (OR: 2,325 IC 95%: 1,686- 3,206). Na comparação das variáveis DMRI não avançada x controles observamos resultados estatisticamente significativos para o genótipo AA (OR: 5,814 IC 95%: 2,475- 14,372) e para o alelo A (OR: 2,486 IC 95%: 1,609- 3,84), não sendo observada associação para o genótipo AG (p-valor: 0,087). Entretanto, ao compararmos as formas avançada x não avançada não obtivemos resultados estatisticamente significativos para os genótipos AA (p-valor: 0,766) e AG (p-valor: 0,820) e para o alelo A (p-valor: 0,765).

A Tabela 3, demonstra os resultados obtidos.

Tabela 3. Análise por regressão logística do polimorfismo rs11200638 entre casos e controles e após estratificação da DMRI nas formas seca e úmida e avançada e não avançada.

Variável	N	Categorias	P-valor	OR	95% IC
Casos x Controles	204 x 166	AA x GG	1e-07 ***	5,293	2,904 – 9,933
		AG x GG	0,015*	1,843	1,131 – 3,029
		Alelos A x G	1e-07 ***	2,369	1,759- 3,029
Úmida x Controles	117 x 166	AA x GG	1,14e-05 ***	4,685	2,379 – 9,488
		AG x GG	0,068	1,706	0,966 – 3,061
		Alelos A x G	2,57e-06 ***	2,218	1,576 – 3,12
Seca x Controles	87 x 166	AA x GG	2,67e-06 ***	6,281	2,968 – 13,843
		AG x GG	0,034 *	2,066	1,073 – 4,122
		Alelos A x G	2,65e-07 ***	2,591	1,778 – 3,775
Úmida x Seca	117 x 87	AA x GG	0,458	0,746	0,339 – 1,610
		AG x GG	0,618	0,826	0,385 – 1,740
		Alelos A x G	0,586	0,856	0,575 – 1,275
Avançada x Controles	147 x 166	AA x GG	1,09e-07 ***	5,108	2,686 – 10,000
		AG x GG	0,033 *	1,796	1,052 – 3,104
		Alelos A x G	1,13e-07 ***	2,325	1,686 – 3,206
Não avançada x Controles	57 x 166	AA x GG	7,92e-05 ***	5,814	2,475 – 14,372
		AG x GG	0,087	1,977	0,924 – 4,466
		Alelos A x G	1,557e-05	2,486	1,609 – 3,84
Avançada x Não avançada	147 x 57	AA x GG	0,766	1,138	0,490 – 2,741
		AG x GG	0,820	1,101	0,488 – 2,592
		Alelos A x G	0,765	1,069	0,689 – 1,658

N: número; OR: *Odds Ratio*, IC: intervalo de confiança, DMRI: degeneração macular relacionada à idade.

* Nível de significância: $p < 0.05$

*** Nível de significância: $p < 0.001$

5. DISCUSSÃO

A partir do relato do primeiro gene associado com a DMRI (*CFH*, identificado em 2005), vários genes foram relacionados com a etiologia da doença por meio de abordagens que avaliavam o genoma como um todo.⁵⁵⁻⁵⁸

Os fatores genéticos desempenham um papel importante tanto na etiologia quanto na gravidade da doença, com estimativas variando de 46 a 71% na sua contribuição.¹¹² No entanto, sugere-se que poucos genes, incluindo *CFH*, *ARMS2*, *HTRA1* são os principais responsáveis pelo fenótipo final.⁶⁰ Isso reforça a necessidade do estudo do gene *HTRA1* na população brasileira.

