



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

Jamil Miguel Neto

Análise das variantes rs1410996 (gene *CFH*) e rs2230199 (gene *C3*) em relação ao risco para o desenvolvimento da Degeneração Macular Relacionada à Idade (DMRI) em uma amostra da população brasileira

CAMPINAS

2020

JAMIL MIGUEL NETO

Análise das variantes rs1410996 (gene *CFH*) e rs2230199 (gene *C3*) em relação ao risco para o desenvolvimento da Degeneração Macular Relacionada à Idade (DMRI) em uma amostra da população brasileira

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, Área de Concentração em Oftalmologia.

ORIENTADOR: PROFESSOR DOUTOR JOSE PAULO CABRAL DE VASCONCELLOS

CO-ORIENTADORA: PROFESSORA DOUTORA MÔNICA BARBOSA DE MELO

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO/TESE DEFENDIDA PELO ALUNO JAMIL MIGUEL NETO, E ORIENTADO PELO PROF. DR. JOSE PAULO CABRAL DE VASCONCELLOS.

CAMPINAS

2020

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

M588a Miguel Neto, Jamil, 1988-
Análise das variantes rs1410996 (gene *CFH*) e rs2230199 (gene *C3*) em relação ao risco para o desenvolvimento da degeneração macular relacionada à idade (DMRI) em uma amostra da população brasileira / Jamil Miguel Neto. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Jose Paulo Cabral de Vasconcellos.
Coorientador: Mônica Barbosa de Melo.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Degeneração macular relacionada à idade. 2. Fator H do complemento. 3. Complemento C3. 4. Polimorfismo genético. I. Vasconcellos, Jose Paulo Cabral de, 1963-. II. Melo, Mônica Barbosa de, 1968-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Association of genetics variants of the complement pathway *C3* R102G (rs2230199) and *CFH* (rs1410996) with age-related macular degeneration in a brazilian population

Palavras-chave em inglês:

Age-related macular degeneration

Complement factor H

Complement C3

Polymorphism, Genetic

Área de concentração: Oftalmologia

Titulação: Mestre em Ciências

Banca examinadora:

Jose Paulo Cabral de Vasconcellos [Orientador]

Carmen Silvia Bertuzzo

Mariana Vallim Salles

Data de defesa: 06-11-2020

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-7024-1294>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/6951648848275371>

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO
JAMIL MIGUEL NETO

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSE PAULO CABRAL DE VASCONCELLOS

COORIENTADOR: PROFA. DRA. MÔNICA BARBOSA DE MELO

MEMBROS TITULARES

1. PROF. DR. JOSE PAULO CABRAL DE VASCONCELLOS
2. PROFA. DRA. CARMEN SILVIA BERTUZZO
3. PROFA. DRA. MARIANA VALLIM SALLES

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

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data de Defesa: 06/11/2020

RESUMO

Introdução: A degeneração macular relacionada à idade (DMRI) é uma doença ocular degenerativa multifatorial de caráter progressivo que configura a principal causa de cegueira em maiores de 60 anos em países desenvolvidos. O desenvolvimento da DMRI é determinado pela combinação do envelhecimento, genética e fatores ambientais. Os fatores genéticos são responsáveis por 71% da variação de risco da DMRI avançada, e as variantes genéticas localizadas nos genes do sistema complemento (*CFH*, *C2/CFB*, *C3* e *CFI*) compreendem cerca de 57% das variantes de risco conhecidas, sendo essa a via biológica de maior relevância na patogênese da doença.

Objetivos: O objetivo foi analisar o papel das variantes de base única rs1410996 (gene *CFH*) e rs2230199 (gene *C3*) em relação ao risco para desenvolvimento da DMRI em uma amostra da população brasileira.

Métodos: Novecentos e sessenta e três indivíduos não relacionados foram analisados, sendo 484 com DMRI (grupo caso) e 479 sem a doença (grupo controle). No grupo caso, os pacientes foram ainda estratificados de acordo com a forma de apresentação, em DMRI seca e úmida; e quanto a gravidade, em DMRI não avançada e avançada. Os polimorfismos do gene *CFH* rs1410996 e do gene *C3* rs2230199 foram avaliados por meio da reação em cadeia polimerase e sequenciamento direto. Estimativas de associações foram realizadas por meio de modelos de regressão logística ajustados para idade.

Resultados: A análise da variante rs1410996 foi constituída por uma amostra de 353 casos e 413 controles. Na avaliação genotípica, a comparação entre casos e controles demonstrou efeito de risco do genótipo GG ao ser comparado ao AA (OR 1,819; IC95% 1,172-2,838; p-valor 0,007). Observou-se significância estatística ao comparar os genótipos GG versus AA na análise de subgrupos DMRI forma úmida x controles (OR 2,169; IC95 1,290-3,712; p-valor 0,003) e DMRI avançada x controles (OR 2,123; IC95 1,286-3,555; p-valor 0,003). Na avaliação por alelos, ao comparar a frequência alélica entre casos e controles, foi observado que o alelo G foi significativamente mais frequente nos casos (OR 1,404; IC95% 1,131-1,174; p-valor 0,0021). Na avaliação da variante rs2230199, o espaço amostral foi: 324 casos e 377 controles. O genótipo heterozigoto CG (OR 2,010; IC95% 1,393-2,914; p-valor 0,0002) conferiu um maior risco à manifestação do fenótipo da DMRI que o GG (OR 2,116; IC95% 1,0286-4,5236; p-valor 0,045) quando comparado ao genótipo em homozigose com o alelo selvagem (CC) ao avaliarmos casos x controles. A avaliação alélica G vs. C confirmou um risco aumentado de manifestação das formas úmida (OR 1,954; p-valor $2,30 \times 10^{-5}$) avançada (OR 1,718; p-valor 0,0001) da DMRI em comparação aos controles.

Conclusões: Conclui-se que as variantes genéticas rs1410996 (gene *CFH*) e rs2230199 (gene *C3*) conferem risco ao desenvolvimento da DMRI nessa amostra da população brasileira, particularmente na forma úmida/exsudativa da doença.

Palavras-chave: Degeneração macular relacionada a idade; Fator H do Complemento; Complemento C3; Polimorfismo genético.

ABSTRACT

Introduction: Age-related macular degeneration (AMD) is a progressive, multifactorial and degenerative retinal disorder and the leading cause of blindness in the elderly in Western World. The development of AMD is determined by the combination of aging, genetics and environmental factors. The genetic factors are responsible for 71% of the risk variation of advanced AMD. Common risk variants near the complement genes (*CFH*, *C2/CFB*, *C3* and *CFI*) account for near 57% of the contribution of known risk variants to disease, emphasizing the critical role of the complement pathway in AMD pathogenesis.

Purpose: The study aimed to assess the association between genetic variants of the complement pathway *C3* R102G (rs2230199) and *CFH* (rs1410996) with AMD in a sample of the Brazilian population.

Methods: Nine hundred and sixty-three unrelated individuals were analyzed, 484 with AMD (case group) and 479 without the disease (control group). In the case group, patients were further stratified according to the form of presentation, in dry and wet AMD; and as for severity, in non-advanced and advanced AMD. The polymorphisms of the *CFH* gene rs1410996 and the *C3* gene rs2230199 were evaluated through polymerase chain reaction and direct sequencing. The associations between SNPs and AMD, adjusted by age, were assessed by using logistic regression models.

Results: The analysis of the rs1410996 variant consisted of a sample of 353 cases and 413 controls. In the evaluation of genotypes, the comparison between cases and controls demonstrated a risk effect of the GG genotype when compared to AA (OR 1.819; 95% CI 1.172-2.838; p-value 0.007). Statistical significance was observed when comparing the GG versus AA genotypes in the subgroup analysis of wet AMD versus controls (OR 2,169; IC95 1,290-3,712; p-value 0,003) and advanced AMD vs. controls (OR 2,123; IC95 1,286-3,555; p -value 0.003). In the evaluation by alleles, when comparing the allele frequency between cases and controls, it was observed that the G allele was significantly more frequent in the cases (OR 1.404; 95% CI 1.131-1.174; p-value 0.0021). In the evaluation of the rs2230199 variant, the sample space was: 324 cases and 377 controls. The heterozygous genotype CG (OR 2.010; 95% CI 1.393-2.914; p-value 0.0002) conferred a greater risk for the manifestation of the AMD phenotype than the GG (OR 2.116; 95% CI 1.0286-4.5236; p-value 0.045) when compared to the genotype CC, while evaluating cases x controls. The allele evaluation G vs. C confirmed an increased risk of advanced (OR 1.954; p-value $2,30e^{-05}$) and wet (OR 1.718; p-value 0.0001) AMD forms compared to controls.

Conclusions: Our study confirmed the risk association between rs2230199 and rs1410996 variants and AMD, particularly in the wet/exudative form of the disease in this sample of the Brazilian population.

Keywords: Age-related macular degeneration; Complement factor H; Complement component 3; Genetic polymorphism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esperança de vida ao nascer nos sexos masculino e feminino, anos 2000, 2013 e 2060.....	16
Figura 2: Projeção da população por sexo e idade para o Brasil, anos 2013, 2040 e 2060.....	17
Figura 3: Drusas: depósitos lipoprotéicos branco-amarelados entre a Membrana Basal do EPR e a Membrana de Bruch.....	18
Figura 4: Olho Esquerdo: Atrofia geográfica observada à retinografia colorida (A); monocromática (B); angiofluoresceinografia (C); tomografia de coerência óptica (D)	19
Figura 5: Membrana Neovascular do tipo I ou Oculta (a); Membrana Neovascular do tipo II ou clássica (b)	19
Figura 6: Curva de prevalência da DMRI nas diferentes faixas etárias de acordo com a Etnia	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Escala de gravidade da DMRI segundo o <i>AREDS</i>	20
Tabela 2. Níveis clínicos de gravidade da DMRI segundo o <i>CARMS</i>	21
Tabela 3. Estimativa do espaço amostral para o rs2230199, considerando as diferentes margens de erro.....	33
Tabela 4. Distribuição por sexo e idade entre os grupos caso e controle.....	43
Tabela 5. Distribuição genotípica para a variante rs1410996 nos grupos caso e controle.....	44
Tabela 6. Comparação de genótipos para a variante rs1410996 entre casos e controles, por meio de regressão logística ajustada pela idade.....	45
Tabela 7. Distribuição dos genótipos para a variante rs1410996 nos grupos de estratificação quanto à gravidade e formas de apresentação da DMRI.....	45
Tabela 8. Comparação de genótipos para a variante rs1410996 após a estratificação dos pacientes com DMRI nas formas não avançada e avançada da doença, por meio de regressão logística ajustada para idade	46
Tabela 9. Comparação de genótipos para a variante rs1410996 após a estratificação dos pacientes com DMRI nas formas seca e úmida da doença, por meio de regressão logística ajustada para idade.....	47
Tabela 10. Distribuição dos alelos G e A da variante rs1410996 nos grupos e subgrupos de pacientes estudados.....	48
Tabela 11. Comparação das frequências alélicas da variante rs1410996 entre os diferentes grupos avaliados, utilizando-se o teste de qui-quadrado.....	49
Tabela 12. Distribuição Genotípica para a variante rs2230199 nos grupos casos e controles.....	50
Tabela 13. Comparação de genótipos para a variante rs2230199 entre os casos e controles, por meio de regressão logística ajustada pela idade.....	50
Tabela 14. Distribuição dos genótipos para a variante rs2230199 nos grupos de estratificação quanto à gravidade e formas de apresentação da DMRI.....	51
Tabela 15. Comparação de genótipos para a variante rs2230199 após a estratificação dos pacientes com DMRI nas formas não avançada e avançada da doença, por meio de regressão logística ajustada para idade.....	52

Tabela 16. Comparação de genótipos para a variante rs2230199 após a estratificação dos pacientes com DMRI nas formas seca e úmida da doença, por meio de regressão logística ajustada para idade.....	53
Tabela 17. Distribuição dos alelos G e C da variante rs2230199 nos grupos e subgrupos de pacientes estudados.....	54
Tabela 18. Comparação das frequências alélicas da variante rs2230199 entre os diferentes grupos avaliados, utilizando-se o teste de qui-quadrado.....	55
Tabela 19. Análise comparativa da variante rs1410996 entre casos e controles em subgrupos étnicos ⁸² na comparação alélica.....	57
Tabela 20. Análise comparativa da variante rs1410996 entre casos e controles em uma amostra da população brasileira e asiática ⁸³ na comparação alélica e dos genótipos GG x AA.....	58
Tabela 21. Análise comparativa da variante rs1410996 entre casos com DMRI exsudativa e controles em uma amostra da população brasileira e asiática ⁸³ nas comparações entre alelos (G x A) e genótipos em homozigose (GG x AA)	58
Tabela 22. Análise comparativa da variante rs2230199 entre casos e controles em uma amostra da população brasileira e na metanálise de Zhang na população geral, em caucasianos e asiáticos na comparação alélica.....	62
Tabela 23. Análise comparativa da variante rs2230199 entre casos com DMRI avançada e controles em uma amostra da população brasileira e na metanálise de Zhang, 2018, na população geral, em caucasianos, subgrupo Oriente Médio e asiáticos nas comparações alélica e genotípica em homozigose.....	63

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Causas de deficiência visual global em todas as faixas etárias (cegueira e visão subnormal).....	17
Gráfico 2: Estimativa do espaço amostral para o rs2230199 de acordo com a margem de erro em porcentagem (eixo X); N em cada grupo (eixo Y) para um intervalo de confiança de 95%.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADAMTS9	<i>ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 9</i>
AG	Atrofia geográfica
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
APOE	Apolipoproteína E
AREDS	<i>Age-Related Eye Disease Study</i>
ARMS2	<i>Age-related maculopathy susceptibility 2</i>
B3GALTL	<i>Beta 3-glucosyltransferase</i>
BAIAP2L2	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2
BMES	Blue Mountains Eye Study
C2	<i>Complement factor 2</i>
C3	<i>Complement factor 3</i>
C4	<i>Complement factor 4</i>
C9	<i>Complement factor 9</i>
CARMS	<i>Clinical Age-related Maculopathy Staging System</i>
CBMEG	Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética
CD46	<i>CD46 complement regulatory protein</i>
CD59	<i>CD59 glycoprotein</i>
CETP	<i>Cholesteryl ester transfer protein</i>
CFB	<i>Complement factor B</i>
CFD	<i>Complement factor D</i>
CFH	<i>Complement factor H</i>
CFI	<i>Complement factor I</i>
COL10A1	<i>Collagen tipo X, Alpha 1</i>
COL8A1	<i>Collagen Type VIII, Alpha 1</i>
DEP	Descolamento do epitélio pigmentar
DMRI	Degeneração macular relacionada a idade
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DR	Descolamento da retina
EPR	Epitélio pigmentar da retina
GWAS	Genome-Wide Association Study
HDL	<i>High-density lipoprotein</i>
HTRA1	<i>High-temperature requirement A serine peptidase 1</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IL-6	Interleucina-6
LIPC	<i>Lipase hepatic</i>

MAC	Complexo de ataque à membrana
MB	Membrana de Bruch
MNVS	Membrana neovascular subretiniana
NHANES	National Health and Nutrition Examination Survey
NVC	Neovascularização de coróide
OR	Odds ratio
PCR	Reação em cadeia polimerase
RAD51B	<i>RAD51Paralog B</i>
RR	Risco Relativo
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGFBR1	<i>Transforming Growth Factor Beta Receptor 1</i>
TIMP3	<i>TIMP Metallopeptidase Inhibitor 3</i>
TNFRSF10A	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, Member 10A</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VEGFA	<i>Vascular endothelial growth factor A</i>

SUMÁRIO

1. Introdução.....	15
1.1 Degeneração Macular Relacionada a Idade.....	15
1.2 Epidemiologia Relacionada à DMRI.....	15
1.3 Classificação da DMRI.....	18
1.4 Fisiopatologia da DMRI.....	22
1.5 DMRI e fatores de Risco.....	23
1.5.1 Idade.....	23
1.5.2 Gênero.....	24
1.5.3 Grupo Étnico.....	24
1.5.4 Tabagismo.....	25
1.5.5 Exposição à Radiação Ultravioleta.....	26
1.5.6 Dieta e Obesidade.....	26
1.5.7 Doenças Cardiovasculares.....	26
1.6 Genética e DMRI.....	27
1.7 Justificativa.....	31
2. Objetivos.....	32
2.1 Objetivos gerais.....	32
2.2 Objetivos específicos.....	32
3. Materiais e Métodos.....	33
3.1 Casuística.....	33
3.2 Definição e classificação da DMRI.....	35
3.3 Seleção dos Pacientes.....	36
3.3.1 Grupo Estudo/ Caso – DMRI.....	36
3.3.1.1 Critérios de inclusão – DMRI.....	36
3.3.1.2 Critérios de exclusão – DMRI.....	36
3.3.2 Grupo controle.....	36
3.3.2.1 Critério de inclusão.....	36
3.3.2.2 Critérios de exclusão.....	36
3.4 Aspectos éticos.....	37
3.4.1 Entrevista e obtenção de dados clínicos e oftalmológicos.....	37
3.4.2 Avaliação oftalmológica.....	38
3.5 Métodos.....	39

3.5.1 Extração de DNA	39
3.5.2 Avaliação das variantes	39
3.5.2.1 Avaliação da variante rs1410996	39
3.5.2.1.1 PCR.....	39
3.5.2.1.2 Sequenciamento por Sanger.....	40
3.5.2.2 Avaliação da variante rs2230199.....	41
3.5.2.2.1 PCR	41
3.5.2.2.2 Sequenciamento por Sanger.....	41
3.6 Análise estatística.....	42
4. Resultados.....	43
4.1 Análise estatística descritiva.....	43
4.2 Análise da variante rs1410996 (gene <i>CFH</i>).....	44
4.2.1 Avaliação por genótipo.....	44
4.2.3 Avaliação por alelo.....	48
4.3 Análise da variante rs2230199 (gene <i>C3</i>)	50
4.3.1 Avaliação por Genótipo.....	50
4.3.3 Avaliação por alelo.....	54
5. Discussão.....	56
5.1 Variante rs1410996 (gene <i>CFH</i>)	57
5.1 Variante rs2230199 (gene <i>C3</i>)	60
6. Conclusão.....	65
7. Referências bibliográficas.....	66
8. Anexos.....	76
8.1 Anexo 1: Parecer Consubstanciado do CEP.....	76
8.2 Anexo 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	85
8.3 Anexo 3: Submissão de Artigo.....	89

1. INTRODUÇÃO

1.1- Degeneração Macular Relacionada à Idade

A degeneração macular relacionada à idade (DMRI) é uma doença ocular degenerativa multifatorial de caráter progressivo que configura a principal causa de cegueira em maiores de 60 anos em países desenvolvidos.¹ A doença manifesta-se devido à perda de fotorreceptores (cones e bastonetes), secundária à disfunção e atrofia do epitélio pigmentar da retina (EPR), na mácula (região central da retina), levando à perda irreversível da visão central.^{2,3}

Com o envelhecimento da população, em virtude do aumento da expectativa de vida, a DMRI passa a ser considerada um problema de saúde em crescimento, e ganha maior relevância em âmbito mundial.¹ A etiologia da DMRI é multifatorial, apresentando como principais fatores de risco: idade avançada e história familiar.^{4,5}

A DMRI pode manifestar-se de duas formas: não exsudativa ou seca e exsudativa ou neovascular.⁶ A forma seca apresenta-se como uma lesão progressiva do EPR, membrana de Bruch (MB) e coriocapilares, levando à atrofia secundária dos fotorreceptores.⁷ Já a forma exsudativa caracteriza-se pelo surgimento de uma membrana neovascular subretiniana (MNVSR) com extravasamento de soro e/ou sangue nas camadas retinianas externas, com consequente perda de fotorreceptores e queda abrupta da visão.⁸

1.2- Epidemiologia relacionada à DMRI

Uma revisão sistemática recente mostrou que a DMRI é responsável por 8,7% da cegueira global. Estima-se que 196 milhões de pessoas em 2020 apresentarão a doença, atingindo 288 milhões em 2040.⁹ Nos Estados Unidos, cerca de 1,75 milhões eram afetados pela DMRI avançada (atrofia geográfica ou forma neovascular) em 2004, estimando-se aproximadamente 3 milhões em 2020¹⁰ e 3,8 milhões em 2050,¹¹ enquanto a estimativa de pacientes com visão subnormal ou cegueira saltará de 620 mil, em 2010, para 1,6 milhões, em 2050, caso nenhum tratamento seja realizado.¹¹

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) de 2006,¹² 20 milhões de brasileiros estão na faixa etária de mais de 65 anos e

aproximadamente 14% deles apresentam DMRI (cerca de 2,8 milhões de pessoas), dos quais entre 10 e 15% (280 a 420 mil indivíduos) com a forma neovascular da doença.

