

CARLOS EDUARDO DOS REIS VELOSO

**IMPORTÂNCIA DE POLIMORFISMOS DOS GENES *CFH*,
LOC387715 E *VEGF* NA REPOSTA TERAPÊUTICA DA
DEGENERAÇÃO MACULAR RELACIONADA À IDADE
EXSUDATIVA AOS ANTIANGIOGÊNICOS**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

BELO HORIZONTE

2012

CARLOS EDUARDO DOS REIS VELOSO

**IMPORTÂNCIA DE POLIMORFISMOS DOS GENES *CFH*,
LOC387715 E *VEGF* NA REPOSTA TERAPÊUTICA DA
DEGENERAÇÃO MACULAR RELACIONADA À IDADE
EXSUDATIVA AOS ANTIANGIOGÊNICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Medicina.

Área de Concentração: Oftalmologia

Orientador: Prof. Dr. Márcio Bittar Nehemy
Universidade Federal de Minas Gerais

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

BELO HORIZONTE

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Magnífico Reitor

Prof. Clélio Campolina Diniz

Vice-Reitora

Profa. Rocksane de Carvalho Norton

Pró-Reitor de Pós-Graduação

Prof. Ricardo Santiago Gomez

Pró-Reitor de Pesquisa

Prof. Renato de Lima dos Santos

Diretor da Faculdade de Medicina

Prof. Francisco José Penna

Vice-Diretor da Faculdade de Medicina

Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Diretor do Hospital das Clínicas

Prof. Antônio Luiz Pinho Ribeiro

Coordenador do Centro de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina

Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha

Chefe do Departamento de Cirurgia

Prof. Marcelo Eller Miranda

Chefe do Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia

Prof. Roberto Eustáquio Santos Guimarães

**Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à
Cirurgia e à Oftalmologia**

Prof. Marcelo Dias Sanches

**Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e
à Oftalmologia**

Prof. Marcelo Dias Sanches

Profa. Ivana Duval de Araújo

Prof. Edson Samesima Tatsuo

Prof. Alcino Lázaro da Silva

Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Prof. Márcio Bittar Nehemy

Prof. Marco Aurélio Lana Peixoto

Eduardo Ângelo Braga – Representante Discente titular

A Comissão Examinadora que assina abaixo _____ a
tese intitulada “IMPORTÂNCIA DE POLIMORFISMOS DOS GENES *CFH*,
LOC387715 E *VEGF* NA REPOSTA TERAPÊUTICA DA DEGENERAÇÃO
MACULAR RELACIONADA À IDADE EXSUDATIVA AOS ANTIANGIOGÊNICOS”,
apresentada e defendida em sessão pública, por Carlos Eduardo dos Reis Veloso,
para obtenção do grau de doutor em Medicina, pelo Programa de Pós-graduação em
Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia, área de Oftalmologia, Faculdade de
Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.

Prof. Dr. Márcio Bittar Nehemy

Orientador

Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Dr. Raul Nunes Galvarro Vianna

Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Edmundo Frota de Almeida Sobrinho

Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. Marco Aurélio Lana Peixoto

Universidade Federal de Minas Gerais

Dr. Daniel Vítor de Vasconcelos Santos

Universidade Federal de Minas Gerais

Suplentes:

Prof. Dr. André Aguiar Oliveira

Prof. Dr. Walter Yukihiro Takahashi

Belo Horizonte, 01 de março de 2012.

*Aos meus amados filhos Alice, Ana Luísa e Bernardo,
fontes de alegria e renovação.*

*À minha esposa Dayse, pelo amor, companheirismo e
compreensão durante os anos dedicados a este
trabalho.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder mais esta vitória.

Aos meus pais, Carlos Magno e Neusa Beatriz, pelo amor e apoio incondicionais.

Aos meus irmãos, Rodrigo e Luciana e aos meus tios, Geraldo Wagner e Consuelo, sempre presentes em minha vida.