Com relação ao gene *HTRA1*, diversas publicações relataram o SNP rs11200638 como o principal associado à suscetibilidade à DMRI.¹¹³ A associação do polimorfismo à doença foi replicada em vários grupos étnicos. Uma meta-análise consistindo de 14 estudos do tipo caso-controle concluiu que o efeito do rs11200638 foi mais forte na DMRI úmida quando comparado à DMRI seca e sugere que este SNP seja um fator de risco em todas as populações estudadas.¹¹⁰ Outra meta-análise observou que o alelo A do rs11200638 confere um aumento de quase 3,0 vezes na susceptibilidade à DMRI quando comparado ao alelo G.¹¹³ Mais recentemente, estudos realizados em populações iranianas, egípcias e chinesas também confirmaram essa associação.¹¹⁴⁻¹¹⁶

Os resultados observados em pacientes brasileiros foram semelhantes aos relatados por outros grupos e, como esperado, as ORs são mais próximas às observadas em descendentes europeus, confirmando o alelo A como um fator de risco, conferindo mais risco ao desenvolvimento da doença.

A população brasileira é etnicamente muito heterogênea, formada originalmente por ameríndios e mais tarde pela introdução de europeus e africanos, reforçando assim a importância de nosso estudo.¹¹⁷ Até onde se sabe, é a primeira vez que a associação entre rs11200638 e DMRI está sendo relatada na América Latina.¹¹⁸

O alelo mutante A do rs11200638 foi considerado como alelo de risco em diversos estudos e em diversas populações, tanto para DMRI seca como para DMRI úmida⁹⁶, no entanto, em outros estudos foi fortemente associado apenas com a DMRI úmida.¹¹⁹ Não foi possível obter resultados significativos quando comparado os

genótipos após a estratificação da doença em úmida e seca e avançada e não avançada, o que talvez possa ser explicado pelo tamanho da amostra. Desta forma, apesar das comparações entre as formas seca e úmida versus controles e avançada e não avançada versus controles terem apresentado resultados estatisticamente significativos, esses resultados refletem a comparação de doentes versus não doentes, independentemente da estratificação. O tabagismo é um fator de risco para a DMRI.^{32,33} Aqueles que fumam apresentam o risco até três vezes maior de desenvolver a DMRI do que os não fumantes.⁹⁷ Não foi possível avaliar adequadamente o hábito de fumar entre pacientes e controles devido à falta de informações completas nos prontuários. Quanto ao gênero, observamos maior frequência de mulheres com DMRI do que homens. Um estudo realizado por Zetterberg no ano de 2016, mostrou que duas a cada três mulheres são cegas devido a DMRI, uma diferença de gênero que é válida para países desenvolvidos e em desenvolvimento, concluindo que fatores biológicos e socioeconômicos devem ser considerados quando se investigam as causas das diferenças de gênero na prevalência da DMRI.¹⁰²

Esse ponto deve ser cuidadosamente avaliado, uma vez que, embora alguns estudos apresentem uma maior associação entre DMRI e sexo feminino, dados demográficos do estado de São Paulo mostram que na faixa etária em que a DMRI é mais frequente, as mulheres vivem mais.¹⁰³

De forma geral, conseguimos replicar o envolvimento de rs11200638 com a etiologia da DMRI no Brasil, o que ajudará a entender melhor o perfil genético da doença em uma população altamente miscigenada e abrir fronteiras para novos estudos, em diferentes regiões do país.

6. CONCLUSÕES

O SNP rs11200638 no gene *HTRA1* foi pela primeira vez estudado em uma população da América Latina.

Na população estudada o alelo A foi considerado um alelo de risco para a DMRI, como já descrito em outras populações na literatura. Indivíduos que possuem os genótipos AA e AG apresentam risco maior de desenvolver a doença quando comparados a indivíduos sem a doença.

O resultado observado, aliado aos de outros SNPs avaliados na mesma população, possivelmente, contribuirá para sua aplicação na prática clínica.