A expectativa de vida, segundo dados do IBGE-2019,¹³ aumentará em mais de dez anos, em ambos os sexos, comparada ao ano 2000, quando a esperança de vida para o sexo feminino era de 73,9 anos e para o masculino de 66,0 anos. Projeta-se no ano de 2060 uma expectativa de vida de 84,4 anos para mulheres e 78 anos para homens (Figura 1).¹³

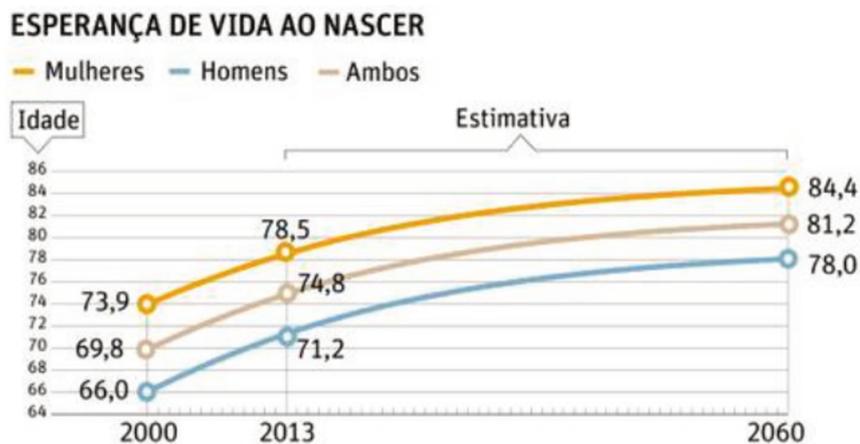


Figura 1: Esperança de vida ao nascer nos sexos masculino e feminino, anos 2000, 2013 e 2060, segundo dados do IBGE-2019.¹³

Como consequência do aumento da expectativa de vida e redução das taxas de natalidade, a pirâmide etária brasileira vem apresentando uma alteração em seu formato, com estreitamento de sua base e espessamento do ápice, apresentando uma maior similaridade com as pirâmides de países desenvolvidos (Figura 2). Espera-se que pessoas com mais de 65 anos de idade constituam mais de 25% da população brasileira, segundo projeção do IBGE para o ano de 2060.¹³

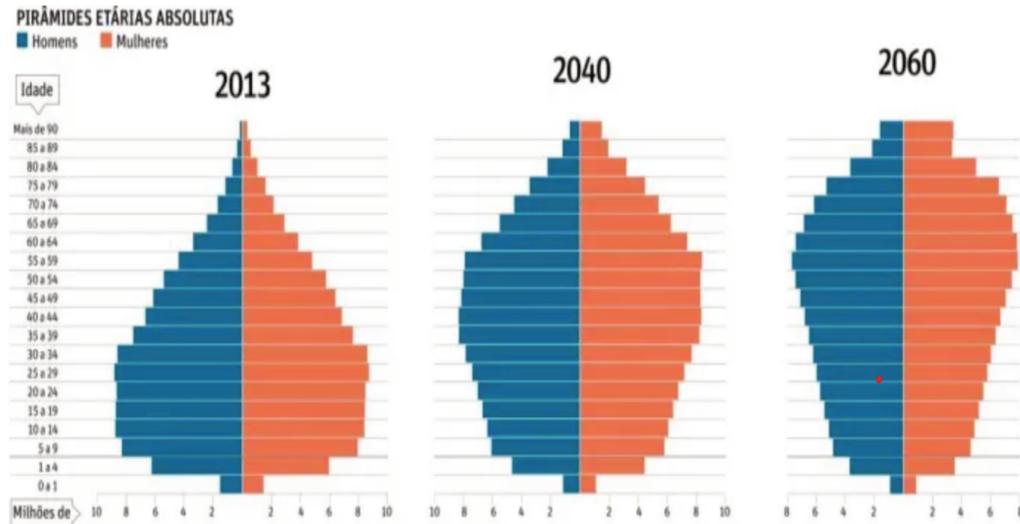


Figura 2: Projeção da população por sexo e idade para o Brasil, anos 2013, 2040 e 2060, segundo dados do IBGE-2019.¹³

Segundo dados da Agência Internacional para Prevenção da Cegueira (*IAPB*), a DMRI configura como a quarta principal causa de cegueira no mundo (*Gráfico 1*) e no Brasil e a principal causa de cegueira irreversível. As duas principais causas são reversíveis e constituem os erros refracionais e a catarata. A *IAPB* estimou que no ano de 2020, a DMRI será responsável por aproximadamente 4% dos casos de cegueira e visão subnormal.¹⁴

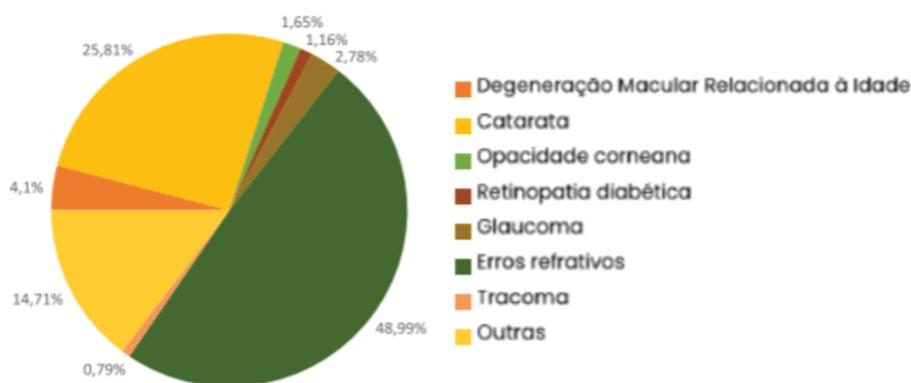


Gráfico 1: Causas de deficiência visual global em todas as faixas etárias (cegueira e visão subnormal).¹⁴

A DMRI é responsável por uma queda drástica na qualidade de vida dos pacientes, carreando consigo impactos socioeconômicos. Portadores de DMRI, em

sua fase avançada, apresentam uma qualidade de vida similar ou pior a portadores de doenças crônicas (como o câncer e a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida – AIDS),¹⁵ além de estarem sujeitos a limitações funcionais e aumento do risco de quedas¹⁶ e apresentarem danos cognitivos associados como demências e doença de Alzheimer.¹⁷

1.3- Classificação da DMRI

A DMRI foi inicialmente classificada por um grupo de estudos denominado *AREDS* (Age-Related Eye Disease Study), em 1995, em DMRI seca ou não neovascular e DMRI exsudativa ou neovascular. A DMRI seca é caracterizada pela presença de drusas, sinal mais clássico desta forma, que consistem em debris acelulares branco-amarelados entre a Membrana Basal do Epitélio Pigmentar da Retina (EPR) e a Membrana de Bruch (MB) (Figura 3); alterações pigmentares em nível de EPR como hipopigmentação (associada a drusas ou devido à perda de células do EPR e seu pigmento) e hiperpigmentação (caracterizada pela proliferação ou migração de células do EPR e acúmulo de melanina) e atrofia geográfica, fase mais avançada da forma seca, caracterizada pela morte das células do EPR e atrofia dos fotorreceptores adjacentes (Figura 4).¹⁸

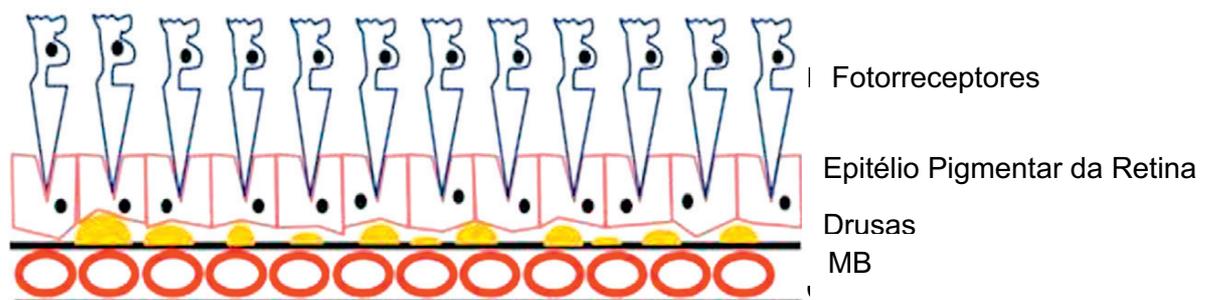


Figura 3: Drusas: depósitos lipoprotéicos branco-amarelados entre a Membrana Basal do EPR e a Membrana de Bruch.¹⁹

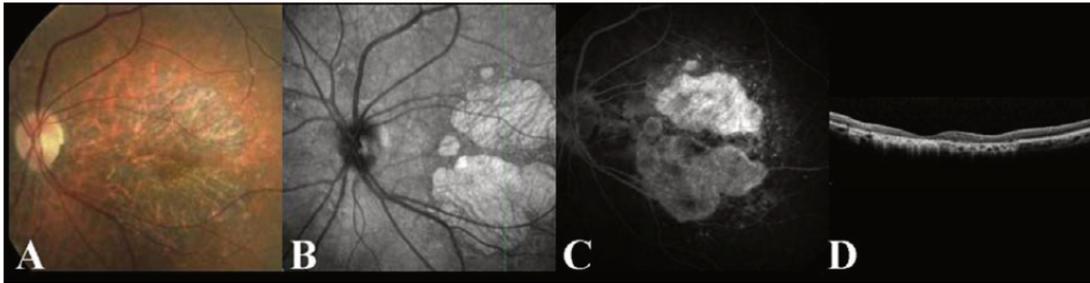


Figura 4: Olho Esquerdo: Atrofia geográfica observada à retinografia colorida (A); monocromática (B); angiofluoresceinografia (C); tomografia de coerência óptica (D).¹⁸

A forma exsudativa caracteriza-se pela neovascularização da coroide, a partir do crescimento anormal de neovasos provenientes da coriocapilar. Pode ocorrer a formação de dois tipos de membrana neovascular, a do tipo I ou oculta, na qual os neovasos se localizam-se entre o EPR e a MB, e a do tipo II ou clássica, na qual os neovasos rompem o EPR, ficando logo acima dessa camada e em contato direto com a retina neurosensorial (Figura 5). Como consequência há uma queda abrupta da visão, na região central (escotomas centrais ou paracentrais).¹⁸

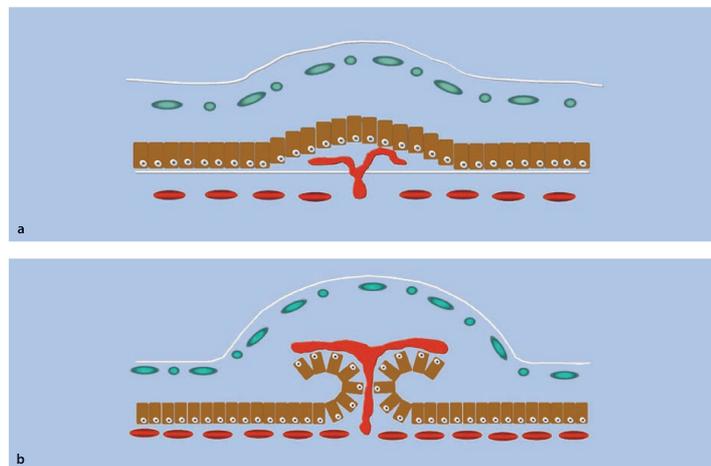


Figura 5: Membrana Neovascular do tipo I ou Oculta (a)
Membrana Neovascular do tipo II ou Clássica (b)¹⁸

A forma seca e mais prevalente (80-90% dos casos de DMRI) responsabiliza-se por 20% dos casos de perda visual grave, já a forma exsudativa, menos frequente (10-20% dos casos de DMRI), é responsável por 80% dos casos de redução grave da acuidade visual.²⁰

Posteriormente, o *AREDS* classificou a DMRI em precoce, intermediária e avançada.²¹ A DMRI precoce é caracterizada pela presença de múltiplas drusas pequenas (menores ou iguais a 63 micra) ou uma média (>63 e ≤125 micra) ou alterações pigmentares da mácula. O estágio intermediário compreende os casos de múltiplas drusas médias ou pelo menos uma drusa grande (maior que 125 micra) ou atrofia geográfica poupando a região foveal. A DMRI avançada, por sua vez, engloba a forma neovascular (DMRI exsudativa ou úmida) e a atrofia geográfica (AG) na área foveal (DMRI não exsudativa ou seca) (**Tabela 1**).^{21, 22}

Tabela 1. Escala de gravidade da DMRI segundo o *AREDS*²²

Grau de Maculopatia	Quadro Clínico
1 (Sem DMRI)	Mácula sem alterações
2 (DMRI Precoce)	Drusas pequenas (< 63 micra), uma única drusa intermediária (63-125 micra) e/ou alterações pigmentares
3 (DMRI Intermediária)	Múltiplas drusas intermediárias, pelo menos uma drusa grande (>125 micra), e/ou atrofia geográfica que não envolve o centro da mácula
4 (DMRI Avançada)	Atrofia geográfica envolvendo o centro da mácula e/ou neovascularização de coroide

DMRI: Degeneração Macular Relacionada à Idade

De acordo com a classificação do *Clinical Age-Related Maculopathy Staging System (CARMS)*²³ a DMRI é dividida em cinco níveis clínicos baseados em retinografia e avaliação clínica (Tabela 2). O estágio 1 corresponde à ausência de drusas ou presença de até 10 drusas pequenas não associadas a alterações pigmentares; o estágio 2 apresenta mais que 10 drusas pequenas ou menos que 15 drusas médias ou alterações pigmentares ou a associação de drusas a alterações pigmentares; no estágio 3 há mais do que 15 drusas médias ou pelo menos uma drusa grande associada ou não ao descolamento do epitélio pigmentar da retina (DEP)

drusenóide; no estágio 4 há atrofia geográfica maior que 350 micra podendo envolver o centro da mácula; e o estágio 5 caracteriza-se pelas formas ativas da DMRI exsudativa (membrana neovascular subretiniana – MNVSR) ou Descolamento da Retina (DR) seroso/ hemorrágico ou formas cicatriciais (**Tabela 2**).

Tabela 2. Níveis clínicos de gravidade da DMRI segundo o *CARMS*²³

Grau de Maculopatia	Quadro Clínico
1 (Sem DMRI)	Ausência de drusas ou até 10 drusas pequenas sem alteração pigmentar
2	2A: drusas (mais de 10 drusas pequenas ou menos de 15 drusas intermediárias) 2B: alteração pigmentar (hipo ou hiperpigmentação) 2C: drusas e alterações pigmentares
3	15 ou mais drusas intermediárias ou qualquer drusa extensa/ grande 3A: sem DEP drusenóide 3B: com DEP drusenóide
4	Atrofia geográfica maior que 350 micra de diâmetro
5	DMRI exsudativa incluído DEP drusenóide; DR seroso ou hemorrágico; cicatriz disciforme 5A: DEP seroso sem MNVSR 5B: MNVSR ou Cicatriz disciforme

DMRI: Degeneração Macular Relacionada à idade; DEP: Descolamento do epitélio pigmentar da retina; DR: descolamento de retina; MNVSR: Membrana neovascular subretiniana.

1.4- Fisiopatologia da DMRI

A patogênese da DMRI ainda não é totalmente compreendida, porém achados de novos estudos têm expandido o conhecimento e auxiliado no entendimento de mecanismos e vias da doença. Acredita-se que a DMRI apresente uma natureza multifatorial e seja resultado da interação entre complexos metabólicos, funcionais, genéticos e ambientais.²⁴

Com o envelhecimento, ocorre a redução do número e distribuição dos fotorreceptores, além de alterações degenerativas na coriocapilar.³ Portanto, os debris celulares, associados à degradação do segmento externo de fotorreceptores contendo lipofuscina acumulam nas células do EPR, que em condições normais seriam eliminadas através dos coriocapilares. Somado a isso, uma progressiva disfunção do EPR altera a permeabilidade da MB, com acúmulo desse material glicoproteico e lipídico (drusas) entre as duas camadas (EPR e MB).²⁵ Como consequência, um espessamento das camadas de colágeno da MB com posterior calcificação é observado, resultado da degeneração da elastina e colágeno no interior da membrana.

O dano fotoquímico associado ao estresse oxidativo e a fagocitose deficiente do segmento externo de fotorreceptores induzem a secreção de fatores pró-inflamatórios como o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), que promove o crescimento anormal de vasos coroidais abaixo do EPR e da retina. Esses vasos anormais apresentam aumento da permeabilidade vascular com subsequente extravasamento de líquido subretiniano e risco de sangramento, podendo resultar em perdas abruptas da visão.²⁶ O VEGF, nas suas isoformas 121, 165 e 189, desempenha um papel fundamental na formação de vasos anormais e no aumento da permeabilidade vascular em diversas condições patológicas.²⁷ Evidências clínicas sugerem que os vasos da coroide são especialmente sensíveis aos efeitos do VEGF.²⁸

A progressão da DMRI ocorre, em parte, devido a um estado inflamatório sustentado por atividade exacerbada da via alternativa do complemento, sendo regulada por fatores pró-inflamatórios como a proteína do complemento 3 (C3) e as proteases séricas fator B (FB) e fator D (FD) e anti-inflamatórios como o fator H do complemento (CFH), que é o principal inibidor da via alternativa do complemento, agindo como um regulador negativo desse complexo enzimático.²⁹

Foram demonstrados níveis plasmáticos aumentados de C3, FB e FD e níveis reduzidos de CFH em pacientes com DMRI, quando comparados casos e controles.³⁰ Observou-se também que a ativação aumentada da via alternativa do complemento no vítreo está relacionada a variantes genéticas do gene que codifica o CFH.³¹ Estudos recentes em ratos, mostram que a inibição na via alternativa do complemento acelera o processo de regressão da membrana neovascular na DMRI exsudativa.^{32,33} Outro estudo, financiado pelo *Gyroscope Therapeutics*, uma empresa que desenvolve terapias geneticamente definidas para doenças da retina, já se utiliza da terapia gênica para acalmar a hiperatividade do sistema complemento em pacientes com atrofia geográfica, tendo iniciado fase de teste em humanos para avaliar a segurança e uma possível redução na velocidade de degeneração dos fotorreceptores.

O CFH é um componente do sistema imunológico que possui uma ação imunomoduladora sobre a resposta inflamatória. Tal ação ocorre através da regulação do sistema complemento, que 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 da enzima C3 convertase e subsequente ativação da resposta imune. O resultado final da ativação destas vias é a lise celular através da formação de 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 coroide de pacientes com DMRI.³⁴

1.5- DMRI e fatores de Risco

1.5.1 - Idade

O principal fator de risco demográfico para o desenvolvimento da DMRI é a idade, havendo um aumento progressivo da prevalência nas faixas etárias mais avançadas.³⁵ A patologia pode estar presente a partir dos 50 anos de idade, porém apresenta baixa prevalência. O risco de desenvolvimento da DMRI em idade superior a 75 anos é três vezes maior quando comparado a pacientes na faixa etária de 65 a 74 anos de idade. A DMRI é encontrada em 30% da população com mais de 85 anos.³⁶ O *Blue Mountains Eye Study* (BMES) mostrou que a fase terminal da DMRI estava

presente em 1,9% da população caucasiana da Austrália. A prevalência na faixa etária menor que 55 anos foi praticamente nula, ao passo que na população com idade superior a 85 anos foi de 18,5%.³⁷ Uma pesquisa realizada pelo *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES) evidenciou uma prevalência de 6,5% (7,2 milhões) de DMRI em qualquer estágio em americanos não institucionalizados maiores que 40 anos.³⁸ No Brasil não há dados referentes a incidência de DMRI nas diferentes faixas etárias.

1.5.2 - Gênero

O gênero é um fator de risco conflitante, no entanto, os principais estudos populacionais (*Beaver Dam, Blue Mountains, Rotterdam*)^{36,37,39} realizados em 3 continentes, Europa, América do Norte e Oceania, corroboram com a hipótese da doença ser mais prevalente em pacientes do sexo feminino em todas as faixas etárias, principalmente nas faixas etárias mais avançadas e nas formas mais graves. Acredita-se que tal diferença de prevalência esteja relacionada com a maior expectativa de vida e maior número de mulheres em faixas etárias mais elevadas. Aventa-se ainda, a hipótese de que existam variantes de risco relacionados ao sexo feminino.⁴⁰

1.5.3 - Grupo Étnico

A etnia configura-se como um fator de risco significativo no desenvolvimento da DMRI. Estudos prévios revelam que indivíduos brancos apresentam uma maior probabilidade de apresentar a DMRI, principalmente sua forma neovascular, quando comparados a negros.^{41,42} Segundo o *Baltimore Eye Study*, os brancos apresentam uma probabilidade aproximada quatro vezes maior de manifestar a DMRI em relação aos negros, essencialmente na forma tardia da doença.⁴²

A prevalência da DMRI, tanto na fase precoce quanto tardia, aumenta com a idade em todos os grupos étnicos. A prevalência da DMRI é maior em pacientes com ancestralidade europeia, seguida da hispânica em todas as faixas etárias quando comparada às etnias asiática e africana. Observa-se um aumento exponencial da prevalência na fase tardia em europeus, tendência similar em outros grupos étnicos, porém com menor intensidade (Figura 6).⁹

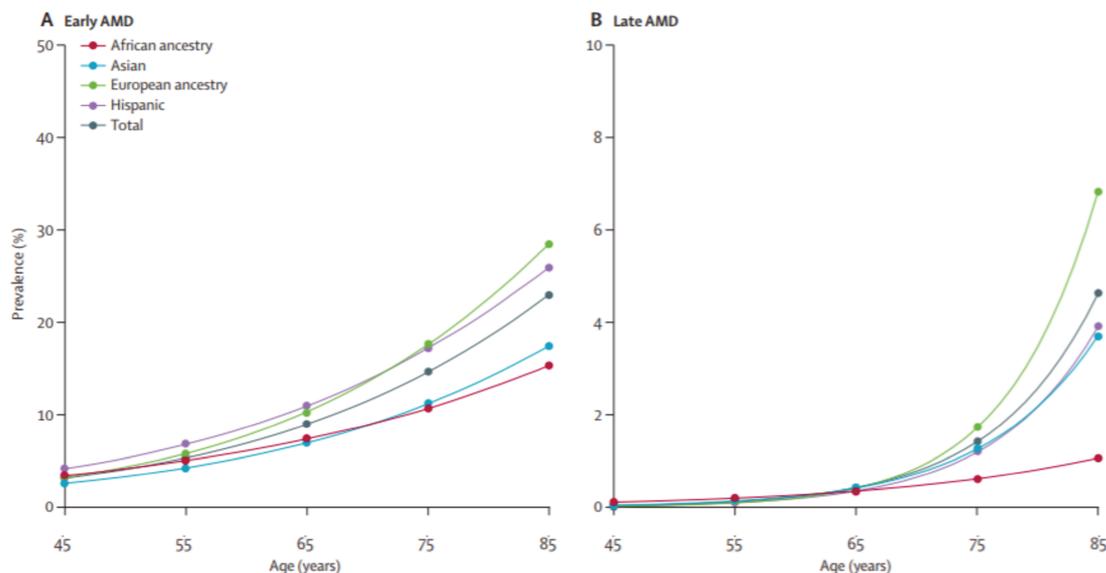


Figura 6: Curva de prevalência da DMRI nas diferentes faixas etárias de acordo com a Etnia⁹

1.5.4 - Tabagismo

O tabagismo é único fator de risco evitável, relevante e independente. Esse fator está associado às formas seca e exsudativa da doença, sendo mais forte a correlação entre o tabagismo e a DMRI exsudativa.⁴³ É responsável pelo aumento de manifestação da doença em 2 a 3 vezes em qualquer faixa etária⁴⁴, além de antecipar a manifestação da mesma em aproximadamente 10 anos.⁵

Em 1996, uma coorte prospectiva indicou que mulheres que fumavam 25 ou mais cigarros por dia apresentavam um risco relativo (RR) de 2,4, enquanto mulheres ex-fumantes apresentavam um RR de 2,0 para o desenvolvimento de DMRI comparadas às mulheres não fumantes. O estudo demonstrou uma relação entre a incidência da doença e a quantidade de maços fumados, sendo que o risco permanece elevado por anos após cessar o hábito.⁴⁵ Outros estudos corroboram com o risco aumentado de DMRI entre fumantes.^{46,47,48,49} O mecanismo fisiopatológico envolve a redução no fluxo sanguíneo no olho, reduzindo os níveis de lipoproteínas de alta densidade (HDL), aumentando a agregação plaquetária e níveis de fibrinogênio e de citocinas inflamatórias, gerando estresse oxidativo e inflamação.⁴⁵

1.5.5 - Exposição à Radiação Ultravioleta

A exposição à luz solar é considerada um fator de risco conflitante na literatura. No entanto, em meta-análise recente (2018) não houve associação estatisticamente significativa entre a DMRI, as suas formas, as latitudes e a exposição à radiação ultravioleta (Razão de Chances Odds Ratio – (OR) - 1,1 com intervalo de confiança 95% 0,96-1,23%).⁵⁰

1.5.6 - Dieta e Obesidade

Dieta rica em gordura e obesidade são fatores de risco para desenvolvimento e progressão da DMRI.^{51,52} Acredita-se que fatores nutricionais e comportamentais estão relacionados à suscetibilidade à DMRI, desde que haja uma determinação genética.⁵³ A literatura atual defende que somente a suplementação preconizada pelo AREDS e AREDS 2, com a combinação de antioxidantes (luteína e zeaxantina) e zinco, constitui a única evidência dietética comprovada para redução do risco para progressão para as formas tardias da DMRI, consistindo em um método preventivo e não terapêutico.^{54, 55}

1.5.7 - Doenças Cardiovasculares

A hipertensão arterial vem sendo aventada como um possível fator de risco para o desenvolvimento da DMRI. Alguns estudos afirmam haver uma associação entre DMRI e hipertensão arterial, estando a mesma controlada ou não. A associação pode ser fraca⁵⁶ ou forte, aumentando em até três vezes a probabilidade de desenvolvimento da doença.⁵⁷ O grupo AREDS já reportou que a presença de drusas grandes ou múltiplas drusas intermediárias em pacientes com DMRI estava associada à hipertensão arterial.⁴⁶ Outros estudos, no entanto, afirmam não haver relação entre doenças cardiovasculares (hipertensão, dislipidemia e infarto agudo do miocárdio) e o aumento do risco de desenvolver a DMRI.^{5,58} Mais estudos e pesquisas devem ser realizados a fim de esclarecer se doenças cardiovasculares estão associadas a um risco aumentado para a DMRI.