Ao Prof. Dr. Márcio Bittar Nehemy, exemplo de retidão, profissionalismo e ética, pela honra de sua amizade e pelos valiosos ensinamentos na criteriosa orientação desta tese.

À Dra. Luciana Negrão Frota de Almeida, cujo estudo pioneiro serviu de base para este trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Armando De Marco, por ceder o Laboratório para as análises genéticas.

Aos pós-graduandos e estagiários do Laboratório de Genética, fundamentais para a efetivação deste estudo.

A toda a equipe do Instituto da Visão, pelo importante auxílio na execução deste trabalho.

À Sra. Maria Bernadete Inocêncio, funcionária do setor de Retina e Vítreo do Hospital São Geraldo, pelo incentivo constante.

A todos aqueles não mencionados aqui, que, de alguma forma, contribuíram para a realização desta tese.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Acuidade visual média e espessura macular central média dos 95 olhos incluídos no estudo.....	41
TABELA 2 Comparação da acuidade visual média, de acordo com o tipo de droga intravítrea utilizada, entre o período pré-tratamento e 1, 3 e 6 meses após.....	41
TABELA 3. Comparação da melhora média da acuidade visual, de acordo com o tipo de droga intravítrea utilizada, com 1, 3 e 6 meses após o início do tratamento.....	41
TABELA 4. Comparação da espessura macular central média, de acordo com o tipo de droga intravítrea utilizada, entre o período pré-tratamento e 1, 3 e 6 meses após.....	42
TABELA 5. Comparação da melhora média da espessura macular central, de acordo com o tipo de droga intravítrea utilizada, com 1, 3 e 6 meses após o início do tratamento.....	42
TABELA 6. Características pré-tratamento agrupadas de acordo com os genótipos do gene <i>CFH</i>	43
TABELA 7. Comparação da acuidade visual média, de acordo com os genótipos do gene <i>CFH</i> , entre o período pré-tratamento e 1, 3 e 6 meses após...	43
TABELA 8. Comparação da melhora média da acuidade visual entre os genótipos do gene <i>CFH</i> com 1, 3 e 6 meses após o início do tratamento.....	44
TABELA 9. Comparação da melhora da acuidade visual ≥ 3 linhas, de acordo com os genótipos do gene <i>CFH</i> , entre o período pré-tratamento e 1, 3 e 6 meses após.....	44
TABELA 10. Comparação da espessura macular central média, de acordo com os genótipos do gene <i>CFH</i> , entre o período pré-tratamento e 1, 3 e 6 meses após.....	45
TABELA 11. Comparação da melhora média da espessura macular central entre os genótipos do gene <i>CFH</i> com 1, 3 e 6 meses após o início do tratamento.....	45
TABELA 12. Características pré-tratamento agrupadas de acordo com os genótipos do gene <i>LOC387715</i>	46