7. REFERÊNCIAS

- 1- Mehta, S. "Age-Related Macular Degeneration". *Primary care*.2015;42(3): 377–91.
- 2- World Health Organization. 2013. Available at <http://www.who.int/en/>. Acesso em 10 Aug 2013.
- 3- Nehemy MB." Degeneração macular relacionada à idade : novas perspectivas". *Arq Bras Oftalmol*.2006;69(6):955-958.
- 4- Santos LPF, Diniz JR, Leão AC de S, Sena MF. "Degeneração macular relacionada à idade: prevalência e fatores de risco em dois centros oftalmológicos de referência em Pernambuco". *Arq Bras Oftalmol*.2005;68(2):229-233.
- 5- Romani FA. "Prevalência de transtornos oculares na população de idosos residentes na cidade de Veranópolis, RS, Brasil". *Arq Bras Oftalmol*.2005;68(5):649-655.
- 6- Oguido APMT, Casella AMB, Matsuo T, Ramos Filho EH de F, Berbel R, Silva RMA. "Prevalence of age-related macular degeneration in Japanese immigrants and their descendants living in Londrina (PR) – Brazil". *Arq Bras Oftalmol*.2008;71(3):375-380.
- 7- Casswell AG, Kohen D, Bird AC. "Retinal pigment epithelial detachments in the elderly: classification and outcome." *Br J Ophthalmol*.1985;69(6):397-403.
- 8- Schramm EC, Clark SJ, Triebwasser MP, Raychaudhuri S, Seddon JM, Atkinson JP. "Genetic variants in the complement system predisposing to age-related macular degeneration: a review". *Mol Immunol*.2014;61(2):118-125.
- 9- Bressler NM. "Early detection and treatment of neovascular age-related macular degeneration". *J Am Board Fam Pract*.2002;15(2):142-152.
- 10- Chen W, Stambolian D, Edwards AO, et al. "Genetic variants near TIMP3 and high-density lipoprotein-associated loci influence susceptibility to age-related macular degeneration". *Proc Natl Acad Sci USA*.2010;107(16):7401-7406.
- 11- Harding SP."Neovascular age-related macular degeneration: decision making and optimal management". *Eye (Lond)*.2010;24(3):497-505.
- 12- Wong WL, Su X, Li X, et al. "Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta analysis". *Lancet Glob Healthy*.2014;2(2):e106-e116.
- 13- Munch IC, Linneberg A, Larsen M. "Precursors of age-related macular degeneration: associations with physical activity, obesity, and serum lipids in the inter99 eye study". *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54(6):3932-3940.

- 14- Wang JJ, Foran S, Smith W, Mitchell P. "Risk of age-related macular degeneration in eyes with macular drusen or hyperpigmentation: the Blue Mountains Eye Study cohort". *Arch Ophthalmol*. 2003;121(5):658-663.
- 15- Taleb A, Ávila M, Moreira H. As Condições da saúde ocular no Brasil. Rio de Janeiro, RJ, BR: Walprint Gráfica e Editora. 2009;10.
- 16- Klein R, Klein BE, Linton KL. "Prevalence of age-related maculopathy. The Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology*". 1992;99(6):933-943.
- 17- Zarbin M a. "Current concepts in the pathogenesis of age-related macular degeneration". *Arch Ophthalmol*. 2004;122(4):598-614.
- 18- Nowak JZ." Age-related macular degeneration (AMD): pathogenesis and therapy". *Pharmacol Rep*.2006:353-363.
- 19- Iu LPL, Kwok AKH. "An update of treatment options for neovascular age-related macular degeneration". *Hong Kong Med J*.2007;13(6):460-470.
- 20- Khandhadia S, Lotery A." Oxidation and age-related macular degeneration: insights from molecular biology". *Expert Rev Mol Med*.2010;12(October):e34.
- 21- Scholl HPN, Fleckenstein M, Issa PC, Keilhauer C, Holz FG, Weber HF. "Review An update on the genetics of age-related macular degeneration". 2007;2(December 2006):196-205.
- 22- Tomany SC, Wang JJ, van Leeuwen R, et al. "Risk factors for incident age-related macular degeneration". *Ophthalmology*.2004;111(7):1280-1287.
- 23- Sakurai E, Taguchi H, Anand a, et al. "Targeted Disruption of the CD18 or ICAM-1 Gene Inhibits Choroidal Neovascularization".*Investig Ophthalmol Vis Sci*.2003;44(6):2743-2749.
- 24- Clemons TE. "Risk factors associated with age-related macular degeneration. A case-control study in the age-related eye disease study: Age-Related Eye Disease Study Report Number 3". *Ophthalmology*. 2000;107(12):2224-2232.
- 25- Buch H, Vinding T, la Cour M, Jensen GB, Prause JU, Nielsen N V. "Risk factors for age-related maculopathy in a 14-year follow-up study: the Copenhagen City Eye Study". *Acta Ophthalmol Scand*.2005;83(4):409-418.
- 26- Chakravarthy U, Wong TY, Fletcher A, et al. "Clinical risk factors for age-related macular degeneration: a systematic review and metaanalysis". *BMJ*.2012; 326,485–886.
- 27- Frank RN, Puklin JE, Stock C, Canter LA. "Race, iris color, and age-related macular degeneration". *Trans Am Ophthalmol Soc*.2000;98:109-15-7.
- 28- Smith W, Assink J, Klein R, et al. "Risk factors for age-related macular degeneration: Pooled findings from three continents". *Ophthalmology*. 2001;108(4):697-704.