1.6- Genética e DMRI

O desenvolvimento da DMRI é determinado pela combinação do envelhecimento, genética e fatores ambientais.⁵⁹ A contribuição da hereditariedade para a suscetibilidade à DMRI foi descrita há décadas, através da maior ocorrência da doença entre gêmeos monozigóticos comparada a gêmeos dizigóticos, pois apresentaram maior índice de concordância quando submetidos a mesmo fatores dietéticos e ambientais.⁶⁰ Vários *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP) (variações das sequências de bases nitrogenadas do ácido desoxirribonucleico, DNA),⁶¹ doravante denominadas como variantes, foram associados a uma incidência aumentada da DMRI,⁶² sendo que um dos mais importantes até o momento ocorre no gene do Fator H do Complemento (CFH), demonstrado em diversas populações.⁶³

A partir de Estudos de Associação de Amplitude Genômica, do inglês *Genome-Wide Associations Studies* (GWAS), foi possível a melhor compreensão das bases genéticas da DMRI e a identificação progressiva de genes relacionados à mesma. Por meio de uma análise conjunta e colaborativa entre diversos grupos, novos *loci* de susceptibilidade à DMRI foram incluídos progressivamente, propiciando novos direcionamentos para estudos genéticos e propostas terapêuticas.⁶⁴ Desde 2005, com o pioneirismo da descoberta do gene *CFH* como o gene de maior susceptibilidade, investigações posteriores confirmaram 52 variantes independentes comuns e raras distribuídas em 34 *loci*.⁶⁵

Pode-se agrupar quase todos os genes em vinte *loci* de susceptibilidade à DMRI em cinco vias biológicas que também são sugeridas por dados bioquímicos e patológicos: a via do sistema complemento e da resposta imune (*CFH*, *C2/CFB*, *CFI*, *C3* e *C9*); a do transporte lipídico (*APOE*, *LIPC*, *CETP* e *BAIAP2/2*); a do remodelamento da matriz extracelular (*COL8A1*, *COL10A1*, *TIMP3*, *ADAMTS9*, *TGFBR1*, *HTRA1* e *B3GALTL*); a da angiogênese (*VEGFA*, *TGFBR1* e *ADAMTS9*); a da sobrevivência celular, que inclui o reparo do DNA, apoptose e resposta ao estresse (*ARMS2*, *RAD51B* e *TNFRSF10A*).⁶⁶

Levando em conta que os fatores genéticos são responsáveis por 71% da variação de risco da DMRI avançada, as variantes conhecidas até o momento representam 40-60% desse total. Variantes genéticas comuns localizadas próximas aos genes do sistema complemento (*CFH*, *C2/CFB*, *C3* e *CFI*) compreendem cerca de 57% das variantes de risco conhecidas. Pode-se afirmar, portanto, que essa via exerce uma função crítica e de maior relevância na patogênese da DMRI,⁶⁶

constituindo a principal via biológica em estudos genéticos.

O mecanismo pelo qual o sistema complemento combinado ao estresse oxidativo exerce uma ação patogênica direta nas células do EPR baseia-se no fato da retina ser um tecido propenso ao dano oxidativo devido à alta tensão de oxigênio, à exposição à radiação ultravioleta e à elevada proporção de ácido graxo poli-insaturado no segmento externo de fotorreceptores. O estresse oxidativo reduz a inibição da atividade do sistema complemento na superfície das células do EPR. Conseqüentemente, há uma ativação direta do complemento, que é amplificada através da ativação de sua via alternativa, ocorrendo a liberação de anafilotoxinas (C3a, C4a, C5a), que levam à migração de células fagocíticas e macrófagos ao segmento externo de fotorreceptores e estimulam a produção de fatores de crescimento e citocinas que causam disfunção retiniana. Além disso, ocorre a ativação de opsoninas (C3b, iC3b, C4b), que atuam em células saudáveis do EPR e fotorreceptores estimulando a fagocitose e a formação de complexos de ataque à membrana, nas células endoteliais da coroide, células da retina neurosensorial e EPR. Indiretamente, a peroxidação lipídica, devido à exposição constante à luz solar e ao estresse oxidativo, também ativa o complemento. O malondialdeído, produto mais comum da peroxidação, é encontrado em elevadas concentrações na DMRI. Do mesmo modo, os fatores reguladores do sistema complemento, como CD46 e CD59, responsáveis pelo bloqueio da atividade do complemento e da formação do complexo de ataque à membrana na superfície das células do EPR são perdidos na DMRI, gerando uma resposta inflamatória crônica e danos ao EPR e MB.⁶⁷

Na coroide, há um aumento do depósito de complexo de ataque à membrana com a idade e ativação do sistema complemento, resultando em morte das células endoteliais e atrofia da coroide. Devido à falência na nutrição e oxigenação, já que se necessita da viabilidade da coroide e coriocapilar para que esses processos aconteçam, as células do EPR e fotorreceptores também entram em apoptose.⁶⁷

O *CFH* é um gene localizado na região 32 do braço longo do cromossomo 1 (1q32). Consiste em uma glicoproteína que regula a função da via alternativa do complemento na fase fluida e na superfície celular. A proteína CFH regula a conversão do C3 em C3a e C3b, inativa o C3b a iC3b, evitando a formação da C3 convertase e conseqüentemente realiza opsonização de patógenos. Além disso, o CFH impede a formação do complexo de ataque à membrana (MAC), reduz produção da Interleucina 6 (IL6) e atua como cofator para o CFI, outro inibidor do C3b.^{35,68} O CFH é um potente

regulador negativo da via alternativa do complemento. As variantes de risco localizadas nesse gene, por sua vez, reduzem a função desse fator na via inflamatória, aumentando os níveis de MAC na interface EPR-coroide e comprometendo a integridade da MB. Há múltiplas variantes independentes e haplótipos no *CFH* que podem conferir risco ou proteção ao desenvolvimento da DMRI. A variante de risco mais comum relacionada à DMRI é a rs1061170 (Y402H), que ocorre devido à substituição de uma base (a timina é substituída pela citosina) na posição 1277 do gene do *CFH*. Tal mudança leva à produção de uma sequência diferente de polipeptídeos, acarretando a troca do aminoácido histidina (H) no lugar de uma tirosina (Y) no aminoácido 402. Esta mudança da base nitrogenada é reportada como 1277 T>C ou T1277C. Estudos sugerem que outras variantes presentes no *CFH*, além da rs1061170 (Y402H), estão associadas a um risco aumentado de DMRI em caucasianos e asiáticos, como a variante não codificante intrônica rs1410996, em que há uma substituição da base nitrogenada adenina pela guanina, mostrou uma forte associação ao risco de desenvolvimento da DMRI comparável aos resultados encontrados para a variante rs1061170,^{69,70,71} com OR de 1,48 em uma meta-análise recente, com maior risco para a forma exsudativa da doença.⁷¹

Após o *CFH*, vários outros genes envolvidos na patogênese da DMRI foram descobertos na via do complemento e da inflamação crônica como *C2/CFB*^{72,73} e o *C3*.^{74,75,76}

O gene *C3* codifica o componente 3 do complemento, um fator que desempenha um papel relevante na ativação das vias clássica, alternativa e da lectina. É um gene que se localiza na região 13.3 do braço curto do cromossomo 19 (19p13.3). O fator C3 é sintetizado na fase aguda da inflamação, sendo produzido pelo fígado assim como monócitos e macrófagos ativados. O produto de sua clivagem, C3a, é encontrado em drusas. Esse fator exerce uma função crítica no sistema complemento e sua deficiência aumenta a suscetibilidade a infecções bacterianas. Uma variante de risco para desenvolvimento da DMRI neste gene consiste na substituição da base nitrogenada citosina por guanina no éxon 3 do gene *C3* (rs2230199), que causa a substituição de um resíduo de arginina no códon 102 por um de glicina (p.Arg102Gly).⁶⁸ O alelo p.Gly102 apresenta uma frequência de 17,5% em europeus.⁶⁸ A associação entre p.Arg102Gly e DMRI em caucasianos é demonstrada em diversos estudos.^{74,75,77} Entre os europeus, o OR para DMRI é de 1,7 nos heterozigotos p.Arg102/Gly102 e de 2,6 nos homozigotos.⁷⁴ Em uma metanálise⁷⁸ de

2015, o OR para população geral no modelo aditivo foi 1,57; no modelo dominante, 1,68; e no modelo alélico, 1,59. Ao se analisar os subgrupos étnicos os resultados foram semelhantes em caucasianos, porém sem significância estatística em asiáticos, devido à menor frequência do alelo p.Gly102 nessa etnia.⁷⁸

1.7- Justificativa

A DMRI é uma doença ocular multifatorial que constitui a principal causa de cegueira em maiores de 60 anos em países desenvolvidos.¹ Com o aumento da expectativa de vida, tal patologia gera impactos socioeconômicos e na qualidade de vida dos pacientes acometidos, inclusive em países em desenvolvimento.

A patogênese da doença ainda não é bem elucidada e a contribuição de fatores genéticos é responsável por cerca de 71% do risco de desenvolvimento de DMRI avançada.⁶² As frequências de distribuição das variantes genéticas diferem em relação a grupos étnicos e raciais. Portanto, estudos em diferentes grupos populacionais sob influência de fatores ambientais de risco são fundamentais a fim de esclarecer e facilitar o entendimento das bases genéticas na DMRI, além de estabelecer o seu perfil de risco mais preponderante para determinado grupo populacional. Desse modo, pode-se compreender melhor as bases genéticas associadas a cada grupo populacional caminhando em direção à medicina de precisão. Além disso, o melhor entendimento da patogênese da doença auxiliará a introdução de novas medidas terapêuticas, já que as atuais ainda são limitadas e escassas, e eventualmente ineficazes.

No Brasil há poucos estudos a respeito do impacto da genética na DMRI. O presente estudo propõe a análise de duas importantes variantes de risco localizadas na via do sistema complemento ainda não avaliadas em uma amostra da população brasileira. Este estudo poderá contribuir para melhorar a caracterização, junto com outros estudos em nossa população, das bases genéticas da DMRI no Brasil.

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo geral

Análise das variantes de base única rs1410996 (gene *CFH*) e rs2230199 (gene *C3*) em relação ao risco para desenvolvimento da Degeneração Macular Relacionada à Idade em uma amostra da população brasileira.

2.2- Objetivos específicos

- a) Investigar o papel das variantes rs1410996 e rs2230199 em relação ao risco para desenvolvimento de DMRI após estratificação em seca e úmida.
- b) Investigar o papel das variantes rs1410996 e rs2230199 em relação ao risco para desenvolvimento de DMRI após estratificação em avançada e não avançada.
- c) Comparar os dados encontrados com os achados em outros grupos étnicos e populacionais, para avaliar as particularidades da população brasileira.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1- Casuística

Foi realizado um estudo transversal de associação. Pacientes com DMRI e controles foram selecionados no Ambulatório de Oftalmologia do Hospital de Clínicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Foi realizada, para cada uma das variantes em avaliação, a estimativa inicial do espaço amostral necessário.

Para a variante rs2230199, a partir dos dados de frequência alélica da literatura, foi estimado um N de 397 por grupo, para uma margem de erro de 3%. A **Tabela 3** e a **Gráfico 2** resumem essas estimativas.

Tabela 3. Estimativa do espaço amostral para o rs2230199, considerando as diferentes margens de erro.

Margem de Erro (%)	IC (%)	Quantos alelos amostrar em cada grupo	Quantas Pessoas amostrar em cada grupo
5	95	288	144
4	95	449	224,5
3	95	794	397
2	95	1769	884,5
1	95	6719	3359,5
5	99	496	248
4	99	772	386
3	99	1364	682
2	99	3017	1508,5
1	99	11065	5532,5

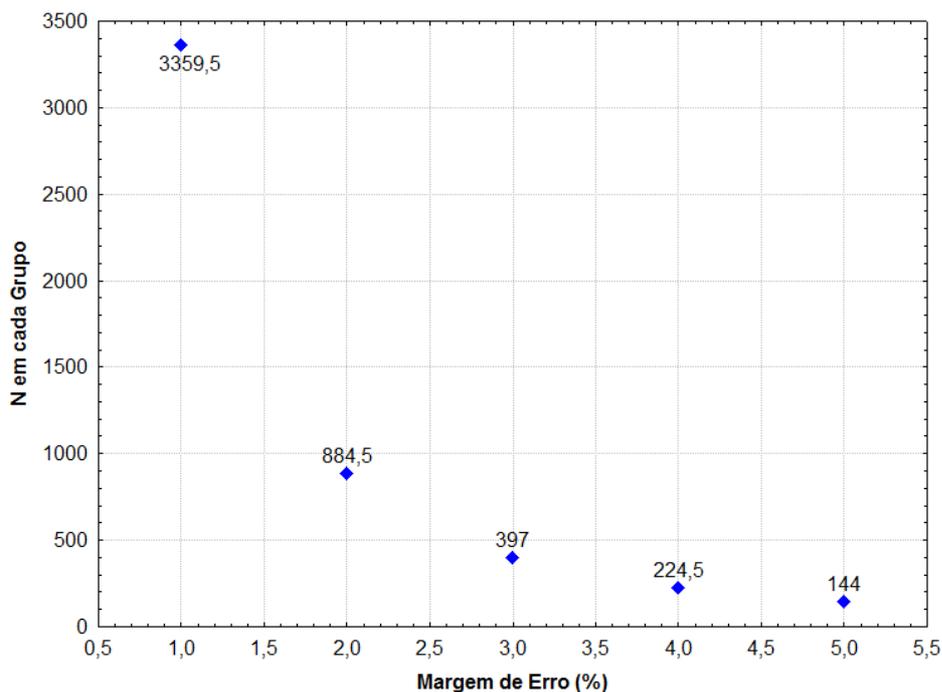


Gráfico 2: Estimativa do espaço amostral para o rs2230199 de acordo com a margem de erro em porcentagem (eixo X); N em cada grupo (eixo Y) para um intervalo de confiança de 95%.

Para a variante rs1410996, a frequência alélica na literatura era de 50% (48-52%) e a diferença entre casos e controles de apenas 2%, gerando uma estimativa amostral de 4.904 (2.452 indivíduos em cada grupo).

Baseado na variante rs2230199 e em estudos prévios, adotou-se uma estimativa ideal de 800 indivíduos, sendo 400 casos e 400 controles.

Após a realização da avaliação laboratorial e testes genéticos, foram excluídos da análise de cada variante aqueles com resultados genéticos duvidosos ou não reprodutíveis e pacientes sem informação da idade. Sendo assim, cada gene avaliado (*CFH* e *C3*) contou com sua casuística própria, configurando o espaço amostral específico de cada gene, com pequenas diferenças entre si.

Na avaliação da variante rs2230199 foram analisados 324 pacientes com DMRI e 377 indivíduos sem DMRI (grupo controle), enquanto para a variante rs1410996 foram analisados 413 pacientes com DMRI e 353 indivíduos sem DMRI (grupo controle).

3.2- Definição e classificação da DMRI

A definição e classificação foram baseadas no sistema de classificação CARMS¹⁸ que classifica a DMRI em 5 graus. O grau 1 aponta para a presença de até 10 drusas sem alteração pigmentar, o grau 2 quando há a presença de mais de 10 drusas pequenas ou menos de 15 intermediárias associada ou não a alterações pigmentares. 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, MNVSR (membrana neovascular sub-retiniana) com fibrose ou hemorragia subretiniana, cicatriz consistente com tratamento de DMRI, MNVSR e cicatriz disciforme. Os graus 2 e 3 também podem ser denominados “formas não avançadas da DMRI”, enquanto os graus 4 e 5 “formas avançadas da doença”.

A classificação do paciente de acordo com as formas seca ou úmida, e não avançada (precoce) ou avançada (tardia) foi feita considerando-se o *status* do pior olho examinado, tomando por base o sistema CARMS de classificação.

3.3- Seleção dos Pacientes

3.3.1- Grupo Estudo/ Caso - DMRI

3.3.1.1- Critérios de inclusão - DMRI

Pacientes com idade superior a 50 anos que preenchessem os critérios necessários para diagnóstico de DMRI graus 2, 3, 4 ou 5 (segundo o sistema de classificação *CARMS*).

3.3.1.2- Critérios de exclusão - DMRI

Pacientes que apresentassem:

- Opacidade de meios que impedissem fundoscopia e/ou retinografia de boa qualidade
- Vasculopatia polipoidal coroidal
- Alta miopia (equivalente esférico maior que -6 dioptrias)
- Estrias angióides
- Doença corioretiniana infecciosa/ inflamatória/ hereditária
- Trauma ocular prévio
- Hemorragia macular de qualquer etiologia
- Não amplificação pela PCR ou amostras de baixa qualidade
- Pacientes que não concordassem em participar da pesquisa, através da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)
- Consanguinidade

3.3.2- Grupo controle

3.3.2.1- Critério de inclusão

Pacientes que apresentassem:

- Idade acima de 50 anos
- Ausência de qualquer evidência de DMRI, como drusas ou alterações no EPR.

3.3.2.2- Critérios de exclusão

Pacientes que apresentassem:

- História familiar de cegueira
- Opacidade de meios que impedissem fundoscopia e/ou retinografia de boa qualidade
- Vasculopatia polipoidal coroidal
- Alta miopia (equivalente esférico maior que -6 dioptrias)
- Estrias angióides

- Doença corioretiniana infecciosa/ inflamatória/ hereditária
- Trauma ocular prévio
- Hemorragia macular de qualquer etiologia
- Não amplificação pela PCR ou amostras de baixa qualidade
- Pacientes que não concordassem em participar da pesquisa, através da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)
- Consanguinidade

3.4- Aspectos éticos

Este estudo foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, através da Plataforma Brasil, e aprovado, sob o Protocolo de Pesquisa CAAE 49120615.4.0000.5404, parecer 3.512.411 (Anexo 1). Todos os pacientes e controles preencheram os critérios de inclusão e de exclusão e assinaram o TCLE (Anexo 2).

Os pacientes selecionados para o estudo receberam explicação completa, detalhada e em linguagem acessível a respeito da pesquisa, seus objetivos, métodos, riscos 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 fazem parte da rotina atual do serviço, aqueles que aceitaram participar do estudo assinaram um TCLE, autorizando sua participação voluntária na pesquisa. Todos os sujeitos da pesquisa puderam retirar seu consentimento, em qualquer fase do estudo, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu atendimento médico.

Foram retirados 10 mililitros de sangue periférico, sem prejuízo à saúde do paciente. O material biológico (sangue) coletado foi armazenado no Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) – UNICAMP e utilizado exclusivamente para a finalidade prevista neste projeto.

A identidade de todos os pacientes foi mantida em sigilo, tendo sido respeitados os princípios enunciados na Declaração de Helsinque.

3.4.1- Entrevista e obtenção de dados clínicos e oftalmológicos

Após a avaliação dos critérios de inclusão e exclusão acima citados e assinatura do TCLE, todos os pacientes selecionados foram inicialmente

entrevistados, por meio de uma anamnese padronizada para a obtenção de informações sobre: dados demográficos e história oftalmológica.

Essa anamnese foi útil para caracterizar as populações em estudo e para a investigação de possíveis fatores de risco relacionados à doença, bem como avaliação da história médica e oftalmológica pregressa pessoal e familiar.

3.4.2 Avaliação oftalmológica

Os pacientes avaliados foram submetidos a uma avaliação oftalmológica completa composta por: anamnese, acuidade visual sem correção e com melhor correção, refração dinâmica, biomicroscopia de segmento anterior, tonometria de aplanção (tonômetro de Goldmann) e biomicroscopia de fundo com auxílio de lente de 78D. Na biomicroscopia de fundo foram observados os achados compatíveis com DMRI, tanto na forma seca quanto úmida, avançada ou não avançada.

Além da rotina oftalmológica de consulta já prevista, os pacientes incluídos no estudo realizaram os exames complementares:

- Retinografia, com o uso do retinógrafo VISUCAM NM/FA - Carl Zeiss Meditec, para o registro fotográfico colorido do aspecto fundoscópico;
- Angiografia fluoresceínica e/ou com indocianina verde, com o uso do retinógrafo VISUCAM NM/FA - Carl Zeiss Meditec, naqueles casos em que houvesse suspeita de membrana neovascular subretiniana e para diagnóstico diferencial com outras patologias;
- Tomografia de coerência óptica de domínio espectral (SD-OCT), com o uso do aparelho SPECTRALIS® OCT - Heidelberg Engineering, para melhor avaliação estrutural da região macular.

A conduta e o seguimento oftalmológico dos pacientes no ambulatório não foram influenciados pela participação na pesquisa, tendo seguido os protocolos já utilizados na rotina do serviço.

3.5- Métodos

3.5.1- Extração de DNA

Foram obtidos 10 mL de sangue periférico em frasco estéril contendo EDTA 10% como anticoagulante de todos os indivíduos submetidos ao estudo. As amostras de DNA foram extraídas com a utilização do método fenol/clorofórmio e quantificadas no aparelho NanoDrop 2000 (Thermo Fisher – Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Sua integridade foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose 1%.

3.5.2- Avaliação das variantes

A triagem da variante rs1410996 (*CFH*) e da variante rs2230199 (*C3* R102G) foi realizada por meio da reação em cadeia polimerase (PCR) seguida de sequenciamento.⁷⁹

3.5.2.1- Avaliação da variante rs1410996

3.5.2.1.1- PCR

A PCR foi padronizada utilizando-se os seguintes reagentes: 0,25 µl de cada iniciador para a variante rs1410996 do gene *CFH* cuja sequência “sense” é 5'-GGCACTGAGAAGCAAAGAAA-3' e anti-sense 5'-CCTCCCGGTTAGTCATCAAAA-3' (os *primers* foram desenhados com base na sequência depositada no banco de dados GenBank® - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> - e com o auxílio do software Primer3 - <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>), 2,5 µl do tampão da enzima 10X (Tampão 10X: Tris-HCl 20 mM, pH 8,4, KCl 50 mM, gelatina 0,01%), 1,5 µl de MgCl₂ 50 µM, 0,5 µl da mistura de nucleotídeos (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) 10 mM e 0,1 µl de Taq DNA polimerase Platinum 10U/µl (Invitrogen Life Technologies, Gaithersburg, MD, EUA), somados a 1,0 µl de DNA genômico (50 ng/µl). O volume final foi completado com água ultrapura para 25 µl.

Em seguida as amostras foram amplificadas por meio de aparelho termociclador Veriti 96-Well ThermalCycler (Applied Biosystems-Applera Corporation, Foster City, CA, EUA). As temperaturas e duração dos ciclos foram padronizados após testes de eficiência. Foram realizados 35 ciclos de desnaturação do DNA a 95°C por 1 minuto, anelamento a 60°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto, seguidos de extensão final a 72°C por 7 minutos. Por fim, os produtos da PCR foram submetidos

a eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo e visibilizados sob iluminação ultravioleta (UV).

3.5.2.1.2- Sequenciamento por Sanger

As reações de sequenciamento foram realizadas com os mesmos iniciadores das PCRs, segundo o método de Sanger. Os reagentes utilizados para a reação de sequenciamento foram: o produto da PCR purificado (1,0 µl de PCR 20 ng/µl); "Big Dye" 1x (ABI PRISM Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystem Applied Biosystems Corporation, Foster City, CA, EUA); 4,0 µl de tampão "Save Money" 1x (fornecido pelo mesmo fabricante do "Big Dye"), 1,0 µl do iniciador direto ou reverso (5 pmol/µl) e H₂O ultrapura para completar a reação para um volume final de 20 µl. Após desnaturação inicial a 96 °C por 1 minuto, foram realizados 30 ciclos a 96 °C por 10 segundos, 57 °C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos.

Para a purificação da reação de sequenciamento as amostras foram precipitadas com 80 µl de etanol 80% e centrifugadas a 4000 rpm por 45 minutos. O sobrenadante foi descartado, prosseguindo-se com a adição de 150 µl de etanol 70%. Uma nova centrifugação foi realizada, desta vez por 10 minutos a 4000 rpm. Para finalizar, o sobrenadante foi descartado e as amostras foram secadas em termociclador por 3 minutos a 64 °C e armazenadas a -20 °C. O produto da reação de sequenciamento purificado foi então ressuspensão em 10 µl de Formamida Hi-Di (Applied Biosystem-Applied Biosystems Corporation, Foster City, CA, EUA) e posteriormente desnaturado a 94°C por 5 minutos. Procedeu-se com a eletroforese em analisador automático de DNA ABI PRISM 3700 ou ABI PRISM 3130 (Applied Biosystem-Applied Biosystems Corporation, Foster City, CA, EUA).

As sequências obtidas foram analisadas com o auxílio do programa FinchTV (Geospiza) e comparadas com as sequências normais dos genes por meio da ferramenta BLAST no servidor NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) e do software MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>).

3.5.2.2- Avaliação da variante rs2230199

3.5.2.2.1- PCR

A PCR foi padronizada utilizando-se os seguintes reagentes: 0,25 µl de cada iniciador para a variante rs2230199 do gene C3 cuja sequência “sense” é 5'-CACCTCGGAAGACCAAGAAT-3' e “anti-sense” 5'-GTGGTTGACGGTGAAGATCC-3' (os *primers* foram desenhados com base na sequência depositada no banco de dados GenBank® - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> - e com o auxílio do software Primer3 - <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>); 2,5 µl do tampão da enzima (Tampão 10X: Tris-HCl 20 mM, pH 8,4, KCl 50 mM, gelatina 0,01%), 1,5 µl de MgCl₂ 50 uM, 0,5 µl da mistura de nucleotídeos (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) 10 mM e 0,1 µl de Taq DNA polimerase Platinum 10U/µl (Invitrogen Life Technologies, Gaithersburg, MD, EUA), somados a 1,0 µl de DNA genômico (50 ng/µl). O volume final foi completado com água ultrapura para 25 µl.