- 29- 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):730-736.
- 30- Pollack A, Marcovich A, Bukelman A, Oliver M. "Age-related macular degeneration after extracapsular cataract extraction with intraocular lens implantation". *Ophthalmology*. 1996;103(10):1546-1554.
- 31- Smith BT, Belani S, Ho AC. "Light energy, cataract surgery, and progression of age-related macular degeneration". *Curr Opin Ophthalmol*. 2005;16(3):166-169.
- 32- Tan JSL, Mitchell P, Kifley A, Flood V, Smith W, Wang JJ. "Smoking and the long-term incidence of age-related macular degeneration: the Blue Mountains Eye Study". *Arch Ophthalmol*. 2007;125(8):1089-1095.
- 33- Cano M, Thimmalappula R, Fujihara M, et al. "Cigarette smoking, oxidative stress, the anti-oxidant response through Nrf2 signaling, and Age-related Macular Degeneration". *Vision Res*. 2010;50(7):652-664.
- 34- Schaumberg D a, Hankinson SE, Guo Q, Rimm E, Hunter DJ. "A prospective study of 2 major age-related macular degeneration susceptibility alleles and interactions with modifiable risk factors". *Arch Ophthalmol*. 2007;125(1):55-62.
- 35- Clemons TE, Milton RC, Klein R, Seddon JM, Ferris FL. "Risk factors for the incidence of Advanced Age-Related Macular Degeneration in the Age-Related Eye Disease Study (AREDS) AREDS report". *Ophthalmology*. 2005;112(4):533-539;
- 36- Tan JSL, Mitchell P, Smith W, Wang JJ. "Cardiovascular risk factors and the long-term incidence of age-related macular degeneration: the Blue Mountains Eye Study". *Ophthalmology*. 2007;114(6):1143-1150".
- 37- Klein R, Klein BEK, Tomany SC, Cruickshanks KJ. "The association of cardiovascular disease with the long-term incidence of age-related maculopathy: the Beaver Dam Eye Study". *Ophthalmology*. 2003;110(6):1273-1280.
- 38- Leske MC, Wu S-Y, Hennis A, et al. "Nine-year incidence of age-related macular degeneration in the Barbados Eye Studies". *Ophthalmology*. 2006;113(1):29-35.
- 39- Vingerling JR, Dielemans I, Bots ML, Hofman A, Grobbee DE, de Jong PT. "Age-related macular degeneration is associated with atherosclerosis. The Rotterdam Study". *Am J Epidemiol*. 1995;142(4):404-409.
- 40- Chong EW-T, Kreis AJ, Wong TY, Simpson JA, Guymer RH. "Dietary omega-3 fatty acid and fish intake in the primary prevention of age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis". *Arch Ophthalmol*. 2008;126(6):826-833.
- 41- Pham TQ, Rochtchina E, Mitchell P, Smith W, Wang JJ. "Sunlight-related factors and the 10-year incidence of age-related maculopathy". *Ophthalmic Epidemiol*. 16(2):136-141.

- 42- Chong EW-T, Kreis AJ, Wong TY, Simpson JA, Guymer RH. "Alcohol Consumption and the Risk of Age-Related Macular Degeneration: A Systematic Review and Meta-Analysis". *Am J Ophthalmol*.2008;145(4):707-715.
- 43- 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):992-993.
- 44- Haines JL, Hauser MA, Schmidt S, et al. "Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration". *Science*.2005;308(5720):419-421.
- 45- Gass JD. "Drusen and disciform macular detachment and degeneration". *Arch Ophthalmol*.1973;90(3):206-217.
- 46- Jampol LM. Race, "Macular Degeneration, and the Macular Photocoagulation Study". *Arch Ophthalmol*.1992;110(12):1699.
- 47- Khan JC, Thurlby DA, Shahid H, et al. "Smoking and age related macular degeneration: the number of pack years of cigarette smoking is a major determinant of risk for both geographic atrophy and choroidal neovascularization". *Br J Ophthalmol*. 2006; 90:75-80.
- 48- Khan JC, Shahid H, Thurlby DA, et al. "Age related macular degeneration and sun exposure, iris colour, and skin sensitivity to sunlight". *Br J Ophthalmol*.2006;90(1):29-32.
- 49- Ambati J, Ambati BK, Yoo SH, Ianchulev S, Adamis AP. "Age-related macular degeneration: etiology, pathogenesis, and therapeutic strategies". *Surv Ophthalmol*. 2003;48(3):257-293.
- 50- Dong LM, Stark WJ, Jefferys JL, et al. "Progression of age-related macular degeneration after cataract surgery". *Arch Ophthalmol*. 2009;127(11):1412-1419.
- 51- Hyman L, Neborsky R. "Risk factors for age-related macular degeneration : an update." *Curr Opin Ophthalmol*. 2002;13 :171-175.
- 52- Cho E, Hung S, Willett WC, et al. "Prospective study of dietary fat and the risk of age-related macular degeneration". *Am J Clin Nutr*. 2001;73(2):209-218.
- 53- Traboulsi EI. "The challenges and surprises of studying the genetics of age-related macular degeneration". *Am J Ophthalmol*.2005;139(5):908-911.
- 54- van Lookeren Campagne M, LeCouter J, Yaspan BL, Ye W. "Mechanisms of age-related macular degeneration and therapeutic opportunities". *J Pathol*. 2014;232(2):151-164.
- 55- Rivera A, Fisher S a, 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". *Hum Mol Genet*. 2005;14(21):3227-3236.
- 56- Dinu V, Miller PL, Zhao H. "Evidence for association between multiple complement pathway genes and AMD". *Genet Epidemiol*. 2007;31(3):224-237.

- 57- Wan X, Yang C, Yang Q, Xue H, Tang NLS, Yu W." Detecting two-locus associations allowing for interactions in genome-wide association studies". *Bioinformatics*. 2010;26(20):2517-2525.
- 58- Fritsche LG, Fariss RN, Stambolian D, Abecasis GR, Curcio C a, Swaroop A. "Age-Related Macular Degeneration: Genetics and Biology Coming Together". *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2014;(April):1-21.
- 59- Black JRM, Clark SJ. "Age-related macular degeneration: genome-wide association studies to translation." *Genet Med*.2015; 277:294–305.
- 60- Edwards AO, Ritter R, Abel KJ, Manning A, Panhuysen C, Farrer LA." Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration". *Science*. 2005;308(5720):421-424.
- 61- Gold B, Merriam JE, Zernant J, et al. "Variation in factor B (BF) and complement component 2 (C2) genes is associated with age-related macular degeneration". *Nat Genet*. 2006;38(4):458-462.
- 62- Maller J, George S, Purcell S, et al. "Common variation in three genes, including a noncoding variant in CFH, strongly influences risk of age-related macular degeneration". *Nat Genet*. 2006;38(9):1055-1059.
- 63- Spencer KL, Hauser MA, Olson LM, et al. "Haplotypes spanning the complement factor H gene are protective against age-related macular degeneration". *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48(9):4277-4283.
- 64- McKay GJ, Silvestri G, Patterson CC, Hogg RE, Chakravarthy U, Hughes AE. "Further assessment of the complement component 2 and factor B region associated with age-related macular degeneration". *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50(2):533-539.
- 65- Maller JB, Fagerness JA, Reynolds RC, Neale BM, Daly MJ, Seddon JM. "Variation in complement factor 3 is associated with risk of age-related macular degeneration". *Nat Genet*. 2007;39(10):1200-1201.
- 66- Yates JRW, Sepp T, Matharu BK, et al. "Complement C3 variant and the risk of age-related macular degeneration". *N Engl J Med*. 2007;357(6):553-561.
- 67- Fagerness JA, Maller JB, Neale BM, Reynolds RC, Daly MJ, Seddon JM. "Variation near complement factor I is associated with risk of advanced AMD". *Eur J Hum Genet*. 2009;17(1):100-104.
- 68- Dewan A, Liu M, Hartman S, et al. "HTRA1 promoter polymorphism in wet age-related macular degeneration". *Science*. 2006;314(5801):989-992.
- 69- Chen W, Stambolian D, Edwards AO, et al. "Genetic variants near TIMP3 and high-density lipoprotein-associated loci influence susceptibility to age-related macular degeneration". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(16):7401-7406.