Em seguida as amostras foram amplificadas por meio de aparelho termociclador Veriti 96-Well ThermalCycler (Applied Biosystems-Applera Corporation, Foster City, CA, EUA). As temperaturas e duração dos ciclos foram padronizados após testes de eficiência. Foram realizados 35 ciclos de desnaturação do DNA a 95°C por 1 minuto, anelamento a 60°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto, seguidos de extensão final a 72°C por 7 minutos. Por fim, os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo e visibilizados sob iluminação ultravioleta (UV).

3.5.2.2.2- Sequenciamento por Sanger

As condições para a reação de sequenciamento assim como sua purificação seguiram o protocolo descrito para a variante rs1410996 no item 3.5.2.1.2.

3.6- Análise estatística

Os dados obtidos foram armazenados em um gerenciador de banco de dados.

Para descrever o perfil da amostra segundo as variáveis em estudo foram construídas tabelas de frequência das variáveis categóricas com valores de frequência absoluta (n) e percentual (%), e estatísticas descritivas das variáveis numéricas, com valores de média, desvio padrão, valores mínimo e máximo e mediana.

A análise estatística foi realizada com o software R (Foundation for Statistical Computing, Viena, Áustria). Foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney e o teste exato de Fisher para comparar a distribuição de idade e sexo, respectivamente, entre as coortes afetadas e não afetadas.

O teste de qui-quadrado foi empregado para avaliar o equilíbrio de Hardy-Weinberg nos grupos estudados, a fim de determinar se os genótipos estavam dentro da distribuição padrão ($p > 0,05$).

Para avaliar o papel das variantes genéticas presentes na via do sistema complemento e a suscetibilidade à DMRI foram realizadas comparações genotípicas e alélicas por meio da análise de regressão logística ajustada pela idade:

(1) genérica (casos vs controles)

(2) após a estratificação quanto à gravidade da doença (não avançada vs controle; avançada vs controle; avançada vs não avançada)

(3) após a estratificação quanto à forma de apresentação (seca vs controle; úmida vs controle; úmida vs seca).

O p-valor ajustado por Bonferroni (para reduzir a possibilidade de erro tipo I devido a testes múltiplos) a fim de confirmar a significância estatística foi 0,0071 ($p = 0,05/7 = 0,0071$; pois foram realizadas 7 comparações para cada variante genética) em todas comparações realizadas, tanto para a variante rs1410996 quanto para a rs2230199.

4- RESULTADOS

4.1- Análise estatística descritiva

Foram incluídos no estudo 963 indivíduos para avaliação das variantes rs1410996 e rs2230199, sendo 484 com DMRI (grupo caso) e 479 sem a patologia (grupo controle).

Em relação à distribuição por sexo, no grupo caso 266 (54,96%) participantes eram do sexo feminino e 218 (45,04%) eram do sexo masculino; no grupo controle, 257 participantes (53,65%) eram do sexo feminino e 222 (46,35%) eram do sexo masculino. Não houve diferença estatisticamente significativa em relação ao gênero ao compararmos casos e controles ($p = 0,6843$). (**Tabela 4**).

Em relação à idade, no grupo caso, a idade média foi de $73,05 \pm 9,12$ anos, com mediana de 74 anos, variando de 50 a 103 anos. No grupo controle, a idade média foi de $66,07 \pm 9,79$ anos, com mediana de 66,50 anos, variando de 50 a 89 anos (**Tabela 4**). Houve diferença estatisticamente significativa na comparação da idade entre casos e controles ($p < 0,0001$).

Tabela 4. Distribuição por sexo e idade entre os grupos caso e controle.

<u>Aspecto avaliado</u>	<u>Casos</u>	<u>Controles</u>	<u>p-valor</u>
Sexo Feminino	54,96% (266)	53,65% (257)	0,6843*
Sexo Masculino	45,04% (218)	46,35% (222)	
Idade média \pm DP (anos)	73,05 \pm 9,12	66,07 \pm 9,79	< 0,0001**
Mediana de idade (anos)	74,00	66,50	-
Intervalo de variação da idade (anos)	50 – 103	50 - 89	-

DP = desvio padrão; * = Teste de Qui-Quadrado; ** = Teste de Mann-Whitney

Ao se analisar as formas da doença no grupo caso, 205 (42,01%) tinham a forma seca e 283 (57,99%), a forma úmida da DMRI; e ao avaliarmos a gravidade, 153 (31,35%) apresentavam a forma não avançada da doença e 335 (68,65%), a forma avançada da doença. Essa subdivisão foi utilizada nas análises posteriores para a avaliação das variantes e sua relação às formas e gravidade da DMRI.

4.2- Análise da variante rs1410996 (gene *CFH*)

4.2.1- Avaliação por genótipo

O cálculo do equilíbrio de Hardy-Weinberg realizado nos grupos caso (p-valor 0,071) e controle (p-valor 0,311) demonstrou que ambas as populações estudadas estavam em equilíbrio.

No grupo controle, 327 indivíduos de 413 apresentavam o alelo de risco em estudo (G), enquanto no grupo caso, 298 de 353 apresentavam o alelo de risco. A **Tabela 5** demonstra a distribuição dos genótipos em cada grupo.

Tabela 5. Distribuição genotípica para a variante rs1410996 nos grupos caso e controle.

Genótipo	Grupo caso (%)	Grupo controle (%)
GG	150 (42,49%)	111 (26,88%)
AG	148 (41,93%)	216 (52,30%)
AA	55 (15,58%)	86 (20,82%)
Total de pacientes	353 (46,08%)	413 (53,92%)

Os genótipos GG e AG, contendo o alelo de risco (G), foram mais frequentes no grupo caso (84,42%) que no grupo controle (79,18%). No entanto, após a correção por Bonferroni, ao comparar o genótipo GG versus AA entre casos e controles, perdeu-se a significância estatística (OR 1,8198, p-valor de 0,0079, IC 95% 1,1727-2,8383). Do mesmo modo, a comparação da forma heterozigota (AG) com a homozigota sem o alelo de risco (AA) não apresentou significância estatística IC95% 0,6891-1,5960 (**Tabela 6**).

Tabela 6. Comparação de genótipos para a variante rs1410996 entre casos e controles, por meio de regressão logística ajustada para idade.

Comparação de genótipos	Odds ratio (OR)	Intervalo de confiança de 95% (IC95%)	p-valor
<u>GG x AA</u>	<u>1,8198</u>	<u>1,1727-2,8383</u>	<u>0,0079</u>
AG x AA	1,0463	0,6891-1,5960	0,8324

* p-valor com significância para α (0,05/7) = 0,0071

Os resultados em **negrito** representam dados estatisticamente significantes após o ajuste do p-valor por Bonferroni. Os resultados sublinhados representam dados inicialmente estatisticamente significativos (p-valor <0,05) que não sobreviveram à correção por Bonferroni.

Os casos foram estratificados quanto à gravidade da doença em formas não avançada, 108 pacientes (30,60%) e avançada, 245 pacientes (69,40%); e quanto à apresentação em formas seca, 143 pacientes (40,51%) e úmida, 210 pacientes (59,49%). A **Tabela 7** mostra a distribuição dos genótipos da variante rs1410996 de acordo com a gravidade da DMRI.

Tabela 7. Distribuição dos genótipos para a variante rs1410996 nos grupos de estratificação quanto à gravidade e formas de apresentação da DMRI.

Genótipo	DMRI não avançada (%)	DMRI avançada (%)	DMRI seca (%)	DMRI úmida (%)
GG	42 (38,89%)	108 (44,08%)	55 (38,46%)	95 (45,24%)
AG	45 (41,67%)	103 (42,04%)	62 (43,36%)	86 (40,95%)
AA	21 (19,44%)	34 (13,88%)	26 (18,18%)	29 (13,81%)
Total de pacientes	108 (30,60%)	245 (69,40%)	143 (40,51%)	210 (59,49%)

Comparando-se os genótipos AG versus AA e GG versus AA nos casos não avançados em relação aos controles não houve significância estatística, apresentando, respectivamente, o OR de 0,8433 (p-valor = 0,569; IC95% 0,4738-1,5370) e 1,3572 (p-valor = 0,327; IC95% 0,7429-2,5299) (**Tabela 8**).

Observou-se que os genótipos GG foram mais frequentes que AA nos pacientes com DMRI avançada em relação aos controles, resultando em um OR de 2,1238 (p-valor 0,0036; IC95 1,2860-3,5552). No entanto, ao estabelecer uma análise comparativa AG versus AA não houve significância estatística (OR 1,1236; p-valor 0,6405; IC95 0,6928-1,8464) (**Tabela 8**).

A comparação genotípica AG versus AA (OR 1,4469; p-valor = 0,2670; IC95 0,7475-2,7697) e GG versus AA (OR 1,5123; p-valor = 0,2166; IC95 0,7782-2,9048) entre os pacientes com as formas avançada e não avançada da doença não foram estatisticamente significativas (**Tabela 8**).

Tabela 8. Comparação de genótipos para a variante rs1410996 após a estratificação dos pacientes com DMRI nas formas não avançada e avançada da doença, por meio de regressão logística ajustada para idade.

Comparação	DMRI não avançada vs. controles		DMRI avançada vs. controles		DMRI avançada vs. não avançada	
	OR (IC95%)	p-valor*	OR (IC95%)	p-valor*	OR (IC95%)	p-valor*
GG vs. AA	1,3572 (0,7429-2,5299)	0,327	2,1238 (1,2860-3,5552)	0,0036*	1,5123 (0,7782-2,9048)	0,2166
AG vs. AA	0,8433 (0,4738-1,5370)	0,569	1,1236 (0,6928-1,8464)	0,6405	1,4469 (0,7475-2,7697)	0,2670

OR: Odds Ratio; IC95%: Intervalo de confiança 95%

* p-valor com significância para $\alpha (0,05/7) = 0,0071$

Os resultados em **negrito** representam dados estatisticamente significantes após o ajuste do p-valor por Bonferroni. Os resultados sublinhados representam dados inicialmente estatisticamente significativos (p-valor <0,05) que não sobreviveram à correção por Bonferroni.

Na avaliação quanto a forma de apresentação não houve significância estatística ao se comparar os genótipos AG versus AA (OR 0,9413; p-valor = 0,829; IC95 0,5517-1,6360) e GG versus AA (OR 1,4050; p-valor 0,242; IC95 0,7997-2,5061) entre os pacientes com DMRI seca e os controles (**Tabela 9**).

Na análise entre o subgrupo casos com forma úmida e controles observou-se significância estatística ao comparar os genótipos GG versus AA (OR 2,1697; p-valor 0,0039; IC95 1,2904-3,7129). No entanto, não houve diferença estatística entre os genótipos AG versus AA (OR 1,0865; p-valor = 0,7509; IC95 0,656-1,8314) entre esses subgrupos (**Tabela 8**).

Na análise entre os subgrupos casos com forma úmida e casos com forma seca não houve diferença estatística nas comparações genotípicas realizadas: AG versus AA (OR 1,2454; p-valor = 0,489; IC95 0,6664-2,3224) e GG versus AA (OR 1,5413; p-valor = 0,176; IC95 0,8217-2,8884) (**Tabela 9**).

Tabela 9. Comparação de genótipos para a variante rs1410996 após a estratificação dos pacientes com DMRI nas formas seca e úmida da doença, por meio de regressão logística ajustada para idade.

Comparação	DMRI seca vs. controles		DMRI úmida vs. controles		DMRI úmida vs. seca	
	OR (IC95%)	p-valor*	OR (IC95%)	p-valor*	OR (IC95%)	p-valor*
GG vs. AA	1,4050 (0,7997-2,5061)	0,242	2,1697 (1,2904-3,7129)	0,0039*	1,5413 (0,8217-2,8884)	0,176
AG vs. AA	0,9413 (0,5517-1,6360)	0,829	1,0865 (0,6556-1,8314)	0,7509	1,2454 (0,6664-2,3224)	0,489

OR: Odds Ratio; IC95%: Intervalo de confiança 95%

* p-valor com significância para α (0,05/7) = 0,0071

Os resultados em **negrito** representam dados estatisticamente significantes após o ajuste do p-valor por Bonferroni. Os resultados sublinhados representam dados inicialmente estatisticamente significativos (p-valor <0,05) que não sobreviveram à correção por Bonferroni.

4.2.2- Avaliação por alelo

A avaliação da distribuição alélica na população estudada revela a presença do alelo G em 63,46% e do alelo A em 36,54% dos pacientes no grupo caso, enquanto no grupo controle, o alelo G esteve presente em 53,03% dos pacientes e o A, em 46,97% (**Tabela 10**).

A distribuição dos alelos G e A da variante rs1410996 segundo a estratificação quanto às formas de apresentação da DMRI está disponibilizada na **Tabela 10**.

Tabela 10. Distribuição dos alelos G e A da variante rs1410996 nos grupos e subgrupos de pacientes estudados.

Grupo avaliado	Frequência do alelo G	Frequência do alelo A
Controle	438 (53,03%)	388 (46,97%)
Caso	448 (63,46%)	258 (36,54%)
DMRI forma seca	172 (60,14%)	114 (39,86%)
DMRI forma úmida	276 (65,71%)	144 (34,29%)
DMRI não avançada	129 (59,72%)	87 (40,28%)
DMRI avançada	319 (65,10%)	171 (34,90%)

A comparação alélica mostrou uma maior frequência do alelo G no grupo caso em relação ao controle, apresentando significância estatística (OR 1,4040; p-valor 0,0021; IC95% 1,1312-1,7466), reforçando o papel de risco que esse alelo apresenta na DMRI (**Tabela 11**).

Ao avaliar as formas da DMRI houve significância estatística na comparação da frequência de alelos na forma úmida versus controle (OR 1,5707; p-valor 0,0006; IC95 1,2144-2,0424). Não houve diferença estatisticamente significativa nas comparações entre as formas seca e úmida da doença e entre a forma seca versus controle (**Tabela 11**).

Na estratificação quanto à gravidade da doença, houve significância estatística para a comparação entre casos de doença avançada versus controles (OR 1,5349; p-valor 0,0007; IC95 1,1990-1,9733). Não houve diferença estatisticamente significativa na avaliação da frequência de alelos nas comparações entre casos

avanzados e não avanzados, e entre a forma não-avanzada em relação aos controles (Tabela 11).

Tabela 11. Comparação das frequências alélicas da variante rs1410996 entre os diferentes grupos avaliados, utilizando-se o teste de qui-quadrado.

Grupos comparados (GxA)	OR	IC95%	p-valor
Casos x controles	1,4040	1,1312-1,7466	0,0021*
Seca x Controles	1,2254	0,9218-1,6346	0,164
Úmida x Controle	1,5707	1,2144-2,0424	0,0006*
Úmida x Seca	1,2407	0,9198-1,6762	0,158
Não avanzada x Controle	1,2188	0,8934-1,6708	0,214
Avanzada x Controle	1,5349	1,1990-1,9733	0,0007*
Avanzada x Não Avanzada	1,1936	0,8659-1,6433	0,2777

OR: Odds Ratio; IC95%: Intervalo de confiança 95%

* p-valor com significância para α (0,05/7) = 0,0071

Os resultados em **negrito** representam dados estatisticamente significantes após o ajuste do p-valor por Bonferroni. Os resultados sublinhados representam dados inicialmente estatisticamente significativos (p-valor <0,05) que não sobreviveram à correção por Bonferroni.

4.3- Análise da variante rs2230199 (gene C3)

4.3.1- Avaliação por Genótipo

O cálculo do equilíbrio de Hardy-Weinberg realizado nos grupos caso ($p=0,065$) e controle ($p=0,011$) demonstrou que o grupo controle não estava em equilíbrio.

Foram avaliados 701 indivíduos, sendo 377 (53,78%) controles e 324 (46,22%) casos. No grupo controle, 91 indivíduos apresentavam o alelo de risco em estudo (G), enquanto no grupo caso, 124 apresentavam o alelo G. A **tabela 12** demonstra a distribuição dos genótipos em cada grupo.

Tabela 12. Distribuição Genotípica para a variante rs2230199 nos grupos casos e controles.

Genótipo	Grupo caso (%)	Grupo controle (%)
GG	23 (8,10%)	13 (3,45%)
CG	103 (31,79%)	78 (20,69%)
CC	198 (61,11%)	286 (75,86%)
Total de pacientes	324 (46,22%)	377 (53,78%)

A comparação genotípica entre os casos e controles foi estatisticamente significativa ao analisar o genótipo GC versus CC (OR 2,0207; p -valor = 0,0002; IC95% 1,3937-2,9148). Porém, não foi observada significância ao comparar os genótipos em homozigose GG versus CC (OR 2,1162; p -valor = 0,0456; IC95% 1,0286-4,5236) (**Tabela 13**).

Tabela 13. Comparação de genótipos para a variante rs2230199 entre os casos e controles, por meio de regressão logística ajustada pela idade.

Comparação de genótipos	Odds ratio (OR)	Intervalo de confiança de 95% (IC95%)	p -valor
<u>GG x CC</u>	<u>2,1162</u>	<u>1,0286-4,5236</u>	<u>0,0456</u>
GC x CC	2,0107	1,3937-2,9148	0,0002*

* p -valor com significância para $\alpha (0,05/7) = 0,0071$

Os resultados em **negrito** representam dados estatisticamente significantes após o ajuste do p -valor por Bonferroni. Os resultados sublinhados representam dados inicialmente

estatisticamente significativos (p -valor $<0,05$) que não sobreviveram à correção por Bonferroni.

Os casos foram estratificados quanto à gravidade da doença em formas não avançada, 94 pacientes (29,01%), e avançada, 230 pacientes (70,99%); e quanto a apresentação em formas seca, 127 pacientes (39,20%), e úmida, 197 pacientes (60,80%). A **Tabela 14** mostra a distribuição dos genótipos da variante rs2230199 segundo a características fenotípicas de apresentação da DMRI.

Tabela 14. Distribuição dos genótipos para a variante rs2230199 nos grupos de estratificação quanto à gravidade e formas de apresentação da DMRI.

Genótipo	DMRI não avançada (%)	DMRI avançada (%)	DMRI seca (%)	DMRI úmida (%)
GG	4 (4,25%)	19 (8,26%)	5 (3,94%)	18 (9,14%)
CG	25 (26,60%)	78 (33,91%)	39 (30,71%)	64 (32,49%)
CC	65 (69,15%)	133 (57,83%)	83 (65,35%)	115 (58,37%)
Total de pacientes	94 (29,01%)	230 (70,99%)	127 (39,20%)	197 (60,80%)

Na avaliação quanto à gravidade da DMRI, observou-se que na análise entre os casos não avançados e os controles não houve significância estatística ao comparar os genótipos GG versus CC (OR 1,1909; p -valor = 0,769; IC95% 0,3238-3,5485) e CG versus CC (OR 1,4927; p -valor = 0,145; IC95% 0,8604-2,5402 (**Tabela 15**).

Observou-se significância estatística ao comparar o genótipo CG versus CC nos pacientes com DMRI avançada em relação aos controles, resultando em uma OR de 2,3034 (p -valor $5,47e-05^*$; IC95 1,5381-3,4635). Já a análise do genótipo GG versus CC deixou de ser significativa após ajuste do p -valor, apresentando OR de 2,6753 (p -valor = 0,013; IC95% 1,2401-5,9333) (**Tabela 15**).

A comparação genotípica GG versus CC (OR 2,2039; p -valor = 0,1679; IC95 0,7849-7,8626) e CG versus CC (OR 1,5502; p -valor = 0,1137; IC95 0,9088-2,7025) entre os pacientes com as formas avançada e não avançada da doença não foram estatisticamente significantes (**Tabela 15**).

Tabela 15. Comparação de genótipos para a variante rs2230199 após a estratificação dos pacientes com DMRI nas formas não avançada e avançada da doença, por meio de regressão logística ajustada para idade.

Comparação	DMRI não avançada vs. controles		DMRI avançada vs. controles		DMRI avançada vs. não avançada	
	OR (IC95%)	p- valor*	OR (IC95%)	p-valor*	OR (IC95%)	p- valor*
GG vs. CC	1,1909 (0,3238- 3,5485)	0,769	<u>2,6753</u> (<u>1,2401-</u> <u>5,9333</u>)	<u>0,013</u>	2,2039 (0,7849- 7,8626)	0,1679
CG vs. CC	1,4927 (0,8604- 2,5402)	0,145	2,3034 (1,5381- 3,4635)	5,47e-05*	1,5502 (0,9088- 2,7025)	0,1137

OR: Odds Ratio; IC95%: Intervalo de confiança 95%

* p-valor com significância para α (0,05/7) = 0,0071

Os resultados em **negrito** representam dados estatisticamente significantes após o ajuste do p-valor por Bonferroni. Os resultados sublinhados representam dados inicialmente estatisticamente significativos (p-valor <0,05) que não sobreviveram à correção por Bonferroni.

A análise realizada entre os pacientes com DMRI seca e os controles não demonstrou significância estatística nas comparações entre os genótipos GG versus CC (OR 1,0112; p-valor = 0,9842; IC95 0,3064-2,8843) e CG versus CC (OR 1,7680; p-valor = 0,0202; IC95 1,0884-2,8536) (**Tabela 16**).

Na análise entre o subgrupo casos com forma úmida e controles observou-se significância estatística na comparação genotípica de GG versus CC (OR 3,0713; p-valor 0,0046; IC95 1,4205-6,8128) e CG versus CC (OR 2,2249; p-valor 0,0002; IC95 1,4605-3,3971) (**Tabela 16**).

Na análise entre os subgrupos casos com forma úmida e casos com forma seca não houve diferença estatística nas comparações genotípicas realizadas: GG

versus CC (OR 2,6074; p-valor = 0,0686; IC95 0,9931-8,1590) e CG versus CC (OR 1,1837; p-valor = 0,4983; IC95 0,7285-1,9373) (**Tabela 16**).

Tabela 16. Comparação de genótipos para a variante rs2230199 após a estratificação dos pacientes com DMRI nas formas seca e úmida da doença, por meio de regressão logística ajustada para idade.

Comparação	DMRI seca vs. controles		DMRI úmida vs. controles		DMRI úmida vs. seca	
	OR (IC95%)	p-valor*	OR (IC95%)	p-valor*	OR (IC95%)	p-valor*
GG vs. CC	1,0112 (0,3064-2,8843)	0,9842	3,0713 (1,4205-6,8128)	0,0046*	2,6074 (0,9931-8,1590)	0,0686
CG vs. CC	<u>1,7680</u> <u>(1,0884-2,8536)</u>	<u>0,0202</u>	2,2249 (1,4605-3,3971)	0,0002*	1,1837 (0,7285-1,9373)	0,4983

OR: Odds Ratio; IC95%: Intervalo de confiança 95%

* p-valor com significância para $\alpha (0,05/7) = 0,0071$

Os resultados em **negrito** representam dados estatisticamente significantes após o ajuste do p-valor por Bonferroni. Os resultados sublinhados representam dados inicialmente estatisticamente significativos (p-valor <0,05) que não sobreviveram à correção por Bonferroni.

4.3.2- Avaliação por alelo

A avaliação da distribuição alélica na população estudada revela a presença do alelo G em 23,99% e do alelo C em 77,01% dos pacientes no grupo caso. Enquanto no grupo controle, o alelo G esteve presente em 13,79% dos pacientes e o C, em 86,21%. A distribuição dos alelos G e C da variante rs2230199 segundo a estratificação quanto às formas de apresentação da DMRI está disponibilizada na **Tabela 17**.

Tabela 17. Distribuição dos alelos G e C da variante rs2230199 nos grupos e subgrupos de pacientes estudados.

Grupo avaliado	Frequência do alelo G	Frequência do alelo C
Controle	104 (13,79%)	650 (86,21%)
Caso	149 (23,99%)	499 (77,01%)
DMRI forma seca	65 (19,23%)	273 (80,77%)
DMRI forma úmida	124 (24,03%)	392 (75,97%)
DMRI não avançada	33 (17,55%)	155 (82,45%)
DMRI avançada	116 (25,22%)	344 (74,78%)

A comparação alélica mostrou uma maior frequência do alelo G no grupo caso em relação ao controle, apresentando significância estatística (OR 1,7180; p-valor = 0,0001; IC95% 1,2999-2,2876), reforçando o papel de risco do alelo na DMRI (**Tabela 18**).

Ao avaliar as formas de apresentação da DMRI houve significância estatística na comparação da frequência de alelos na forma úmida versus controle (OR 1,9549; p-valor 2,30e-05; IC95 1,4373-2,6774). Não houve diferença estatística nas comparações entre as formas seca e úmida da doença e entre a forma seca versus controle (**Tabela 18**).

Em relação à gravidade da doença, houve significância estatística para a comparação entre casos de doença avançada versus controles (OR 1,7180; p-valor = 0,0001; IC95% 1,2999-2,2876). Não houve diferença estatisticamente significativa na avaliação da frequência de alelos nas comparações entre casos avançados e não avançados, e entre a forma não-avançada em relação aos controles (**Tabela 18**).

Tabela 18. Comparação das frequências alélicas da variante rs2230199 entre os diferentes grupos avaliados, utilizando-se o teste de qui-quadrado.

Grupos comparados (GxC)	OR	IC95%	p-valor
Casos x controles	1,7180	1,2999-2,2876	0,0001*
Seca x Controles	1,3662	0,9362-1,9809	0,101
Úmida x Controle	1,9549	1,4373-2,6774	2,30e-05*
Úmida x Seca	1,3804	0,9588-2,0156	0,088
Não avançada x Controle	1,2832	0,8423-1,9195	0,233
Avançada x Controle	1,7180	1,2999-2,2876	0,0001*
Avançada x Não Avançada	1,5186	1,0102-2,3458	0,051

OR: Odds Ratio; IC95%: Intervalo de confiança 95%

* p-valor com significância para $\alpha (0,05/7) = 0,0071$

Os resultados em **negrito** representam dados estatisticamente significantes após o ajuste do p-valor por Bonferroni. Os resultados sublinhados representam dados inicialmente estatisticamente significativos (p-valor <0,05) que não sobreviveram à correção por Bonferroni.

5- DISCUSSÃO

A probabilidade de desenvolvimento da DMRI aumenta exponencialmente com o envelhecimento. Projeta-se um salto em sua prevalência com o aumento da expectativa de vida. Configura-se como a principal causa de cegueira em maiores de 60 anos, em países desenvolvidos,¹ sendo responsável por queda na qualidade de vida em pacientes portadores, bem como impactos psiquiátricos e socioeconômicos.

A patogênese, apesar de pouco elucidada, tem como cerne os fatores genéticos, responsáveis por mais de 70% da probabilidade de desenvolver a forma avançada da doença. As variantes genéticas localizadas nos genes do sistema complemento (*CFH*, *C2/CFB*, *C3* e *CFI*) correspondem a mais que 50% de todas variantes conhecidas, sendo essa via biológica a principal envolvida na fisiopatologia da DMRI.⁶⁶

O sistema complemento é constituído por mais de 40 proteínas e reguladores encontrados na circulação sistêmica, apresentando função primordial na defesa contra patógenos, na eliminação de complexos imunológicos e células apoptóticas e na resposta de adaptação imunológica.^{80,81} A desregulação desta via leva a uma ativação do sistema complemento e conseqüentemente a danos celulares e teciduais em nível de complexo EPR-Bruch e na coriocapilar, relacionados à manifestação e progressão da DMRI.

O estudo foi realizado com o objetivo de compreender o papel das variantes de risco, rs1410996 e rs2230199, relacionadas à DMRI em uma amostra da população brasileira e compará-las a outras etnias, já que estudos prévios mostram que as variantes apresentam particularidades regionais.

5.1- Variante rs1410996 (gene *CFH*)

Nosso estudo apresentou associação de risco significativa entre a DMRI e a variante rs1410996, consistente com os achados encontrados na literatura.

Comparando-se a uma metanálise⁸² que avaliou as principais variantes de risco no gene *CFH*, incluindo a variante rs1410996, pode-se observar uma concordância entre os resultados (casos com DMRI versus controles). O OR para a variante em estudo foi 1,77 na comparação alélica (G x A), semelhante ao do nosso estudo, com OR 1,40. A estratificação em grupos étnicos, na metanálise, mostrou uma associação mais forte em caucasianos (OR 2,38) em relação a asiáticos (OR 1,53) (**Tabela 19**). Por ser o primeiro estudo em uma amostra da população brasileira, ainda há poucos dados para comparação nesse grupo étnico; no entanto, os resultados são compatíveis com avaliações em outras populações e com associação de risco relativamente mais fraca em relação às etnias avaliadas nessa metanálise.

Tabela 19. Análise comparativa da variante rs1410996 entre casos e controles em subgrupos étnicos⁸² na comparação alélica.

Comparação Alélica	Subgrupo	Odds Ratio (OR)	Intervalo de confiança 95% (IC95%)	p-valor
G x A	Geral ⁸²	1,77	1,47-2,12	<0,0001
	Caucasiano ⁸²	2,38	2,14-2,66	<0,0001
	Asiático ⁸²	1,53	1,27-1,86	<0,0001
	Amostra Brasileira	1,40	1,13-1,74	0,0021

Os resultados em **negrito** relacionam-se à amostra brasileira em estudo.

A amostra estudada, apesar de acompanhar a tendência de outras populações, apresenta resultados mais similares à amostra asiática em relação à caucasiana, em que a força de associação é bem mais expressiva. Na metanálise da população asiática realizada por Zhou⁸³, 2016, as comparações alélicas e genotípicas em homozigose revelaram um risco aumentado de desenvolvimento da DMRI, com valores similares ao da nossa amostra (**Tabela 20**).

Tabela 20. Análise comparativa da variante rs1410996 entre casos e controles em uma amostra da população brasileira e asiática⁸³ na comparação alélica e dos genótipos GG x AA.

Análise	Subgrupo	Odds ratio (OR)	Intervalo de confiança de 95% (IC95%)	p-valor
G x A	Brasileiro	1,40	1,13-1,74	0,0021
	Asiático ⁸³	1,48	1,17-1,87	< 0,001
GG x AA	Brasileiro	1,82	1,17-2,83	0,0079
	Asiático ⁸³	2,10	1,27-3,49	< 0,001

Os resultados em **negrito** relacionam-se à amostra brasileira em estudo.

Ao analisar a forma exsudativa da DMRI pode-se observar uma frequência alélica semelhante à de outras populações. A frequência do alelo de risco G foi 63,46% nos casos e 53,03% nos controles no presente estudo, com similaridade à encontrada em japoneses (66,80% nos casos e 50,40% nos controles),⁸⁴ chineses (72% nos casos e 55,6% nos controles)⁸⁵ e caucasianos (80,80% e 57,10% respectivamente).⁸⁶ Do mesmo modo, houve significância estatística nas análises comparativas entre os alelos G x A e genótipos GG x AA comparável ao observado na população asiática⁸³ (**Tabela 21**).

Tabela 21. Análise comparativa da variante rs1410996 entre casos com DMRI exsudativa e controles em uma amostra da população brasileira e asiática⁽⁸³⁾ nas comparações entre alelos (G x A) e genótipos em homozigose (GG x AA).

Análise	Subgrupo	Odds ratio (OR)	Intervalo de confiança de 95% (IC95%)	p-valor
G x A	Brasileiro	1,57	1,21-2,04	0,0006
	Asiático ⁸³	1,58	1,15–2,18	0,004
GG x AA	Brasileiro	2,16	1,29-3,71	0,0039
	Asiático ⁸³	2,49	1,28–4,84	0,007

Os resultados em **negrito** relacionam-se à amostra brasileira em estudo.

A amostra estudada apresenta resultados que vão ao encontro de outras etnias previamente analisadas, com uma força de associação mais próxima à etnia

asiática que a caucasiana, como foi observado ao avaliar casos x controles e forma úmida da doença x controles. O estudo de *Giollo et cols* mostrou de forma objetiva que nossa população tem características únicas que a diferenciam das outras populações avaliadas para esta variante. A distribuição de marcadores de ancestralidade é diferente das observadas nas populações caucasianas e asiáticas o que replica e reforça a participação desta variante no risco aumentado de DMRI, em uma população miscigenada.⁸⁷

O *CFH* é um importante regulador da via alternativa do sistema complemento, evitando a formação da C3 convertase e atuando como cofator para o CFI, outro inibidor do C3b. Acredita-se que essa variante presente no gene *CFH* seja responsável por uma ativação descontrolada do C3, levando a uma exacerbada e contínua atividade da via alternativa do sistema complemento, que causa danos teciduais, devido a intensa atividade inflamatória. O comportamento dessa variante, no entanto, não é bem elucidado, mas há a hipótese que ela seja responsável pela regulação da expressão do *CFH*, ao invés de interromper a função da proteína CFH.⁶⁹ O fato desta variante se mostrar associada de forma mais significativa na DMRI úmida em nossa casuística, sugere que seu papel possa ser mais relacionado com esta forma de manifestação da DMRI e envolvido na fisiopatologia deste fenótipo da doença. Além disso, outras variantes do gene *CFH*, como a Y402H foi associada a pior resposta ao tratamento com anti-VEGF, em várias populações incluindo a brasileira.⁸⁸

5.2- Variante rs2230199 (gene C3)

O cálculo do equilíbrio de Hardy-Weinberg realizado nos grupos caso ($p=0,065$) e controle ($p=0,011$) demonstra que o grupo controle não estava em equilíbrio.

A lei do equilíbrio de Hardy-Weinberg afirma que se não existissem fatores evolutivos atuando sobre uma população, as frequências gênicas permaneceriam inalteradas e as proporções genotípicas atingiriam um equilíbrio estável, mostrando a mesma relação constante entre si ao longo do tempo. A fim de que esse princípio seja seguido necessita-se de uma população teórica obedecendo as premissas: população infinita; quantidade semelhante entre homens e mulheres; população em panmixia, ou seja, os casamentos ocorrem aleatoriamente (não há casamentos preferenciais entre indivíduos por causa de seu genótipo, fenótipo, estratificação social ou consanguinidade); todos casais são férteis e geram o mesmo número de filhos, não ocorrendo sobreposição de gerações; os genes não sofrem mutação; ausência de seleção natural; a população não recebe nem emite um fluxo gênico capaz de alterar a sua composição gênica original, porque ela não sofre miscigenação com uma população imigrante que apresenta frequências gênicas diferentes da sua, nem há emigração diferencial, isto é, a saída de grupos de indivíduos com frequência gênica distinta do resto da população. Desse modo, as populações mostrariam uma fixidez genética, ou inércia evolutiva.⁸⁹

No entanto, as populações reais se sujeitam a fatores evolutivos, ou seja, aqueles capazes de alterar as frequências gênicas (mutações, seleção natural, fluxo gênico de populações migrantes e deriva genética) e os fatores que causam o aumento de homozigose (endocruzamento - casamentos consanguíneos, e subdivisão da população em grandes grupos isolados).

Alguns fatores podem ser responsáveis por um desequilíbrio populacional segundo o princípio de Hardy-Weinberg como:

- 1- Mutações: os efeitos cumulativos da mutação são importantes para compreender os padrões do desequilíbrio de ligação, pois *loci* que estão fortemente ligados a mutações vantajosas podem aumentar rapidamente em frequência através de “carona genética”.
- 2- População finita: há uma tendência em produzir um maior número de heterozigotos em relação ao preconizado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg, que ocorre geralmente quando existe uma diferença de frequência no alelo entre os sexos.

- 3- Seleção natural: opera por meio da sobrevivência e/ou reprodução de indivíduos com diferentes genótipos, podendo distorcer as frequências genotípicas. Ocorre, mais provavelmente, se a seleção favorecer a heterozigose (sobredominância) ou a homozigose (subdominância), em contraste com a seleção direcional a favor ou contra um alelo específico.
- 4- Estrutura populacional: as frequências podem ser alteradas quando a população selecionada se encontra em migração num mesmo tempo e local onde múltiplas populações se sobreponham.
- 5- Estrutura etária: a fim de evitar deficiência de heterozigotos, a população não deve apresentar uma sobreposição de gerações, com indivíduos participando em mais de um ciclo reprodutivo.
- 6- Amostragem não randomizada: mesmo que o genótipo esteja em equilíbrio na população, eventualmente uma amostra dessa mesma população pode estar em desequilíbrio, seja por erro de randomização ou pelo fato de indivíduos com determinado genótipo terem uma maior/ menor probabilidade de serem selecionados.
- 7- Erro de genotipagem: mesmo com a tecnologia moderna e eficiente, esse erro não pode ser descartado. Na tentativa de eliminar erros de genotipagem, o sequenciamento foi realizado duas vezes e avaliado por três pessoas diferentes. Os testes duvidosos foram repetidos, e caso a dúvida permanecesse a amostra não foi incluída na análise.

Segundo Waples 1998 e Hendrick 1999,^{90,91} apesar de os testes estatísticos exercerem um papel fundamental na identificação de desvios, em amostras relativamente grandes podem ocorrer desvios significantes ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, mas que apresentam pouca importância biológica. O desequilíbrio populacional deve ser reportado e analisado, porém se os resultados encontrados forem robustos e condizentes com estudos prévios, deve-se desconsiderar tal achado.

O nosso estudo revelou uma associação de risco significativa da variante rs2230199 para o desenvolvimento DMRI ao comparar os casos com a patologia e os controles na comparação alélica (OR 1,71; p-valor = 0,0001; IC95% 1,29-2,28), similar a estudos prévios realizados em irlandeses (OR 1,48; p-valor 0,0003; IC95% 1,19-1,85),⁹² mexicanos (OR 2,15, p-valor <0,0001; IC95% 1,48-3,13),⁹³ gregos (OR 1,82; p-valor 0,0024; IC95% 1,24-2,69),⁹⁴ e norte-americanos (OR 1,55; p-valor 0,015; IC95% 1,09-2,21)⁹⁵. É bem consolidada na literatura a associação entre essa variante

e a DMRI em caucasianos nos diferentes modelos genéticos. No entanto, essa variante não é estatisticamente significativa ao analisar amostras da população asiática^{95,96,97,98} devido à baixa frequência do alelo nessa etnia, chegando a ser ausente em japoneses⁹⁹ e raro em chineses (<1%),^{96,98} enquanto em caucasianos apresenta uma frequência de 20%.⁹⁵ Na metanálise de Zhang 2015,⁷⁸ tais evidências são ratificadas na comparação alélica em asiáticos e caucasianos (**tabela 22**).

Tabela 22. Análise comparativa da variante rs2230199 entre casos e controles em uma amostra da população brasileira e na metanálise de Zhang na população geral, em caucasianos e asiáticos na comparação alélica.

Análise	Subgrupo	Odds ratio (OR)	Intervalo de confiança de 95% (IC95%)	p-valor
G x C	Brasileiro	1,71	1,29-2,28	0,0001
	Geral ⁷⁸	1,59	1,47-1,73	< 0,0001
	Caucasiano ⁷⁸	1,60	1,47-1,74	< 0,0001
	Asiático ⁷⁸	1,36	0,69-2,69	0,37

Os resultados em **negrito** relacionam-se à amostra brasileira em estudo.

A análise do subgrupo avançado versus controles apresentou uma similaridade entre a amostra estudada e a etnia caucasiana, enquanto a população asiática não apresentou resultados estatisticamente significantes. Na metanálise Zhang, 2018,¹⁰⁰ na comparação alélica G x C, na população geral o OR foi 1,49; nos caucasianos, 1,48; no Oriente Médio, 1,62; e na amostra brasileira uma associação mais forte de 1,71. A mesma tendência foi seguida na comparação dos genótipos em homozigose (**Tabela 23**).

Tabela 23. Análise comparativa da variante rs2230199 entre casos com DMRI avançada e controles em uma amostra da população brasileira e na metanálise de Zhang, 2018, na população geral, em caucasianos, subgrupo Oriente Médio e asiáticos nas comparações alélica e genotípica em homozigose.

Análise	Subgrupo	Odds ratio (OR)	Intervalo de confiança de 95% (IC95%)	p-valor
G x C	Brasileiro	1,71	1,29-2,28	0,0001
	Geral ⁹⁷	1,49	1,39-1,59	<0,001
	Caucasiano ⁹⁷	1,48	1,38-1,59	<0,001
	Oriente Médio ⁹⁷	1,62	1,33-1,97	<0,001
	Asiático ⁹⁷	1,11	0,56-2,20	0,76
GG x CC	Brasileiro	2,30	1,53-3,46	5,47e-05*
	Geral ⁹⁷	2,33	1,98-2,74	<0,001
	Caucasiano ⁹⁷	2,20	1,87-2,60	<0,001

Os resultados em **negrito** relacionam-se à amostra brasileira em estudo.

O C3 é o componente mais abundante do sistema complemento e uma quantidade significativa de RNA mensageiro do mesmo é detectado na retina neurosensorial, coróide e EPR. O C3 nativo clivado sofre importantes mudanças e rearranjos estruturais aumentando os sítios de ligação para componentes do complemento e consequentemente ativando sua cascata e uma resposta inflamatória local, primordiais na patogênese da DMRI.¹⁰¹

O nosso estudo mostra-se com resultados compatíveis com a etnia caucasiana, divergindo-se em relação a população asiática. Na nossa amostra, o alelo de risco apresentou uma frequência de 23,99% nos casos e 13,79% nos controles, bastante elevada comparável a japoneses⁹⁹ e chineses,^{96,98} em que a frequência é nula e menor que 1 %, respectivamente, justificando os achados divergentes dessa variante nas diferentes etnias e a heterogeneidade na distribuição geográfica.

Como observado na variante rs1410996 do gene *CFH*, a variante rs2230199 do gene *C3* apresentou-se de forma mais significativa, associada ao fenótipo úmido da DMRI em nossa amostra. Isto sugere também uma maior participação desta variante no mecanismo da forma exsudativa da doença. Assim

como na variante rs1410996, seria interessante avaliar a resposta desta variante em relação à terapia anti-angiogênica na nossa população.

As limitações deste estudo dizem respeito a esta amostra ser representativa da população do sudeste do Brasil, tornando-se necessário mais estudos incluindo pacientes de outras regiões. O desequilíbrio de HWE pode ser um fator de limitação, até justificando que a forma heterozigota da variante rs2230199 do gene C3 esteja associada de forma mais significativa com a DMRI do que o genótipo homozigoto do alelo de risco. Finalizando, uma amostra maior poderia encontrar associações entre as diferentes formas de apresentação da doença.

Este estudo está inserido em uma linha de pesquisa para estabelecer as bases genéticas da DMRI na população brasileira e no futuro desenvolver testes incluindo simultaneamente várias variantes de risco testadas em nossa população para o estabelecimento de um escore de risco genético de DMRI na população brasileira.

6- CONCLUSÃO

Conclui-se que as variantes genéticas rs1410996 (gene *CFH*) e rs2230199 (gene *C3*) conferem risco ao desenvolvimento da DMRI nessa amostra da população brasileira, particularmente na forma úmida/exsudativa da doença.

A análise da variante rs1410996 mostrou que indivíduos que possuem o alelo de risco em homozigose (GG) apresentam 2,12 vezes mais chance de apresentar a forma avançada da DMRI (graus 4 e 5 da classificação *CARMS*) e 2,16 vezes mais chance de apresentar a forma úmida da doença (grau 5 da classificação *CARMS*) quando comparados a indivíduos com genótipo sem o alelo de risco (AA). Do mesmo modo, a comparação alélica G vs. A mostrou que indivíduos que carregam o alelo de risco têm maior probabilidade de manifestarem o fenótipo da DMRI nas formas avançada e úmida da doença.

A análise da variante rs2230199 mostrou que o genótipo heterozigoto (CG) conferiu um maior risco à manifestação da DMRI, que o homozigoto (GG) quando comparado ao genótipo em homozigose com o alelo selvagem (CC). O mesmo foi evidenciado em relação à forma de apresentação e à gravidade da doença, em que o genótipo heterozigoto conferiu 2,3 e 2,2 vezes mais chance de apresentar a forma avançada e úmida da DMRI, respectivamente, quando comparado ao genótipo CC. A avaliação alélica G vs. C corroborou com a maior probabilidade de manifestação dessas formas da DMRI em indivíduos que carregam o alelo de risco.

A variante rs1410996 apresentou uma força de associação inferior à observada em caucasianos, e próxima à encontrada na população asiática. A variante rs2230199, apesar de não apresentar o grupo controle em equilíbrio, mostrou uma forte associação com a patologia, inclusive mais intensa que a descrita previamente em caucasianos. Por ser o primeiro estudo realizado em uma amostra da população brasileira, não há nenhuma referência comparativa nessa etnia, e uma amostra maior deve ser avaliada a fim de confirmar os dados encontrados.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lim LS, Mitchell P, Seddon JM, Holz FG, Wong TY. Age-related macular degeneration. *Lancet*. 2012 May 5;379(9827):1728-38.
2. Campochiaro PA. Retinal and choroidal neovascularization. *J Cell Physiol*. 2000 Sep;184(3):301-10.
3. de Jong PT. Age-related macular degeneration. *N Engl J Med*. 2006 Oct 5;355(14):1474-85.
4. Klein R, Cruickshanks KJ, Nash SD, Krantz EM, Nieto FJ, Huang GH, Pankow JS, Klein BE. The prevalence of age-related macular degeneration and associated risk factors. *Arch Ophthalmol*. 2010 Jun;128(6):750-8.
5. Smith W, Assink J, Klein R, Mitchell P, Klaver CC, Klein BE, Hofman A, Jensen S, Wang JJ, de Jong PT. Risk factors for age-related macular degeneration: Pooled findings from three continents. *Ophthalmology*. 2001 Apr;108(4):697-704.
6. Bird AC, Bressler NM, Bressler SB, Chisholm IH, Coscas G, Davis MD, de Jong PT, Klaver CC, Klein BE, Klein R, et al. An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. The International ARM Epidemiological Study Group. *Surv Ophthalmol*. 1995 Mar-Apr;39(5):367-74.
7. Dunaief JL, Dentchev T, Ying GS, Milam AH. The role of apoptosis in age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol*. 2002 Nov;120(11):1435-42.
8. Bressler SB, Bressler NM, Fine SL, Hillis A, Murphy RP, Olk RJ, Patz A. Natural course of choroidal neovascular membranes within the foveal avascular zone in senile macular degeneration. *Am J Ophthalmol*. 1982 Feb;93(2):157-63.
9. Wong WL, Su X, Li X, Cheung CM, Klein R, Cheng CY, Wong TY. Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health*. 2014 Feb;2(2):e106-16.
10. Friedman DS, O'Colmain BJ, Muñoz B, Tomany SC, McCarty C, de Jong PT, Nemesure B, Mitchell P, Kempen J; Eye Diseases Prevalence Research Group. Prevalence of age-related macular degeneration in the United States. *Arch Ophthalmol*. 2004 Apr;122(4):564-72. doi: 10.1001/archophth.122.4.564. Erratum in: *Arch Ophthalmol*. 2011 Sep;129(9):1188.