- 70- Baird PN, Guida E, Chu DT, Vu HT V, Guymer RH. "The epsilon2 and epsilon4 alleles of the apolipoprotein gene are associated with age-related macular degeneration". *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45(5):1311-1315.
- 71- Yu Y, Bhangale TR, Fagerness J, et al. "Common variants near FRK/COL10A1 and VEGFA are associated with advanced age-related macular degeneration". *Hum Mol Genet*. 2011;20(18):3699-3709.
- 72- Neale BM, Fagerness J, Reynolds R, et al. "Genome-wide association study of advanced age-related macular degeneration identifies a role of the hepatic lipase gene (LIPC)". *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107(16):7395-7400.
- 73- Priya RR, Chew EY, Swaroop A. "Genetic studies of age-related macular degeneration: lessons, challenges, and opportunities for disease management". *Ophthalmology*. 2012;119(12):2526-2536.
- 74- Canter JA, Olson LM, Spencer K, et al. "Mitochondrial DNA polymorphism A4917G is independently associated with age-related macular degeneration". *PLoS One*. 2008;3(5):e2091.
- 75- Fritsche LG, Lauer N, Hartmann A, et al. "An imbalance of human complement regulatory proteins CFHR1, CFHR3 and factor H influences risk for age-related macular degeneration (AMD)". *Hum Mol Genet*. 2010;19(23):4694-4704.
- 76- Abecasis GR, Altshuler D, Auton A, et al. "A map of human genome variation from population-scale sequencing". *Nature*. 2010;467(7319):1061-1073.
- 77- Raychaudhuri S, Iartchouk O, Chin K, et al. "A rare penetrant mutation in CFH confers high risk of age-related macular degeneration". *Nat Genet*. 2011;43(12):1232-1236.
- 78- van de Ven JPH, Nilsson SC, Tan PL, et al. "A functional variant in the CFI gene confers a high risk of age-related macular degeneration". *Nat Genet*. 2013;45(7):813-817.
- 79- Weeks DE, Conley YP, Tsai H-J, et al. "Age-related maculopathy: a genomewide scan with continued evidence of susceptibility loci within the 1q31, 10q26, and 17q25 regions". *Am J Hum Genet*. 2004;75(2):174-189.
- 80- Majewski J, Schultz DW, Weleber RG, et al. "Age-related macular degeneration--a genome scan in extended families". *Am J Hum Genet*. 2003;73(3):540-550.
- 81- Seddon JM, Santangelo SL, Book K, Chong S, Cote J. "A genomewide scan for age-related macular degeneration provides evidence for linkage to several chromosomal regions". *Am J Hum Genet*. 2003;73(4):780-790.
- 82- Fisher SA, Abecasis GR, Yashar BM, et al. "Meta-analysis of genome scans of age-related macular degeneration". *Hum Mol Genet*. 2005;14(15):2257-2264.
- 83- Katta S, Kaur I, Chakrabarti S. "The molecular genetic basis of age-related macular degeneration: an overview". *J Genet*. 2009;88(4):425-449.