11. Rein DB, Wittenborn JS, Zhang X, et al. Forecasting age-related macular degeneration through the year 2050: the potential impact of new treatments. *Arch Ophthalmol*. 2009;127(4):533-540.
12. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Censo demográfico. 2006
13. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Censo demográfico. 2019
14. <https://www.iapb.org/wp-content/uploads/2020/09/world-vision-report-accessible1.pdf>
15. Mitchell J, Bradley C. Quality of life in age-related macular degeneration: a review of the literature. *Health Qual Life Outcomes*. 2006 Dec 21;4:97.
16. Wood JM, Lacherez P, Black AA, Cole MH, Boon MY, Kerr GK. Risk of falls, injurious falls, and other injuries resulting from visual impairment among older adults with age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011 Jul 7;52(8):5088-92.
17. Woo SJ, Park KH, Ahn J, Choe JY, Jeong H, Han JW, Kim TH, Kim KW. Cognitive impairment in age-related macular degeneration and geographic atrophy. *Ophthalmology*. 2012 Oct;119(10):2094-101. doi:10.1016/j.ophtha.2012.04.026. Epub 2012 Jun 15. Erratum in: *Ophthalmology*. 2013 Jan;120(1):210.
18. Bird AC, Bressler NM, Bressler SB, Chisholm IH, Coscas G, Davis MD, de Jong PT, Klaver CC, Klein BE, Klein R, et al. An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. The International ARM Epidemiological Study Group. *Surv Ophthalmol*. 1995 Mar-Apr;39(5):367-74.
19. Gass JD. Drusen and disciform macular detachment and degeneration. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 1972;70:409-36.
20. Bressler NM, Bressler SB, Fine SL. Age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol*. 1988 May-Jun;32(6):375-413.
21. Age-Related Eye Disease Study Research Group. The Age-Related Eye Disease Study system for classifying age-related macular degeneration from stereoscopic color fundus photographs: the Age-Related Eye Disease Study Report Number 6. *Am J Ophthalmol*. 2001 Nov;132(5):668-81.
22. Age-Related Eye Disease Study Research Group. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E,

- beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS report no. 8. *Arch Ophthalmol*. 2001 Oct;119(10):1417-36. doi: 10.1001/archophth.119.10.1417. Erratum in: *Arch Ophthalmol*. 2008 Sep;126(9):1251.
23. Seddon JM, Sharma S, Adelman RA. Evaluation of the clinical age-related maculopathy staging system. *Ophthalmology*. 2006 Feb;113(2):260-6.
 24. Kijlstra A, Berendschot TT. Age-related macular degeneration: a complementopathy? *Ophthalmic Res*. 2015;54(2):64-73.
 25. Green WR, McDonnell PJ, Yeo JH. Pathologic features of senile macular degeneration. *Ophthalmology*. 1985 May;92(5):615-27.
 26. Pauleikhoff D, Harper CA, Marshall J, Bird AC. Aging changes in Bruch's membrane. A histochemical and morphologic study. *Ophthalmology*. 1990 Feb;97(2):171-8.
 27. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev*. 2004 Aug;25(4):581-611.
 28. Adamis AP, Shima DT. The role of vascular endothelial growth factor in ocular health and disease. *Retina*. 2005 Feb-Mar;25(2):111-8.
 29. Anderson DH, Mullins RF, Hageman GS, Johnson LV. A role for local inflammation in the formation of drusen in the aging eye. *Am J Ophthalmol*. 2002 Sep;134(3):411-31.
 30. Reynolds R, Hartnett ME, Atkinson JP, Giclas PC, Rosner B, Seddon JM. Plasma complement components and activation fragments: associations with age-related macular degeneration genotypes and phenotypes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009 Dec;50(12):5818-27.
 31. Loyet KM, Deforge LE, Katschke KJ Jr, Diehl L, Graham RR, Pao L, Sturgeon L, Lewin-Koh SC, Hollyfield JG, van Lookeren Campagne M. Activation of the alternative complement pathway in vitreous is controlled by genetics in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012 Sep 25;53(10):6628-37.
 32. Parsons N, Annamalai B, Obert E, Schnabolk G, Tomlinson S, Rohrer B. Inhibition of the alternative complement pathway accelerates repair processes in the murine model of choroidal neovascularization. *Mol Immunol*. 2019 Apr;108:8-12.

33. Silva AS, Teixeira AG, Bavia L, Lin F, Velletri R, Belfort R Jr, Isaac L. Plasma levels of complement proteins from the alternative pathway in patients with age-related macular degeneration are independent of Complement Factor H Tyr⁴⁰²His polymorphism. *Mol Vis*. 2012;18:2288-99. Epub 2012 Aug 30.
34. Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, Tsai JY, Sackler RS, Haynes C, et al. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science*. 2005 Apr 15;308(5720):385-9.
35. Lambert NG, ElShelmani H, Singh MK, Mansergh FC, Wride MA, Padilla M, et al. Risk factors and biomarkers of age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res*. 2016 Sep;54:64-102.
36. Klein R, Klein BE, Linton KL. Prevalence of age-related maculopathy. The Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology*. 1992 Jun;99(6):933-43.
37. Mitchell P, Smith W, Attebo K, Wang JJ. Prevalence of age-related maculopathy in Australia. The Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology*. 1995 Oct;102(10):1450-60.
38. Natl. Eye Inst. 2014. Age-related macular degeneration (AMD). Natl. Eye Inst., Bethesda, MD. [http:// www.nei.nih.gov/eyedata/amd.asp](http://www.nei.nih.gov/eyedata/amd.asp).
39. Vingerling JR, Dielemans I, Hofman A, Grobbee DE, Hijmering M, Kramer CF, et al. The prevalence of age-related maculopathy in the Rotterdam Study. *Ophthalmology*. 1995 Feb;102(2):205-10.
40. Grassmann F, Friedrich U, Fauser S, Schick T, Milenkovic A, Schulz HL, et al. A Candidate Gene Association Study Identifies DAPL1 as a Female-Specific Susceptibility Locus for Age-Related Macular Degeneration (AMD). *Neuromolecular Med*. 2015 Jun;17(2):111-20.
41. Bressler SB, Muñoz B, Solomon SD, West SK; Salisbury Eye Evaluation (SEE) Study Team. Racial differences in the prevalence of age-related macular degeneration: the Salisbury Eye Evaluation (SEE) Project. *Arch Ophthalmol*. 2008 Feb;126(2):241-5.
42. Friedman DS, Katz J, Bressler NM, Rahmani B, Tielsch JM. Racial differences in the prevalence of age-related macular degeneration: the Baltimore Eye Survey. *Ophthalmology*. 1999 Jun;106(6):1049-55.
43. Clemons TE, Milton RC, Klein R, Seddon JM, Ferris FL 3rd; Age-Related Eye Disease Study Research Group. Risk factors for the incidence of Advanced

- Age-Related Macular Degeneration in the Age-Related Eye Disease Study (AREDS) AREDS report no. 19. *Ophthalmology*. 2005 Apr;112(4):533-9.
44. Evans JR, Fletcher AE, Wormald RP. 28,000 Cases of age related macular degeneration causing visual loss in people aged 75 years and above in the United Kingdom may be attributable to smoking. *Br J Ophthalmol*. 2005 May;89(5):550-3.
45. Seddon JM, Willett WC, Speizer FE, Hankinson SE. A prospective study of cigarette smoking and age-related macular degeneration in women. *JAMA*. 1996 Oct 9;276(14):1141-6.
46. Age-Related Eye Disease Study Research Group. 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 Dec;107(12):2224-32.
47. Delcourt C, Diaz JL, Ponton-Sanchez A, Papoz L. Smoking and age-related macular degeneration. The POLA Study. *Pathologies Oculaires Liées à l'Age*. *Arch Ophthalmol*. 1998 Aug;116(8):1031-5.
48. Klein R, Klein BE, Tomany SC, Moss SE. Ten-year incidence of age-related maculopathy and smoking and drinking: the Beaver Dam Eye Study. *Am J Epidemiol*. 2002 Oct 1;156(7):589-98.
49. Tomany SC, Wang JJ, Van Leeuwen R, Klein R, Mitchell P, Vingerling JR, Klein BE, Smith W, De Jong PT. Risk factors for incident age-related macular degeneration: pooled findings from 3 continents. *Ophthalmology*. 2004 Jul;111(7):1280-7.
50. Zhou H, Zhang H, Yu A, Xie J. Association between sunlight exposure and risk of age-related macular degeneration: a meta-analysis. *BMC Ophthalmol*. 2018 Dec 20;18(1):331.
51. Biomarkers Definitions Working Group.. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*. 2001 Mar;69(3):89-95.
52. Seddon JM, Cote J, Rosner B. Progression of age-related macular degeneration: association with dietary fat, transunsaturated fat, nuts, and fish intake. *Arch Ophthalmol*. 2003 Dec;121(12):1728-37. doi: 10.1001/archophth.121.12.1728. Erratum in: *Arch Ophthalmol*. 2004 Mar;122(3):426.

53. Seddon JM, Reynolds R, Shah HR, Rosner B. Smoking, dietary betaine, methionine, and vitamin D in monozygotic twins with discordant macular degeneration: epigenetic implications. *Ophthalmology*. 2011 Jul;118(7):1386-94.
54. Age-Related Eye Disease Study 2 (AREDS2) Research Group, Chew EY, SanGiovanni JP, Ferris FL, Wong WT, Agron E, Clemons TE, et al. Lutein/zeaxanthin for the treatment of age-related cataract: AREDS2 randomized trial report no. 4. *JAMA Ophthalmol*. 2013 Jul;131(7):843-50.
55. Al-Zamil WM, Yassin SA. Recent developments in age-related macular degeneration: a review. *Clin Interv Aging*. 2017 Aug 22;12:1313-1330.
56. Sperduto RD, Hiller R. Systemic hypertension and age-related maculopathy in the Framingham Study. *Arch Ophthalmol*. 1986 Feb;104(2):216-9.
57. Klein R, Klein BE, 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 Jun;110(6):1273-80.
58. Delcourt C, Michel F, Colvez A, Lacroux A, Delage M, Vernet MH; POLA Study Group. Associations of cardiovascular disease and its risk factors with age-related macular degeneration: the POLA study. *Ophthalmic Epidemiol*. 2001 Sep;8(4):237-49.
59. Swaroop A, Chew EY, Rickman CB, Abecasis GR. Unraveling a multifactorial late-onset disease: from genetic susceptibility to disease mechanisms for age-related macular degeneration. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2009;10:19-43.
60. François J. L'hérédité des dégénérescences maculaires séniles [The inheritance of senile macule degeneration]. *Ophthalmologica*. 1977;175(2):67-72. French.
61. den Dunnen JT, Antonarakis SE. Nomenclature for the description of human sequence variations. *Hum Genet*. 2001 Jul;109(1):121-4.
62. Liu MM, Chan CC, Tuo J. Genetic mechanisms and age-related macular degeneration: common variants, rare variants, copy number variations, epigenetics, and mitochondrial genetics. *Hum Genomics*. 2012 Aug 31;6(1):13. doi: 10.1186/1479-7364-6-13.

63. Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, Tsai JY, Sackler RS, Haynes C, et al. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science*. 2005 Apr 15;308(5720):385-9.
64. Fritsche LG, Chen W, Schu M, Yaspan BL, Yu Y, Thorleifsson G, et al; AMD Gene Consortium. Seven new loci associated with age-related macular degeneration. *Nat Genet*. 2013 Apr;45(4):433-9, 439e1-2.
65. Fritsche LG, Igl W, Bailey JN, Grassmann F, Sengupta S, Bragg-Gresham JL, et al. A large genome-wide association study of age-related macular degeneration highlights contributions of rare and common variants. *Nat Genet*. 2016 Feb;48(2):134-43.
66. Fritsche LG, Fariss RN, Stambolian D, Abecasis GR, Curcio CA, Swaroop A. Age-related macular degeneration: genetics and biology coming together. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2014;15:151-71.
67. van Lookeren Campagne M, Strauss EC, Yaspan BL. Age-related macular degeneration: Complement in action. *Immunobiology*. 2016 Jun;221(6):733-9.
68. Parmeggiani F, Sorrentino FS, Romano MR, Costagliola C, Semeraro F, Incorvaia C, et al. Mechanism of inflammation in age-related macular degeneration: an up-to-date on genetic landmarks. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:435607.
69. Li M, Atmaca-Sonmez P, Othman M, Branham KE, Khanna R, Wade MS, Li Y, et al. CFH haplotypes without the Y402H coding variant show strong association with susceptibility to age-related macular degeneration. *Nat Genet*. 2006 Sep;38(9):1049-54.
70. Maller J, George S, Purcell S, Fagerness J, Altshuler D, Daly MJ, Seddon JM. Common variation in three genes, including a noncoding variant in CFH, strongly influences risk of age-related macular degeneration. *Nat Genet*. 2006 Sep;38(9):1055-9.
71. Wu M, Guo Y, Ma Y, Zheng Z, Wang Q, Zhou X. Association of Two Polymorphisms, rs1061170 and rs1410996, in Complement Factor H with Age-Related Macular Degeneration in an Asian Population: A Meta-Analysis. *Ophthalmic Res*. 2016;55(3):135-44.
72. Gold B, Merriam JE, Zernant J, Hancox LS, Taiber AJ, Gehrs K, et al; AMD Genetics Clinical Study Group, Hageman GS, Dean M, Allikmets R. Variation in

- factor B (BF) and complement component 2 (C2) genes is associated with age-related macular degeneration. *Nat Genet.* 2006 Apr;38(4):458-62.
73. 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 Feb;50(2):533-9.
74. Yates JR, Sepp T, Matharu BK, Khan JC, Thurlby DA, Shahid H, et al; Genetic Factors in AMD Study Group. Complement C3 variant and the risk of age-related macular degeneration. *N Engl J Med.* 2007 Aug 9;357(6):553-61.
75. 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 Oct;39(10):1200-1.
76. Park KH, Fridley BL, Ryu E, Tosakulwong N, Edwards AO. Complement component 3 (C3) haplotypes and risk of advanced age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009 Jul;50(7):3386-93.
77. Francis PJ, Hamon SC, Ott J, Weleber RG, Klein ML. Polymorphisms in C2, CFB and C3 are associated with progression to advanced age related macular degeneration associated with visual loss. *J Med Genet.* 2009 May;46(5):300-7.
78. Zhang MX, Zhao XF, Ren YC, Geng TT, Yang H, Feng T, et al. Association between a functional genetic polymorphism (rs2230199) and age-related macular degeneration risk: a meta-analysis. *Genet Mol Res.* 2015 Oct 16;14(4):12567-76.
79. Maniatis, T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual.* 7 ed. Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. 545 p.
80. Walport MJ. Complement. First of two parts. *N Engl J Med.* 2001 Apr 5;344(14):1058-66.
81. Bradley DT, Zipfel PF, Hughes AE. Complement in age-related macular degeneration: a focus on function. *Eye (Lond).* 2011 Jun;25(6):683-93.
82. Liao X, Lan CJ, Cheuk IW, Tan QQ. Four complement factor H gene polymorphisms in association with AMD: A meta-analysis. *Arch Gerontol Geriatr.* 2016 May-Jun;64:123-9.
83. Wu M, Guo Y, Ma Y, Zheng Z, Wang Q, Zhou X. Association of Two Polymorphisms, rs1061170 and rs1410996, in Complement Factor H with Age-

- Related Macular Degeneration in an Asian Population: A Meta-Analysis. *Ophthalmic Res.* 2016;55(3):135-44.
84. Mori K, Gehlbach PL, Kabasawa S, Kawasaki I, Oosaki M, Iizuka H, et al. Coding and noncoding variants in the CFH gene and cigarette smoking influence the risk of age-related macular degeneration in a Japanese population. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007 Nov;48(11):5315-9.
85. Cui L, Zhou H, Yu J, Sun E, Zhang Y, Jia W, et al. Noncoding variant in the complement factor H gene and risk of exudative age-related macular degeneration in a Chinese population. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010 Feb;51(2):1116-20.
86. Maller J, George S, Purcell S, Fagerness J, Altshuler D, Daly MJ, et al. Common variation in three genes, including a noncoding variant in CFH, strongly influences risk of age-related macular degeneration. *Nat Genet.* 2006 Sep;38(9):1055-9.
87. Giolo SR, Soler JM, Greenway SC, Almeida MA, de Andrade M, Seidman JG, et al. Brazilian urban population genetic structure reveals a high degree of admixture. *Eur J Hum Genet.* 2012 Jan;20(1):111-6.
88. Medina FMC, Motta AALD, Takahashi WY, Carricondo PC, Motta MMDS, Melo MB, Vasconcellos JPC. Association of the CFH Y402H Polymorphism with the 1-Year Response of Exudative AMD to Intravitreal Anti-VEGF Treatment in the Brazilian Population. *Ophthalmic Res.* 2019;61(3):168-173.
89. Waples RS. Testing for Hardy-Weinberg proportions: have we lost the plot? *J Hered.* 2015 Jan-Feb;106(1):1-19.
90. Waples, RS. "Separating the wheat from the chaff: patterns of genetic differentiation in high gene flow species." *Journal of Heredity* 89.5 (1998).
91. Hedrick PW. Perspective: Highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution.* 1999 Apr;53(2):313-8.
92. McKay GJ, Dasari S, Patterson CC, Chakravarthy U, Silvestri G. Complement component 3: an assessment of association with AMD and analysis of gene-gene and gene-environment interactions in a Northern Irish cohort. *Mol Vis.* 2010 Feb 10;16:194-9.
93. Contreras AV, Zenteno JC, Fernández-López JC, Rodríguez-Corona U, Falfán-Valencia R, Sebastian L, et al. CFH haplotypes and ARMS2, C2, C3, and CFB

- alleles show association with susceptibility to age-related macular degeneration in Mexicans. *Mol Vis*. 2014 Jan 14;20:105-16.
94. Spencer KL, Olson LM, Anderson BM, Schnetz-Boutaud N, Scott WK, Gallins P, et al. C3 R102G polymorphism increases risk of age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet*. 2008 Jun 15;17(12):1821-4.
95. Thakkinstian A, McKay GJ, McEvoy M, Chakravarthy U, Chakrabarti S, Silvestri G, et al. Systematic review and meta-analysis of the association between complement component 3 and age-related macular degeneration: a HuGE review and meta-analysis. *Am J Epidemiol*. 2011 Jun 15;173(12):1365-79.
96. Pei XT, Li XX, Bao YZ, Yu WZ, Yan Z, Qi HJ, et al. Association of c3 gene polymorphisms with neovascular age-related macular degeneration in a chinese population. *Curr Eye Res*. 2009 Aug;34(8):615-22.
97. Goto A, Akahori M, Okamoto H, Minami M, Terauchi N, Haruhata Y, Obazawa M, et al. Genetic analysis of typical wet-type age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy in Japanese population. *J Ocul Biol Dis Infor*. 2009 Dec 22;2(4):164-175.
98. Liu X, Zhao P, Tang S, Lu F, Hu J, Lei C, et al. Association study of complement factor H, C2, CFB, and C3 and age-related macular degeneration in a Han Chinese population. *Retina*. 2010 Sep;30(8):1177-84.
99. Arakawa S, Takahashi A, Ashikawa K, Hosono N, Aoi T, Yasuda M, et al. Genome-wide association study identifies two susceptibility loci for exudative age-related macular degeneration in the Japanese population. *Nat Genet*. 2011 Sep 11;43(10):1001-4.
100. Zhang J, Li S, Hu S, Yu J, Xiang Y. Association between genetic variation of complement C3 and the susceptibility to advanced age-related macular degeneration: a meta-analysis. *BMC Ophthalmol*. 2018 Oct 23;18(1):274.
101. Janssen BJ, Christodoulidou A, McCarthy A, Lambris JD, Gros P. Structure of C3b reveals conformational changes that underlie complement activity. *Nature*. 2006 Nov 9;444(7116):213-6.

8. Anexos

8.1 Anexo 1: Parecer Consubstanciado do CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: ASPECTOS GENÉTICOS DE DOENÇAS OFTALMOLÓGICAS

Pesquisador: Mônica Barbosa de Melo

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 6

CAAE: 49120615.4.0000.5404

Instituição Proponente: Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA EDUCACAO
FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO
MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.327.027

Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma emenda que visa inserir os pesquisadores Marina Gonçalves Monteiro Viturino e Jamil Miguel Neto como membros da equipe de pesquisa e inserir dois novos subprojetos ao projeto original.

Objetivo da Pesquisa:

Mantidos em relação ao projeto original.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Mantidos em relação ao projeto original.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Segundo informações contempladas no documento anexo "PB_INFORMAÇÕES BÁSICAS_1004710_E5.pdf 28/09/2017 13:24:59": "O projeto inicial está sendo modificado para a inclusão de dois novos sub-projetos de pesquisa de alunos que estão ingressando na pós-graduação pelo PPG Ciências Médicas.". Destacamos que o objetivo principal do projeto original não foi alterado e os dois subprojetos se enquadra nestes objetivos.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.527.027

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Para avaliação desta emenda foram analisados os seguintes documentos anexados:

- 1-PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1004710_E5.pdf 28/09/2017 13:24:59;
- 2-ASPECTOS_GENETICOS_DE_DOENCAS_OFTALMOLOGICAS0917.pdf 28/09/2017 13:20:54;
- 3-TCLE_ofthalmo0917.pdf 28/09/2017 13:20:09

Recomendações:

De forma a garantir a integridade dos TCLE, os documentos devem apresentar a numeração das páginas. Solicita-se inserir a numeração das páginas, de forma a indicar, também, o número total de páginas, por exemplo: 1 de 2; 2 de 2. Solicita-se adequação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovada.

Considerações Finais a critério do CEP:

- O participante da pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (quando aplicável).
- O participante 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 (quando aplicável).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. 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.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
 UF: SP Município: CAMPINAS
 Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.327.027

- 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 e aguardando a aprovação do CEP para continuidade da pesquisa. Em caso de projetos 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.

- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

- Lembramos que segundo a Resolução 466/2012, item XI.2 letra e, "cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento".

- O pesquisador deve manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1004710_E5.pdf	28/09/2017 13:24:59		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ASPECTOS_GENETICOS_DE_DOENCAS_OFTALMOLOGICAS0917.pdf	28/09/2017 13:20:54	Mônica Barbosa de Melo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_ofthalmo0917.pdf	28/09/2017 13:20:09	Mônica Barbosa de Melo	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRosto.pdf	08/09/2015 17:16:01	Mônica Barbosa de Melo	Aceito
Outros	autorizacaooletdados.pdf	08/09/2015 15:22:00	Mônica Barbosa de Melo	Aceito
Outros	Regulamentobiorrepositorio.pdf	08/09/2015 15:20:51	Mônica Barbosa de Melo	Aceito

Situação do Parecer:

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
 UF: SP Município: CAMPINAS
 Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.327.027

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 11 de Outubro de 2017

Assinado por:
Renata Maria dos Santos Celeghini
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
UF: SP Município: CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ASPECTOS GENÉTICOS DE DOENÇAS OFTALMOLÓGICAS

Pesquisador: Mônica Barbosa de Melo

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 1

CAAE: 49120615.4.0000.5404

Instituição Proponente: Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.245.042

Apresentação do Projeto:

“Doenças oftalmológicas como a catarata, o glaucoma, a DMRI (degeneração macular relacionada à idade) e a distrofia endotelial corneana de Fuchs afetam grande parte da população mundial, prejudicando a capacidade visual ou até mesmo levando a perda total da visão. Todas estas doenças possuem algum componente genético importante; assim sendo, estudos mais detalhados podem permitir uma melhor compreensão de suas etiologias. As técnicas de sequenciamento de Sanger, digestão por enzimas de restrição, sequenciamento de genomas e exomas, Mass array system e curva de dissociação de alta resolução serão utilizadas para identificar regiões no genoma potencialmente envolvidas com estas afecções em estudos envolvendo famílias e/ou estudos do tipo caso/controle”.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar variantes genéticas e identificar novos genes que contribuam para a suscetibilidade a doenças oftalmológicas (catarata, glaucoma, degeneração macular relacionada à idade e distrofia endotelial corneana de Fuchs).

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

**COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS**



Continuação do Parecer: 1.245.042

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos associados à colheita de sangue venoso por punção periférica são dor leve e possibilidade de esquimose. Riscos associados aos exames oftalmológicos: desconforto nos exames onde o contato com a superfície ocular é necessário (tonometria e paquimetria), o qual será minimizado pelo uso de uma gota de colírio anestésico em cada olho antes de cada procedimento; desconforto de curta duração associado à luminosidade emitida pelo equipamento durante os exames; possibilidade de fadiga devido ao nível de atenção durante o exame de campo visual.

Não são esperados benefícios diretos aos participantes, exceto nos casos em que for descoberto um novo diagnóstico em decorrência dos exames oftalmológicos realizados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto de pesquisa foi apresentado com um objetivo amplo, o de avaliar variantes genéticas e identificar novos genes que contribuam para a suscetibilidade a doenças oftalmológicas. Sob este objetivo há nove estudos que partilham procedimentos de inclusão de participantes, critérios de inclusão e exclusão, além de metodologias de análise em comum. Pretende-se incluir no estudo 1413 participantes distribuídos entre os grupos: Degeneração Macular Relacionada à Idade (DMRI) n=175 e respectivos controles n=165; Distrofia Endotelial Corneana de Fuchs (FECD) n=60 e respectivos controles n=100; Glaucoma primário de ângulo fechado (GPAF) n=235, Glaucoma primário de ângulo aberto (GPAA) n=300 e respectivos controles n=250; Catarata n=78 e respectivos controles n=50. Os participantes, tanto casos como controles, serão pacientes do Ambulatório de Oftalmologia do HC-Unicamp e serão convidados a participar do estudo durante as consultas regulares. Também serão convidados familiares portadores de mutações genéticas específicas (ex. Cys433Arg no gene MYOC) ou familiares portadores de doenças específicas (ex. GRAF).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados:

1. Folha de rosto assinada pela pesquisadora responsável, Mônica Barbosa de Melo e por Edi Lúcia Sartorato, Diretora do CBMEG-Unicamp, instituição indicada como proponente;
2. Termo de consentimento Livre Esclarecido;
3. Formulário da Plataforma Brasil com as informações básicas sobre o projeto.
4. Projeto completo.
5. Autorização para colheita de dados assinada por Carlos Eduardo Leite Arieta, chefe da disciplina

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

**COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS**



Continuação do Parecer: 1.245.042

de Oftalmologia da FCM-Unicamp.