- 84- Kanda A, Chen W, Othman M, et al." A variant of mitochondrial protein LOC387715/ARMS2, not HTRA1, is strongly associated with age-related macular degeneration". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(41):16227-16232.
- 85- Jakobsdottir J, Conley YP, Weeks DE, Mah TS, Ferrell RE, Gorin MB. "Susceptibility genes for age-related maculopathy on chromosome 10q26". *Am J Hum Genet*. 2005;77(3):389-407.
- 86- Andreoli MT, Morrison MA, Kim BJ, et al." Comprehensive analysis of complement factor H and LOC387715/ARMS2/HTRA1 variants with respect to phenotype in advanced age-related macular degeneration". *Am J Ophthalmol*. 2009;148(6):869-874.
- 87- Zumbrunn J. Trueb B. "Primary structure of a putative serine protease specific for IGFbinding proteins". *FEBS Lett*.1996;398(2):187–192.
- 88- Zurawa J. Skorko G. "HtrA proteins as targets in therapy of cancer and other diseases". *Expert Opin. Ther. Targets*. 2010;14(7):665-679.
- 89-Turunen, M. et al. "No association between high temperature requirement 1 (HTRA1) gene polymorphisms and Alzheimer's disease". *Neurobiol Aging*. 2011;32(3)547–559.
- 90- Tusuchiya, A. et al. "Expression of mouse HtrA1 serine protease in normal bone and cartilage and its upregulation in joint cartilage damaged by experimental arthritis". *Bone*.2005;37(3):323-336.
- 91- Truebestein, L. "Substrate-induced remodeling of the active site regulates human HTRA1 activity". *Nat. Struct. Mol. Biol*.2011;18(1):386–388.
- 92- Oka, C. "HtrA1 serine protease inhibits signaling mediated by Tgf beta family proteins". *Development*.2004;131(5):1041–1053.
- 93- Murwantoko, YM."Binding of proteins to the PDZ domain regulates proteolytic activity of HtrA1 serine protease". *Biochem*.2004;381(3):895-904.
- 94- Meltzer, M. "Structure, function and regulation of the conserved serine proteases DegP and DegS of Escherichia coli". *Res. Microbiol*.2009;160(1):660-666.
- 95- Wang G, Dubovy SR, Kovach JL, et al. "Variants at chromosome 10q26 locus and the expression of HTRA1 in the retina". *Exp Eye Res*. 2013;112:102-105.
- 96- Chan C-C, Shen D, Zhou M, et al. "Human HtrA1 in the archived eyes with age-related macular degeneration". *Trans Am Ophthalmol Soc*. 2007;105:92-7-8.
- 97- Tuo J, Ross RJ, Reed GF, et al. "The HtrA1 promoter polymorphism, smoking, and age-related macular degeneration in multiple case-control samples". *Ophthalmology*. 2008;115(11):1891-1898.
- 98- Yang Z, Tong Z, Chen Y, et al. Genetic and functional dissection of HTRA1 and LOC387715 in age-related macular degeneration. *PLoS Genet*. 2010;6(2):e1000836.