6. Regulamento do biorrepositório vinculado ao projeto, assinado pela pesquisadora responsável, Mônica Barbosa de Melo.

Recomendações:

1. Incluir no item "FORNECIMENTO DE INFORMAÇÃO ADICIONAL" do TCLE, além dos telefones, os endereços completos da pesquisadora (endereço profissional) e do CEP: Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNICAMP das 08:30hs às 13:30hs e das 13:00hs às 17:00hs na Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126; CEP 13083-887 Campinas – SP; telefone (19) 3521-8936; fax (19) 3521-7187; e-mail: cep@fcm.unicamp.br
2. No caso da versão final impressa do TCLE ter duas ou mais folhas, o participante ou o representante legal pelo participante, bem como, o pesquisador responsável deverão rubricar todas as folhas desse documento, apondo suas assinaturas na última página do referido termo (Carta Circular no 003/2011/CONEP/CNS).
3. TCLE deve ser elaborado em duas vias, sendo uma retida pelo sujeito da pesquisa ou por seu representante legal e uma arquivada pelo pesquisador.
4. Observar que o início do estudo somente poderá ser realizado após aprovação pelo CEP, conforme compromisso do pesquisador com a resolução 446/12 CNS/MS.
5. Ao pesquisador cabe desenvolver o projeto conforme delineado, elaborar e apresentar os relatórios parciais e final, bem como encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto (resolução 446/12).
6. Caso o pesquisador encontre dados que possam modificar o prognóstico ou tratamento dos sujeitos de pesquisa, recomenda-se que tais informações sejam transmitidas aos participantes e/ou anexadas ao prontuário para conhecimento da equipe clínica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

1. Não há pendências ou inadequações.

Considerações Finais a critério do CEP:

- O sujeito de pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

**COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS**



Continuação do Parecer: 1.245.042

- 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.

- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. 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 projetos 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.

- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

- Lembramos que segundo a Resolução 466/2012, item XI.2 letra e, "cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento".

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
----------------	---------	----------	-------	----------

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

**COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS**



Continuação do Parecer: 1.245.042

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCL EOftalmo.pdf	08/09/2015 15:18:11	Mônica Barbosa de Melo	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ASPECTOSGENETICOSDEDOENCAS OFTALMOLOGICAS.pdf	08/09/2015 15:20:08	Mônica Barbosa de Melo	Aceito
Outros	Regulamentobiorrepositorio.pdf	08/09/2015 15:20:51	Mônica Barbosa de Melo	Aceito
Outros	autorizacaocoletados.pdf	08/09/2015 15:22:00	Mônica Barbosa de Melo	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRosto.pdf	08/09/2015 17:16:01	Mônica Barbosa de Melo	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_578434.pdf	09/09/2015 12:30:50		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 25 de Setembro de 2015

**Assinado por:
Renata Maria dos Santos Celeghini
(Coordenador)**

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

8.2 Anexo 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
CENTRO DE BIOLOGIA MOLECULAR E ENGENHARIA GENÉTICA – CBMEG

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto: **Aspectos genéticos de doenças oftalmológicas**

Pesquisadora principal: Dra. Mônica Barbosa de Melo (tel: 019 3521-1143)

Número do CAAE:

SUBPROJETO ASSOCIADO:

- Estudo de mutações nos genes *CX46*, *CX50* e *HSF4* em pacientes com catarata congênita
- Análise de haplótipos da mutação CYS433ARG no gene *MYOC* associada ao glaucoma na população brasileira
- Aspectos genéticos do glaucoma primário de ângulo fechado
- Análise dos genes *COL8A2* E *SLC4A11* em pacientes com distrofia de FUCHS
- Avaliação do polimorfismo Y402H e da deleção *CFHR3/CFHR1* no gene *CFH* em relação à etiologia da degeneração macular relacionada à idade (DMRI) em uma amostra da população brasileira
- Citocinas inflamatórias e associação com o tratamento e etiologia do glaucoma primário de ângulo aberto
- Avaliação de aspectos genéticos do glaucoma primário de ângulo aberto por meio do sequenciamento de exoma total
- Análise de polimorfismos de base única (SNPs) na região 10q26 E SEU envolvimento na etiologia da degeneração macular relacionada à idade (DMRI) em uma amostra da população brasileira
- Avaliação de variantes genéticas na determinação da área do disco óptico em indivíduos normais e com glaucoma na população brasileira
- Avaliação dos polimorfismos $\epsilon 2/ \epsilon 3/ \epsilon 4$ no gene *APOE* em relação à etiologia do glaucoma primário de ângulo aberto em uma amostra da população brasileira
- Análise dos polimorfismos rs1410996 (gene *CFH*) e rs2230199 (gene *C3*) em relação ao risco para o desenvolvimento da Degeneração Macular Relacionada à Idade (DMRI) em uma amostra da população brasileira
- Análise dos polimorfismos rs9332739 (gene *C2*) e rs641153 (gene *CFB*) em relação ao risco para o desenvolvimento da Degeneração Macular Relacionada à Idade (DMRI) em uma amostra da população brasileira

OBJETIVO DA PESQUISA:

Você está sendo convidado (a) a participar em um projeto de pesquisa envolvendo indivíduos:

- Com catarata
- Com glaucoma de ângulo aberto
- Com glaucoma de ângulo fechado
- Com degeneração macular relacionada à idade
- Com distrofia endotelial de Fuchs

Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, visa assegurar seus direitos como participante e é elaborado em duas vias, uma que deverá ficar com você e outra com o pesquisador.

Por favor, leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas. Se houver perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá esclarecê-las com o pesquisador. Se preferir, pode levar este Termo para casa e consultar seus familiares ou outras pessoas antes de decidir participar. Se você não quiser participar ou retirar sua autorização, a qualquer momento, não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo.

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS:

Propõe-se avaliar variantes que contribuam para a suscetibilidade a doenças oftalmológicas, assim como identificar novos genes, ampliando o conhecimento sobre os processos biológicos envolvidos. Isso poderá melhorar o diagnóstico da doença e poderá levar a um melhor tratamento no futuro.

PROCEDIMENTO:

Caso concorde em participar desse estudo, os pesquisadores farão perguntas a respeito dos seus antecedentes médicos e familiares. Uma amostra de sangue venoso será colhida (10 a 20 mL, o equivalente a duas colheres de sopa). Além disso, você poderá ser submetido (a) a:

- Exame de refração
- Biomicroscopia anterior e de fundo
- Tonometria
- Gonioscopia
- Paquimetria
- Medida de comprimento axial
- Retinografia
- Campo visual (Perimetria)
- Tomografia de coerência óptica
- Microscopia Especular

RISCO E DESCONFORTO:

Uma coleta de 10 a 20 mL de sangue venoso será efetuada. Os riscos associados a esse procedimento são mínimos, podendo ocorrer dor e manchas roxas (equimoses) no local da coleta do sangue. O desconforto será mínimo, pois se trata de uma coleta de sangue geralmente da veia do braço que será realizada por profissional treinado e habilitado para realizar esse procedimento. Hospitalização não será necessária. Os procedimentos mencionados acima, fazem parte dos cuidados médicos de rotina para um (a) pacientes com doenças oftalmológicas. Para minimizar o desconforto nos exames onde o contato com a superfície ocular é necessário (tonometria e paquimetria) será instilada uma gota de colírio anestésico em cada olho antes de cada procedimento. Pode ocorrer um desconforto de curta duração associado à luminosidade emitida no olho durante os exames. Durante o exame de campo visual também poderá ocorrer fadiga devido ao nível de atenção exigido. Em caso de dano decorrente da pesquisa, está garantida a assistência integral e imediata, de forma gratuita, pelo tempo que for necessário. Você também tem direito a indenização em caso de danos.

SIGILO:

Você deve entender que toda informação médica que consta em seu prontuário médico será submetida aos regulamentos do HC-UNICAMP referentes ao sigilo da informação médica, excetuando-se os resultados dos testes genéticos decorrentes desse projeto de pesquisa. Se os resultados ou informações fornecidas resultarem em publicação científica, nenhum nome será utilizado.

RESSARCIMENTO:

Os procedimentos serão realizados durante as consultas de rotina ao Hospital das Clínicas da UNICAMP. Você não receberá qualquer valor em dinheiro.

BENEFÍCIOS:

Você não obterá nenhum benefício direto com a colaboração nesse estudo, seu tratamento provavelmente não será modificado, exceto nos casos em que for descoberto novo diagnóstico através dos exames realizados. Contudo, os resultados desse estudo podem, em longo prazo, oferecer benefícios para indivíduos com doenças oftalmológicas, possibilitando melhor diagnóstico e tratamento adequado. É importante notar que o diagnóstico pré-sintomático não faz parte dessa pesquisa, mas se você desejar obter orientação genética, ela será oferecida no Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética – CBMEG/UNICAMP, tel. (19 3521-1147).

FORNECIMENTO DE INFORMAÇÃO ADICIONAL:

Entende-se que é possível requisitar informações adicionais relativas ao estudo a qualquer momento. Dra. Mônica Barbosa de Melo estará disponível para responder possíveis dúvidas e preocupações. Em caso de recurso, denúncias, dúvidas ou reclamações sobre os aspectos éticos da pesquisa, contatar a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa.

Contatos:

Dra. Mônica Barbosa de Melo: Tel: (19) 3521-1143, e-mail: melomb@uol.com.br, endereço: Av Cândido Rondon, 400, Cidade Univeritária, (CBMEG-UNICAMP), Distrito de barão Geraldo, Campinas- SP. CEP: 13083-875.

Comitê de Ética em pesquisa da UNICAMP (CEP): Tel: (19) 3521-8936, e-mail: cep@fcm.unicamp.br, endereço: Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126, Distrito de Barão Geraldo , Campinas - SP. CEP: 13083-887.

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO:

A participação é voluntária, você pode se recusar a participar ou retirar seu consentimento e interromper a participação no estudo a qualquer momento (incluindo a retirada da amostra de sangue) sem comprometer os cuidados médicos que recebe atualmente ou receberá no futuro no HC-UNICAMP. A Dra. Mônica Barbosa de Melo pode interromper sua participação nesse estudo a qualquer momento que julgar apropriado, como quando houver fatores de exclusão que sejam descobertos durante a pesquisa, por exemplo, através da análise dos prontuários.

Você leu e compreendeu esse termo de consentimento e está de pleno acordo em participar desse estudo. Logo, informa que:

() Autoriza o armazenamento do material biológico e deseja ser consultado (a) para consentimento em caso de uso de sua amostra em outras pesquisas.

() **NÃO** autoriza o armazenamento do material biológico, devendo o mesmo ser descartado após o encerramento de sua participação nessa pesquisa.

Obs: O tempo de armazenamento é de 5 anos, podendo ser prorrogado por mais 5 anos.

RESULTADOS DOS EXAMES REALIZADOS (Genéticos):

() Deseja ser informado (a) sobre o resultado de meus exames.

() **NÃO** deseja ser informado (a) sobre o resultado de meus exames.

COLETA DE INFORMAÇÕES CLÍNICAS (Prontuários)

() Autoriza a utilização dos dados de seus prontuários.

() **NÃO** autoriza a utilização dos dados de seus prontuários.

DISPONIBILIZAÇÃO PÚBLICA DOS DADOS GENÔMICOS

Com o avanço das pesquisas na área genômica, é hoje de grande importância compartilhar em bancos de dados públicos os resultados de alguns testes moleculares. No compartilhamento dos dados genômicos é sempre assegurado que não haverá qualquer referência aos identificadores das amostras, (exemplo de identificadores: nome, filiação, endereço, número de registro hospitalar), mas poderão ser incluídas informações relevantes para a interpretação dos dados genômicos no contexto das pesquisas, tais como: sexo, idade, país e região de procedência, diagnóstico e outras informações clínicas pertinentes.

() Autoriza que os resultados dos testes genômicos realizados no âmbito deste projeto de pesquisa sejam disponibilizados em bancos de dados públicos que poderão ser consultados por pesquisadores da área médica, desde que esses dados não sejam vinculados com identificadores da amostra.

() **NÃO** autoriza a disponibilização dos resultados dos testes genéticos realizados neste projeto de pesquisa.

Nome do (a) participante ou responsável

Assinatura do (a) participante ou responsável

Data

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR:

Asseguro ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma via deste documento ao participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

Assinatura do (a) pesquisador (a) ou associado

Data

8.3 Anexo 3: Submissão de Artigo



[Manuscript Home](#)
[Author Instructions](#)
[Reviewer Instructions](#)
[Help](#)
[Tips](#)
[Logout](#)
[Journal Home](#)

Detailed Status Information

Manuscript #	2020MOLVIS0245
Current Revision #	0
Submission Date	2020-09-21 10:21:16
Current Stage	Initial Quality Control Started
Title	Association of genetic variants of the complement pathway CFB R32Q (rs641153), C3 R102G (rs2230199) and CFH (rs1410996) with Age-Related Macular Degeneration in a Brazilian population
Short Title	Complement variants and AMD in a Brazilian sample
Manuscript Type	Research Article
Corresponding Author	Mr. Jamil Neto (University of Campinas)
Contributing Authors	Marina Vitorino , Flavia Bajano , Sueli Silva Costa , Alicia Roque , Gessica Borges , Prof. Galina Ananina , Priscila Rim , Flávio Medina , Fernando Costa , Dr. Mônica Melo , Mr. José Paulo Vasconcellos
Abstract	<p>Purpose: To investigate the association among genetic variants of the complement pathway CFB R32Q (rs641153), C3 R102G (rs2230199) and CFH (rs1410996) with AMD in a sample of the Brazilian population.</p> <p>Methods: In a case-control study, 484 AMD patients were classified according to the Clinical Age-Related Maculopathy Grading System (CARMS) and compared to 479 unrelated controls. The genetic variants rs1410996 of complement H (CFH), rs4151667 of complement factor B (CFB) and rs2230199 of complement 3 (C3) were evaluated through polymerase chain reaction (PCR) and direct sequencing. The associations between SNPs and AMD, adjusted by age, were assessed by using logistic regression models.</p> <p>Results: A statistically significant association was observed between AMD risk and rs2230199 variant with an OR of 2.01 ($p = 0.0002$) for CG individuals compared to CC individuals. Regarding the comparison of advanced AMD versus the control group, the OR was 2.12 ($p = 0.0036$) for GG versus CC genotypes for rs1410996 variant. Similarly, the OR for rs2230199 polymorphism was 2.3034 ($p = 5.47e-05$) when comparing CG individuals to CC carriers. In contrast, the rs641153 variant showed a significant protective effect against advanced AMD for GA versus GG genotype (OR = 0.4406; $p = 0.0019$). When comparing wet AMD versus controls, a significant association was detected for rs1410996 variant (OR = 2.16; $p = 0.0039$) comparing carriers of the homozygous GG versus AA genotype, as well as in the comparisons of GG (OR = 3.0713; $p = 0.0046$) and CG genotypes (OR = 2.2249; $p = 0.0002$) versus CC genotype for rs2230199 variant, respectively. The rs641153 variant granted a significant protective effect against wet AMD for GA versus GG genotypes (OR = 0.4601; $p = 0.0044$), though.</p> <p>Conclusion: Our study confirmed the risk association between rs2230199 and rs1410996 variants and AMD, and the protective role against AMD for the rs641153 variant.</p>
Scientific Review Editor	Not Assigned

TITLE: Association of genetic variants of the complement pathway *CFB* R32Q (rs641153), *C3* R102G (rs2230199) and *CFH* (rs1410996) with Age-Related Macular Degeneration in a Brazilian population

RUNNING TITLE: Complement variants and AMD in a Brazilian sample

AUTHORS: Jamil M. Neto¹; Marina G. M. Viturino¹; Flávia F. Bajano²; Sueli M. da S. Costa²; Alicia B. Roque¹; Gessica F. S. Borges¹; Galina Ananina²; Priscila H. H. Rim¹; Flávio M. Medina³; Fernando F. Costa⁴; Mônica B. de Melo²; José P. C. de Vasconcellos¹

- (1) Department of Ophthalmology, Faculty of Medical Sciences – University of Campinas – Campinas, SP, Brazil. 13083-887.
- (2) Laboratory of Human Genetics, Center for Molecular Biology and Genetic Engineering (CBMEG) – University of Campinas – Campinas, SP, Brazil. 13083-875.
- (3) Department of Ophthalmology, Faculty of Medical Sciences, University of State of Rio de Janeiro – Rio de Janeiro, RJ, Brazil. 20551-030.
- (4) Hematology and Hemotherapy Center - University of Campinas – Campinas, SP, Brazil. 13083-878.

Conflict of Interest statement: The authors have no conflicts of interest to declare.

CORRESPONDING AUTHOR:

Jamil Miguel Neto

Department of Ophthalmology, Faculty of Medical Sciences – University of Campinas – UNICAMP, St. Tessália Vieira de Camargo, 126, Campinas, SP, Brazil, 13083-887.

Phone: +55 62 32698443; E-mail: jamil.mn@hotmail.com

ABSTRACT

Purpose: To investigate the association among genetic variants of the complement pathway *CFB* R32Q (rs641153), *C3* R102G (rs2230199) and *CFH* (rs1410996) with AMD in a sample of the Brazilian population.

Methods: In a case-control study, 484 AMD patients were classified according to the Clinical Age-Related Maculopathy Grading System (CARMS) and compared to 479 unrelated controls. The genetic variants rs1410996 of complement H (CFH), rs4151667 of complement factor B (CFB) and rs2230199 of complement 3 (C3) were evaluated through polymerase chain reaction (PCR) and direct sequencing. The associations between SNPs and AMD, adjusted by age, were assessed by using logistic regression models.

Results: A statistically significant association was observed between AMD risk and rs2230199 variant with an OR of 2.01 ($p = 0.0002$) for CG individuals compared to CC individuals. Regarding the comparison of advanced AMD versus the control group, the OR was 2.12 ($p = 0.0036$) for GG versus CC genotypes for rs1410996 variant. Similarly, the OR for rs2230199 polymorphism was 2.3034 ($p = 5.47 \times 10^{-5}$) when comparing CG individuals to CC carriers. In contrast, the rs641153 variant showed a significant protective effect against advanced AMD for GA versus GG genotype (OR = 0.4406; $p = 0.0019$). When comparing wet AMD versus controls, a significant association was detected for rs1410996 variant (OR = 2.16; $p = 0.0039$) comparing carriers of the homozygous GG versus AA genotype, as well as in the comparisons of GG (OR = 3.0713; $p = 0.0046$) and CG genotypes (OR = 2.2249; $p = 0.0002$) versus CC genotype for rs2230199 variant, respectively. The rs641153 variant

granted a significant protective effect against wet AMD for GA versus GG genotypes (OR = 0.4601; $p = 0.0044$), though.

Conclusion: Our study confirmed the risk association between rs2230199 and rs1410996 variants and AMD, and the protective role against AMD for the rs641153 variant.

INTRODUCTION

Age-related macular degeneration (AMD) is a degenerative and progressive retinal disorder and the leading cause of blindness in the elderly in Western World [1], affecting approximately 8.7% of the blind population [2]. The number of affected individuals is expected to increase to 288 million by 2040 [3]. Among the Brazilian elderly, it is estimated that approximately 3 million suffer from AMD, which is responsible for 4.0% of blindness [4].

Increasing prevalence of AMD as a result of increasing life expectancy highlights its deleterious effect on the quality of life in the elderly worldwide [5,6], becoming a major public health problem. Visual impairment due to advanced AMD is significantly associated with low quality of life compared to patients with chronic disease [7] and also an increased incidence of falls [8] and cognitive impairment [9].

This complex disease is derived from inherited and environmental exposures [10]. The US twin study of AMD quantified the proportions of variance due to genetic and environmental influences as 46% to 71% and 19% to 37%, respectively [11]. Common risk variants near the complement genes *CFH* [12-14], *CFB* [15,16], *C2* [15,16], *C3* [17,18] and *CFI* [19,20] account for near 57% of the contribution of known variants to disease risk [21], emphasizing the critical role of the complement pathway in AMD pathogenesis. However, the associations between these genes and AMD varies due to genetic variation within a population in a country and across different populations (different ethnicities) worldwide [22].

The *CFH* gene, located on chromosome 1, region q32, was the first significant gene to be implicated in the pathogenesis of AMD. *CFH* encodes complement factor H (fH), a key regulatory glycoprotein that acts as a negative regulator of the complement system, inhibiting complement alternative pathway by promoting factor I (C3b inactivator) and preventing local formation of more C3b [23]. A common variant of *CFH*, in intron 14 (-543G>A, rs1410996) has been reported to be associated with a higher risk of AMD [24-26]. Similarly, the rs2230199 (R102G) in exon 3 of the *C3* gene, a common missense variant that causes replacement of the arginine residue at codon 102 for a glycine (p.Arg102Gly) [27], has been strongly associated to the disease in studies on Caucasian populations [17,28]. However, this correlation has not been confirmed in Asian populations [29].

Nevertheless, there are some protective variants in complement genes. The *CFB* gene is located at chromosome 6p21, and its several transcript variants, such as rs641153, rs4151667, rs2072633, rs12614, rs1048709, have been related to the pathogenesis of AMD [30]. The *CFB* R32Q (rs641153) is a non-synonymous variant in exon 2 characterized by the exchange of the amino acid glutamine for arginine at codon 32. Former studies have shown its protective effect against AMD [15,30,31], since it decreases the potential to form convertase and to amplify complement activation [31].

Although several studies from different populations have suggested the implication of these gene variants on the risk of developing AMD, there have been no genetic studies confirming these associations in the Brazilian population. Therefore, our study aimed to assess the association between genetic variants of the complement pathway *CFB* R32Q (rs641153), *C3* R102G (rs2230199) and *CFH* (rs1410996) with AMD in a sample of the Brazilian population, from the Southeast region.

METHODS

Subjects

A case-control study was conducted, encompassing 484 patients with AMD and 479 patients without AMD, consecutively selected at the Clinical Hospital of the University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil. The study adhered to the tenets of the Declaration of Helsinki and was approved by the institution's Ethics Committee. The written informed consent was obtained from all participants.

The study subjects aged older than 50 years were classified according to the Clinical Age-Related Maculopathy Grading System (CARMS) [32]. Affected individuals were defined as those having AMD (CARMS stages 2-5) and were stratified in advanced AMD with either geographic atrophy or neovascular disease (CARMS stages 4 and 5) and wet/neovascular AMD (CARMS stage 5), while controls consisted of individuals without AMD categorized as CARMS stage 1.

Clinical assessment of cases

All participants underwent a standard ophthalmic examination, including visual acuity, refraction, biomicroscopy, and funduscopy through a dilated pupil performed by a retinal specialist. Subsequently, fluorescein angiography, indocyanine green angiography (ICG) and optical coherence tomography (OCT) were performed and the diagnosis of AMD was confirmed following CARMS criteria as well. Exclusion criteria were high myopia,

angioid streaks, infective or inflammatory chorioretinal disease, trauma and suspected cases of neovascularization from retinal angiomatous proliferation (RAP) or polypoidal choroidal vasculopathy (PCV).

Genotyping

Genomic DNA was extracted from peripheral blood using QIAamp® DNA Blood Midi Kit (Qiagen, Wertheim, Germany), according to the manufacturer's instructions. The quantification and purity of the DNA were measured using a Nanodrop 2000 spectrophotometer (260/280 absorbance) (Waltham, MA, USA). Genotyping was undertaken by PCR and direct sequencing using custom-designed primers presented in Table 1. Primers were selected based on the sequences of the specified genes available at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the R software (Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Mann-Whitney nonparametric test and Fisher's exact test were used to compare age and gender distribution, respectively, between affected and not affected cohorts. Chi-square statistics were employed to test Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) in the studied groups. Associations and Odds Ratios (OR) estimates were modeled through logistic regression models adjusted by age.

To evaluate the role of the genetic variants of the complement pathway in AMD susceptibility, a general comparison (cases vs. controls) and comparisons after disease

stratification in advanced AMD (advanced AMD vs. controls) and wet form (wet AMD vs. controls) were performed considering all genotypes as independent co-variables in comparison to the reference genotype.