- 99- Chowers I, Meir T, Lederman M, et al. "Sequence variants in HTRA1 and LOC387715/ARMS2 and phenotype and response to photodynamic therapy in neovascular age-related macular degeneration in populations from Israel". *Mol Vis*. 2008;14:2263-2271.
- 100- Friedrich U, Myers C a., Fritsche LG, et al. "Risk-and non-risk-associated variants at the 10q26 AMD locus influence ARMS2 mRNA expression but exclude pathogenic effects due to protein deficiency". *Hum Mol Genet*. 2011;20(7):1387-1399.
- 101- The r-project. Available: <https://www.r-project.org/>.
- 102- Zetterberg M. "Age-related eye disease and gender". *Maturitas*. 2016;83:19-26.
- 103 - IBGE. Brasil – Sinopse dos Resultados do Censo 2010 [Internet]. Revised edition. Rio de Janeiro: IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; 2010. Available: <http://www.censo2010.ibge.gov.br/sinopse/webservice/default.php?cod1=35&cod2=&cod3=0&frm=piramidehttp>
- 104- Ng TK, Liang XY, Lai TYY, et al. HTRA1 promoter variant differentiates polypoidal choroidal vasculopathy from exudative age-related macular degeneration. 2016;(April 2015):1-9.
- 105- Mori K, Horie-Inoue K, Kohda M, et al. "Association of the HTRA1 gene variant with age-related macular degeneration in the Japanese population". *J Hum Genet*. 2007;52(7):636-641.
- 106- Gibbs D, Yang Z, Constantine R, et al. "Further mapping of 10q26 supports strong association of HTRA1 polymorphisms with age-related macular degeneration". *Vision Res*. 2008;48(5):685-689.
- 107- 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". *Mol Vis*. 2010;16(November 2009):1958-1981.
- 108- Mantel N, Haenszel W. "Statistical aspects of the analysis of data from retrospective studies of disease". *J Natl Cancer Inst*. 1959;22(4):719-748.
- 109- Parmeggiani F, Sorrentino FS, Romano MR, et al. "Mechanism of inflammation in age-related macular degeneration: an up-to-date on genetic landmarks". *Mediators Inflamm*. 2013;2013:435607.
- 110- Schultz DW, Klein ML, Humpert AJ, et al. "Analysis of the ARMD1 locus: evidence that a mutation in HEMICENTIN-1 is associated with age-related macular degeneration in a large family". *Hum Mol Genet*. 2003;12(24):3315-3323.
111. Hirata FE, Vasconcellos JPC de, Medina FM, Rim PHH, Fulco EAM, Melo MB de. Association of *LOC387715/ARMS2* (rs10490924) Gene Polymorphism with Age-Related Macular Degeneration in the Brazilian Population. *Ophthalmic Genet*. 2015;36(3):224-228.
- 112- Seddon, J. M. (2005). "The US Twin Study of Age-Related Macular Degeneration. *Archives of Ophthalmology*", 123(3), 321.

- 113- Chen W, Xu W, Tao Q, et al. "Meta-analysis of the association of the HTRA1 polymorphisms with the risk of age-related macular degeneration". *Exp Eye Res*. 2009;89(3):292-300.
- 114- Askari M, Nikpoor A R, Gorjipour F, Mazidi M, Sanati M H, Aryan H, Mousavizadeh K. "Association of Htra1 gene polymorphisms with the risk of developing AMD in Iranian population". *Reports of Biochemistry & Molecular Biology*. 2015;4(1):43–49.
- 115- Abbas RO, Azzazy HME. "Association of Single Nucleotide Polymorphisms in *CFH*, *ARMS2* and *HTRA1* Genes with Risk of Age-related Macular Degeneration in Egyptian Patients". *Ophthalmic Genetics*. 2015;34(4): 209–216.
- 116- Tian J, Yu W, Qin X, Fang K, et al. "Association of Genetic Polymorphisms and Age-Related Macular Degeneration in Chinese Population". *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2012;53(7):4262.
- 117- IBGE. Brasil - 500 anos de povoamento [Internet]. Revised edition. Rio de Janeiro: IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; 2007. Available: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv6687.pdf>
- 118- Salzano FM, Sans M. "Interethnic admixture and the evolution of Latin American populations". *Genet Mol Biol*. 2014;37: 151–170.
- 119- Leveziel N, Souied EH, Richard F, Barbu V, Zourdani A, Morineau G, Benlian P. "PLEKHA1-LOC387715-HTRA1 polymorphisms and exudative age-related macular degeneration in the French population". *Molecular Vision*. 2007;13: 2153–2159.

ANEXOS

ANEXO I



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

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

PARECER CEP: Nº 919/2007 (Este nº 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 anexo nº1)

II - OBJETIVOS

Avaliar a frequência e os tipos de polimorfismos encontrados nos genes CFH, LOC387715 e HTRA1 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 de 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 sem 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 descontinuar a pesquisa conforme delimitada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.a), exceto quando ocorrer risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos da 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 Bertazzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

ANEXO II

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

💻 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: _____