To reduce the possibility of type I error due to multiple testing, an adjusted p-value for Bonferroni correction was used in each comparison as a threshold to confirm statistical significance ($p = 0.05/9 = 0.0055$; since we tested three dependent variables for three genetic variants).

RESULTS

This case-control association study comprised 484 AMD patients (54.96% females) including 283 wet AMD (58,47%) and 335 advanced AMD (69,21%), and 479 healthy individuals (53,65% females). No statistically significant difference was observed for gender between cases and controls ($p = 0.6843$). The mean \pm standard deviation (SD) age was $73,05 \pm 9,12$ years for the AMD group and $66,07 \pm 9,79$ years in the control group ($p < 0,0001$). As the difference in age distribution between the AMD group and controls was statistically significant, age was adjusted as a common confounder in the analysis of the association between SNPs and AMD.

The frequencies of genotype distributions of all studied samples were in Hardy-Weinberg equilibrium ($p > 0.05$), with the exception of the control group for the rs2230199 variant in the *C3* gene ($p = 0.0116$).

The genotype and allele frequencies of the genetic variants of *CFB* R32Q (rs641153), *C3* R102G (rs2230199) and *CFH* (rs1410996) are depicted in Table 2.

When evaluating cases versus controls, a significant association with AMD was detected for SNP rs2230199 in the *C3* gene for the comparison between CG versus CC genotypes ($p = 0.0002$). However, our data did not show significant association with the risk of AMD for the variants rs1410996 in the *CFH* gene and rs641153 in the *CFB* gene, after Bonferroni correction (table 3).

Regarding the comparison of advanced AMD versus controls, the analysis of rs1410996 variant showed that carriers of the homozygous GG genotype had more than two-fold increased risk of developing advanced AMD ($p = 0.0036$) compared to those carrying the AA genotype. Similarly, the OR for the rs2230199 polymorphism for advanced AMD was 2.3034 ($p = 5.47 \times 10^{-5}$) for heterozygous carriers (CG) compared to the CC genotype. In contrast, the rs641153 variant showed a significant protective effect against advanced AMD for the comparison between GA versus GG genotypes ($p = 0.0019$) (table 4).

The comparison of wet AMD and controls was statistically significant for the SNP rs1410996, showing that individuals carrying the GG genotype have more than two-fold increased risk of developing wet AMD ($p = 0.0039$) compared to AA individuals. The same pattern is observed for the comparisons of genotypes GG (OR = 3.0713; $p = 0.0046$) and CG (OR = 2.2249; $p = 0.0002$) versus CC for the rs2230199 variant, conferring a higher risk of developing this disease form. On the other hand, the rs641153 variant granted a significant protective effect against wet AMD for carriers of the GA genotype compared to the GG genotype ($p = 0.0044$) (table 5).

DISCUSSION

AMD is a multifactorial disease, in which complement system plays a key role. Previous studies in different ethnicities have shown that the genetic variants studied in this pathway (rs1410996; rs2230199; rs641153) are associated with AMD. However, these associations are not consistent and vary according to the geographic region and environmental factors to which these populations are subjected. Considering the high miscegenation content of the Brazilian population, this study evaluates the genetic profile of a sample of AMD patients from the Southeast regarding three variants in genes from the complement system.

Our data showed significant association of the risk of advanced and wet AMD with the noncoding variant rs1410996 in the *CFH* gene. This study in a sample of the Brazilian population demonstrated a higher risk of AMD with the G allele of rs1410996 in accordance with findings in Caucasian [25], Japanese [33] and Chinese [34] populations. The comparison of AMD cases and controls was not statistically significant, since we used an adjusted *p*-value for Bonferroni correction, in order to reduce the possibility of type I error due to multiple testing ($p = 0.05/9$).

When analyzing patients with wet AMD, the frequencies of the risk G allele were 65.71% in cases and 53.03% in the controls, similar to those reported in Japanese (66.8% in cases and 50.4% in controls) [33], Chinese (72% in cases and 55.6% in controls) [34] and Caucasians (80.8% in cases and 57.1% in controls) [25]. Compared to individuals with the AA genotype of rs1410996, individuals with the homozygous GG genotype had a 2.16-fold increased risk of developing wet AMD, while in an Asian meta-analysis the OR was 2.49.

The same was observed for the advanced form of the disease, in which GG individuals had a 2.12-fold increased risk compared to AA individuals, in our sample.

CFH inhibits the alternative complement cascade by regulating the spontaneous activation and amplification of C3 cleavage and assisting in the degradation of C3 cleavage products [23]. The mechanism of the relationship between AMD and the rs1410996 is unclear. It is suggested that the variant modulates the risk of AMD by regulating the expression of CFH, rather than disrupting the CFH protein function [24].

Despite the fact that the control group of the rs2230199 variant in the *C3* gene was not in Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) ($p = 0.0116$), our results were consistent with previously published findings. Although statistical tests play a key role in identifying the departures, when sample sizes are relatively large, significant departures from HWE can occur having little biological importance. Therefore, departures can be ignored since the downstream results are robust to the nature and magnitude of the deviations [35,36].

The prevalence and phenotypic spectrum of AMD vary among different ethnic groups as well as allele and genotype distributions. Frequencies of the risk G allele of rs2230199 were 23.99% in AMD cases and 13.79% in controls in this Brazilian sample, while the frequencies of the G allele were 25% to 31% in AMD patients and 19% to 21% in controls in Caucasians [17,18,37]. However, this allele was absent in Japanese and rare (< 1%) in Chinese populations [38]. Therefore, the rs2230199 variant is not associated with AMD due to its low frequency in Asians.

Our results showed significant association between the rs2230199 SNP and AMD susceptibility for the CG genotype compared to the CC genotype (OR = 2.01, $p = 0.0002$) consistent with the meta-analysis conducted by Zhang [29] in 2015, in overall populations (OR = 1.571, $p = 0.000$) and in the stratified analysis by ethnicity, as well as in Caucasians (OR = 1.576, $p = 0.000$). There was also a significant positive correlation between the rs2230199 variant and advanced AMD when comparing CG vs CC genotypes (OR = 2.3034; $p = 5.47e-05^*$), similar to another meta-analysis, also conducted by Zhang [39] in 2018, in overall (OR = 1.53; $p < 0.001$) and in the Caucasian population (OR = 1.55; $p < 0.001$). Significant associations with wet AMD were detected and were stronger than those observed for advanced AMD susceptibility for GG (OR = 3.0713, $p = 0.0046$) and GC individuals (OR = 2.2249, $p = 0.0002$).

C3 is the central component of the complement activation cascade and initiates the alternative complement pathway in order to form the membrane attack complex. Defective alternative pathway regulation and genetic alterations in the C3 gene is associated with AMD, increasing retinal cell damage and degeneration [27]. Variants in this gene, such as rs2230199, can affect the expression level and binding affinity of complement factors to the corresponding ligands [40].

Regarding the *CFB* polymorphism (rs641153), in the comparison of cases versus controls, although there was a suggestive protection for GA individuals, this result did not survive Bonferroni correction. We believe that this finding does not invalidate the protective role of this variant described in literature [41-43], since Bonferroni's correction may increase the chance of type II error. Data from Caucasian, Asian and Indian populations describe a significant protection for both GA and AA genotypes in general AMD risk.

In this study, it was demonstrated a statistically significant protection of GA versus GG genotype when evaluating advanced and wet AMD forms compared to controls, resulting in a risk reduction of 56% and 54%, respectively. These results are in accordance with what was described in literature, mainly in studies conducted in Caucasian populations [43,44]. Comparisons of AA versus GG genotype did not reach statistical significance in any of the evaluations. The low frequency of homozygous AA in the studied sample may have limited these associations, specially after disease stratification. Despite this, data in literature agree that AA genotype is also protective for advanced AMD, with an OR of 0.27 [43].

The rs641153 variant of the *CFB* gene has a well-established protective role against AMD, and our results also confirm this finding in the Brazilian population. A functional study by Montes et al. [31] was performed to assess the biological role of the polymorphic variant. The authors demonstrated that *CFB* R32Q variant have lower hemolytic activity and about 4 times less binding affinity for C3, with reduced formation of convertase following plasma purification from AA homozygous individuals. Thus, the protective effect of *CFB* R32Q would be a consequence of a lower potential for activation of the alternative complement pathway, which is directly related to immune response in the pathophysiology of AMD.

Despite the association observed, the studied group comprises a sample of patients from the Southeast of Brazil. Due to the high ethnic heterogeneity observed in Brazil, the evaluation of patients from other regions would strengthen the results. Besides that, the effect of environmental factors, including smoking habits, were not assessed due to insufficient data.

In summary, our data suggest that the *CFH* noncoding variant rs1410996 and the the *C3* coding variant rs2230199 increase the risk of AMD in a sample of the Brazilian population.

The rs1410996 variant showed a weaker risk association with AMD than that observed in Caucasians, but similar to the Asian population. In contrast, the rs2230199 variant was strongly associated with the disease, with more robust findings than those seen in Caucasians. The rs641153 variant of *CFB* showed a protective effect comparable to results in Caucasians. As a whole, our data support previous observations that genetic susceptibility to AMD varies among different ethnicities.

Since this is the first analysis of these polymorphisms in a Brazilian cohort, studies with a larger sample size are required to validate our findings. The identification of genetic risk factors in various ethnic groups will lead to a better understanding of the pathogenesis of AMD and subsequently will help to identify people at risk for the disease.

ACKNOWLEDGEMENTS

Author contributions: JMN, MGMV, GA, MBM and JPCV conceived and designed the research; JMN, MGMV, ABR, GFSB, GA, MBM and JPCV analysed and interpreted the data; JMN, FFB and SMSC conducted the experiments; JMN, MBM and JPCV obtained the funding; JMN, FMM, MGMV, ABR, PHHR and FMM summoned patients included in the study and performed ophthalmological examination; JMN, MGMV, FMM, PHHR, ABR and GFSB collected clinical data and blood samples; JMN, SMSC, MBM and JPCV supervised research personnel; JMN and JPCV wrote the manuscript; JMN, MGMV, FFC, MBM and JPCV reviewed the manuscript.

This study was supported by the Fund for Support to Teaching, Research and Outreach Activities (FAEPEX) grants 1525/15 and 251/18 and by São Paulo Research Foundation (FAPESP) grant 2010/18353-9.

Conflict of Interest statement: The authors have no conflicts of interest to declare.

Co-corresponding author: Monica B. de Melo

Corresponding authors email addresses: jamil.mn@hotmail.com; melomb@uol.com.br

REFERENCES

1. Lim LS, Mitchell P, Seddon JM, Holz FG, Wong TY. Age-related macular degeneration. *Lancet*. 2012;379(9827):1728–38.
2. Klein R, Cruickshanks KJ, Nash SD, et al. The prevalence of age-related macular degeneration and associated risk factors. *Arch Ophthalmol*. 2010;128(6):750-758. doi:10.1001/archophthalmol.2010.92.
3. 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 Health*. 2014;2(2):e106–16.
4. Taleb A, Ávila M, Moreira H. A Cegueira e a Baixa Visão no Brasil e no Mundo. In: As condições de saúde ocular no Brasil. Conselho Brasileiro de Oftalmologia. Rio de Janeiro, RJ: Walprint Gráfica e Editora. 2009;10.
5. Haddad S, Chen CA, Santangelo SL. The genetics of age-related macular degeneration: a review of progress to date. *Surv Ophthalmol* 2006;51:316–363.
6. Klein R, Peto T, Bird A, et al. The epidemiology of age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 2004;137:486–495.
7. Mitchell, J., Bradley, C. Quality of life in age-related macular degeneration: a review of the literature. *Health Qual Life Outcomes* 4, 97 (2006). <https://doi.org/10.1186/1477-7525-4-97>
8. Joanne M. Wood, Philippe Lacherez, Alex A. Black, Michael H. Cole, Mei Ying Boon, Graham K. Kerr; Risk of Falls, Injurious Falls, and Other Injuries Resulting from Visual Impairment among Older Adults with Age-Related Macular Degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2011;52(8):5088-5092. doi: <https://doi.org/10.1167/iovs.10-6644>.
9. Woo SJ, Park KH, Ahn J, et al. Cognitive impairment in age-related macular degeneration and geographic atrophy [published correction appears in *Ophthalmology*. 2013 Jan;120(1):210]. *Ophthalmology*. 2012;119(10):2094-2101. doi:10.1016/j.ophtha.2012.04.026.
10. Lin Wu, Qiushan Tao, Wen Chen, Zhi Wang, Yanping Song, Shuangyan Sheng, Pengcheng Li, Jingjing Zhou; Association between Polymorphisms of Complement Pathway Genes and Age-Related Macular Degeneration in a Chinese

- Population. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2013;54(1):170-174. doi: <https://doi.org/10.1167/iovs.12-10453>.
11. Seddon JM, Cote J, Page WF, Aggen SH, Neale MC. The US twin study of age-related macular degeneration: relative roles of genetic and environmental influences. *Arch Ophthalmol.* 2005;123:321–327.
 12. Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, et al. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science.* 2005;308:385–389.
 13. Edwards AO, Ritter R III, Abel KJ, Manning A, Panhuysen C, Farrer LA. Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science.* 2005;308:421–424.
 14. Haines JL, Hauser MA, Schmidt S, et al. Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. *Science.* 2005;308:419–421.
 15. 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;38:458–462.
 16. Andrea J. Richardson, F. M. Amirul Islam, Robyn H. Guymer, Paul N. Baird; Analysis of Rare Variants in the Complement Component 2 (C2) and Factor B (BF) Genes Refine Association for Age-Related Macular Degeneration (AMD). *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2009;50(2):540-543. doi: <https://doi.org/10.1167/iovs.08-2423>.
 17. 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;39:1200–1201.
 18. Yates JRW, Sepp T, Matharu BK, et al. Complement C3 variant and the risk of age-related macular degeneration. *N Engl J Med.* 2007;357:553–561.
 19. 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;17:100–104.
 20. 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;107:7401–7406.
 21. Fritsche LG, Fariss RN, Stambolian D, Abecasis GR, Curcio CA, Swaroop A. Age-Related Macular Degeneration: Genetics and Biology Coming

- Together. Annual review of genomics and human genetics. 2014;15:151-171. doi:10.1146/annurev-genom-090413-025610.
22. Patel N, Adewoyin T, Chong NV. Age-related macular degeneration: a perspective on genetic studies. *Eye (Lond)*. 2008;22:768–776.
 23. Alsenz J, Schulz TF, Lambris JD, Sim RB, Dierich MP. Structural and functional analysis of the complement component factor H with the use of different enzymes and monoclonal antibodies to factor H. *Biochem J*. 1985;232(3):841-850. doi:10.1042/bj2320841.
 24. Li M, Atmaca-Sonmez P, Othman M, et al. CFH haplotypes without the Y402H coding variant show strong association with susceptibility to age-related macular degeneration. *Nat Genet*. 2006;38: 1049 –1054.
 25. 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: 1055–1059.
 26. Wu, Mingxing, et al. "Association of two polymorphisms, rs1061170 and rs1410996, in complement factor H with age-Related macular degeneration in an asian population: a meta-analysis." *Ophthalmic research* 55.3 (2016): 135-144.
 27. 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. doi:10.1155/2013/435607.
 28. Francis PJ, Hamon SC, Ott J, Weleber RG, Klein ML. Polymorphisms in *C2*, *CFB* and *C3* are associated with progression to advanced age related macular degeneration associated with visual loss. *Journal of Medical Genetics*. 2009;46(5):300–307.
 29. Zhang MX, Zhao XF, Ren YC, et al. Association between a functional genetic polymorphism (rs2230199) and age-related macular degeneration risk: a meta-analysis. *Genet Mol Res*. 2015;14(4):12567–12576. Published 2015 Oct 16. doi:10.4238/2015.October.16.24.
 30. Su Y, Hu Z, Pan T, Chen L, Xie P, Liu Q. Complement factor B gene polymorphisms and risk of age-related macular degeneration: A meta-analysis. *Eur J Ophthalmol*. 2019 Apr 12:1120672119840245.
 31. Montes T, Tortajada A, Morgan BP, Rodríguez de Córdoba S, Harris CL. Functional basis of protection against age-related macular degeneration conferred

- by a common polymorphism in complement factor B. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(11):4366-4371. doi:10.1073/pnas.0812584106.
32. Seddon JM, Sharma S, Adelman RA. Evaluation of the clinical age-related maculopathy staging system. *Ophthalmology*. 2006;113(2):260-266. doi:10.1016/j.ophtha.2005.11.001.
 33. Mori K, Gehlbach PL, Kabasawa S, et al. Coding and noncoding variants in the CFH gene and cigarette smoking influence the risk of age-related macular degeneration in a Japanese population. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48:5315–5319.
 34. Cui L, Zhou H, Yu J, et al. Noncoding variant in the complement factor H gene and risk of exudative age-related macular degeneration in a Chinese population. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51(2):1116–1120. doi:10.1167/iovs.09-4265.
 35. RS Waples, Separating the wheat from the chaff: patterns of genetic differentiation in high gene flow species, *Journal of Heredity*, Volume 89, Issue 5, September 1998, Pages 438–450, <https://doi.org/10.1093/jhered/89.5.438>.
 36. Hedrick PW. PERSPECTIVE: HIGHLY VARIABLE LOCI AND THEIR INTERPRETATION IN EVOLUTION AND CONSERVATION. *Evolution*. 1999;53(2):313-318. doi:10.1111/j.1558-5646.1999.tb03767.x.
 37. Spencer KL, Olson LM, hang BM, et al. C3 R102G polymorphism increases risk of age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet*. 2008;17:1821–1824.
 38. Yanagisawa S, Kondo N, Miki A, Matsumiya W, Kusuhara S, Tsukahara Y, Honda S, Negi A. A common complement C3 variant is associated with protection against wet age-related macular degeneration in a Japanese population. *PLoS One*. 2011;6(12):e28847.
 39. Zhang, J., Li, S., Hu, S. *et al*. Association between genetic variation of complement C3 and the susceptibility to advanced age-related macular degeneration: a meta-analysis. *BMC Ophthalmol* **18**, 274 (2018). <https://doi.org/10.1186/s12886-018-0945-5>.
 40. Anderson DH, Radeke MJ, Gallo NB, et al. The pivotal role of the complement system in aging and age-related macular degeneration: hypothesis re-visited. *Prog Retin Eye Res*. 2010;29(2):95-112. doi:10.1016/j.preteyeres.2009.11.003.
 41. Lu F, Liu S, Hao Q, Liu L, Zhang J, Chen X, Hu W, Huang P. Association Between Complement Factor C2/C3/CFB/CFH Polymorphisms and Age-Related

- Macular Degeneration: A Meta-Analysis. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2018 Sep;22(9):526-540.
42. Kaur I, Katta S, Reddy RK, Narayanan R, Mathai A, Majji AB, Chakrabarti S. The involvement of complement factor B and complement component C2 in an Indian cohort with age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010 Jan;51(1):59-63.
 43. Chen Y, Zeng J, Zhao C, et al. Assessing susceptibility to age-related macular degeneration with genetic markers and environmental factors. *Arch Ophthalmol*. 2011;129(3):344–351.
 44. Thakkinstian A, McEvoy M, Chakravarthy U, et al. The association between complement component 2/complement factor B polymorphisms and age-related macular degeneration: a HuGE review and meta-analysis. *Am J Epidemiol*. 2012;176(5):361-372. doi:10.1093/aje/kws031.

Table 1. Primers used for PCR amplification and sequencing

Genes	SNP	Primer Sequence (5'-3')
<i>CFH</i>	rs1410996	Forward: GGCACTGAGAAGCAAAGAAA Reverse: CCTCCCGGTTAGTCATCAA
<i>C3</i>	rs2230199	Forward: CACCTCGGAAGACCAAGAAT Reverse: GTGGTTGACGGTGAAGATCC
<i>CFB</i>	rs641153	Forward: CACTGAGCCAAGCAGACAAG Reverse: ACACTCATTGCCCTCAAACC

SNP: Single nucleotide polymorphism

Table 2. Genotype and allele distributions of *CFB* R32Q (rs641153), *C3* R102G (rs2230199) and *CFH* (rs1410996) polymorphisms among the control group, AMD cases and after disease stratification in advanced and wet AMD subgroups.

Genotypes	Control n (%)	AMD n (%)		
		Total	Advanced	Wet
<i>CFH</i> rs1410996: G>A				
AA	86 (20.82)	55 (15.58)	34 (13.88)	29 (13.81)
AG	216 (52.30)	148 (41.93)	103 (42.04)	86 (40.95)
GG	111 (26.88)	150 (42.49)	108 (44.08)	95 (45.24)
A	388 (46.97)	258 (36.54)	171 (34.90)	144 (34.29)
G	438 (53.03)	448 (63.46)	319 (65.10)	276 (65.71)
<i>C3</i> rs2230199: C>G				
CC	286 (75.86)	198 (61.11)	133 (57.83)	115 (58.37)
CG	78 (20.69)	103 (31.79)	78 (33.91)	64 (32.49)
GG	13 (3.45)	23 (8.1)	19 (8.26)	18 (9.14)
C	650 (82.21)	499 (77.01)	344 (74.78)	294 (74.62)
G	104 (13.79)	149 (23.99)	116 (25.22)	100 (25.38)
<i>CFB</i> rs641153: G>A				
GG	302 (76.26)	288 (85.46)	209 (88.56)	178 (88.12)
GA	88 (22.22)	47 (13.95)	26 (11.02)	23 (11.39)
AA	6 (1.52)	2 (0.59)	1 (0.42)	1 (0.49)
G	692 (87.37)	623 (92.43)	444 (94.07)	379 (93.81)
A	100 (12.63)	51 (7.57)	28 (5.93)	25 (6.19)

Table 3. Comparisons of *CFB* R32Q (rs641153), *C3* R102G (rs2230199) and *CFH* (rs1410996) polymorphisms between AMD cases and controls through logistic regression analysis adjusted by age.

Genotype	OR	95%CI	<i>p</i> value
<i>CFH</i> rs1410996			
GG vs. AA	1.8198	1.1727-2.8383	0.0079
AG vs. AA	1.0463	0.6891-1.5960	0.8324
<i>C3</i> rs2230199			
GG vs. CC	2.1162	1.0286-4.5236	0.0456
CG vs. CC	2.0107	1.3937-2.9148	0.0002*
<i>CFB</i> rs641153			
AA vs. GG	0.3580	0.0458-1.8488	0.2563
GA vs. GG	0.5906	0.3831-0.9022	0.0157

* *p* value represents significance at α (0.05/9) = 0.0055.
OR: odds ratio; CI: confidence interval.

Table 4. Comparisons of *CFB* R32Q (rs641153), *C3* R102G (rs2230199) and *CFH* (rs1410996) polymorphisms between Advanced AMD cases and Controls through logistic regression analysis adjusted by age.

Genotype	OR	95%CI	<i>p</i> value
<i>CFH</i> rs1410996			
GG vs. AA	2.1238	1.2860-3.5552	0.0036*
AG vs. AA	1.1236	0.6928-1.8464	0.6405
<i>C3</i> rs2230199			
GG vs. CC	2.6753	1.2401-5.9333	0.0130
CG vs. CC	2.3034	1.5381-3.4635	5.47e-05*
<i>CFB</i> rs641153			
AA vs. GG	0.2362	0.0108-1.8190	0.2330
GA vs. GG	0.4406	0.2585-0.7313	0.0019*

* *p* value represents significance at α (0.05/9) = 0.0055.
OR: odds ratio; CI: confidence interval.

Table 5. Comparisons of *CFB* R32Q (rs641153), *C3* R102G (rs2230199) and *CFH* (rs1410996) polymorphisms between Wet AMD cases and Controls through logistic regression analysis adjusted by age.

Genotype	OR	95%CI	p value
<i>CFH</i> rs1410996			
GG vs. AA	2.16978	1.2904-3.7129	0.0039*
AG vs. AA	1.0865	0.6556-1.8314	0.7509
<i>C3</i> rs2230199			
GG vs. CC	3.0713	1.4205-6.8128	0.0046*
CG vs. CC	2.2249	1.4605-3.3971	0.0002*
<i>CFB</i> rs641153			
AA vs. GG	0.2752	0.0128-2.0542	0.2796
GA vs. GG	0.4601	0.2647-0.7746	0.0044*

* *p* value represents significance at α (0.05/9) = 0.0055.

OR: odds ratio; CI: confidence interval.