TABELA 13. Comparação da acuidade visual média, de acordo com os genótipos do gene <i>LOC387715</i> , entre o período pré-tratamento e 1, 3 e 6 meses após.....	47
TABELA 14. Comparação da melhora média da acuidade visual entre os genótipos do gene <i>LOC387715</i> com 1, 3 e 6 meses após o início do tratamento.	47
TABELA 15. Comparação da melhora da acuidade visual ≥ 3 linhas, de acordo com os genótipos do gene <i>LOC387715</i> , entre o período pré-tratamento e 1, 3 e 6 meses após.....	48
TABELA 16. Comparação da espessura macular central média, de acordo com os genótipos do gene <i>LOC387715</i> , entre o período pré-tratamento e 1, 3 e 6 meses após.....	48
TABELA 17. Comparação da melhora média da espessura macular central entre os genótipos do gene <i>LOC387715</i> com 1, 3 e 6 meses após o início do tratamento.....	49
TABELA 18. Características pré-tratamento agrupadas de acordo com os genótipos do gene <i>VEGF</i>	50
TABELA 19. Comparação da acuidade visual média, de acordo com os genótipos do gene <i>VEGF</i> , entre o período pré-tratamento e 1, 3 e 6 meses após	51
TABELA 20. Comparação da melhora média da acuidade visual entre os genótipos do gene <i>VEGF</i> com 1, 3 e 6 meses após o início do tratamento.....	51
TABELA 21. Comparação da melhora da acuidade visual ≥ 3 linhas, de acordo com os genótipos do gene <i>VEGF</i> , entre o período pré-tratamento e 1, 3 e 6 meses após.....	52
TABELA 22. Comparação da espessura macular central média, de acordo com os genótipos do gene <i>VEGF</i> , entre o período pré-tratamento e 1, 3 e 6 meses após.....	52
TABELA 23. Comparação da melhora média da espessura macular central entre os genótipos do <i>VEFG</i> com 1, 3 e 6 meses após o início do tratamento.....	53
TABELA 24. Resumo dos estudos referentes à resposta terapêutica da DMRI exsudativa de acordo com o polimorfismo <i>Y402H (rs1061170)</i> do gene <i>CFH</i>	57
TABELA 25. Resumo dos estudos referentes à resposta terapêutica da DMRI exsudativa de acordo com o polimorfismo <i>A69S (rs10490924)</i> do gene <i>LOC387715</i>	59

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. Resultado da leitura da PCR em tempo real.....	36
GRÁFICO 1. Classificação da DMRI em todos os pacientes avaliados entre 2008 e 2011.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AREDS	<i>Age-related eye disease study</i>
ANCHOR	<i>Anti-VEGF antibody for the treatment of predominantly classic choroidal neovascularization in AMD</i>
AV	Acuidade visual
CFH	Fator de complemento H
DMRI	Degeneração macular relacionada à idade
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EMC	Espessura macular central
EPR	Epitélio pigmentado da retina
FAM	6-carboxifluoresceína
HEX	Hexacloro-6-carboxifluoresceína
IC _{95%}	Intervalo de confiança de 95%
logMAR	Logaritmo do mínimo ângulo de resolução
MARINA	<i>Minimally classic/occult trial of the anti-VEGF Antibody Ranibizumab in the treatment of Neovascular AMD</i>
MNSR	Membrana neovascular sub-retiniana
OCT	Tomografia de coerência óptica
OR	<i>Odds ratio</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDT	Terapia fotodinâmica
PRONTO	<i>Prospective OCT Study With Lucentis for Neovascular AMD</i>
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
<i>et al</i>	E outros
p	Valor-p (nível de significância)
μL	Microlitro
μm	Micrometro

RESUMO

OBJETIVO: Investigar o efeito de polimorfismos dos genes *CFH*, *LOC387715* e *VEGF* na resposta ao tratamento da degeneração macular relacionada à idade (DMRI) exsudativa com os antiangiogênicos bevacizumabe e ranibizumabe.

MÉTODO: Foram avaliadas a acuidade visual (AV) e a espessura macular central (EMC) de pacientes com DMRI exsudativa antes e um, três e seis meses após o início do tratamento com três injeções consecutivas, e com intervalo mensal, de bevacizumabe ou ranibizumabe. A genotipagem foi realizada através da técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real para determinação dos seguintes polimorfismos: *rs1061170* (*CFH*), *rs10490924* (*LOC387715*) e *rs1413711* (*VEGF*).

RESULTADOS: Um total de 95 olhos de 95 pacientes foi incluído. Para os polimorfismos *rs1061170* do gene *CFH* e *rs10490924* do gene *LOC387715*, não houve diferença, em nenhuma das visitas, quando a melhora média da AV e da EMC foi comparada entre os genótipos ($p > 0,05$). Para estes dois genes, não houve diferença entre os genótipos quando a melhora da AV \geq três linhas foi avaliada ($p > 0,05$). Para o polimorfismo *rs1413711* do gene *VEGF*, portadores do genótipo *TT* apresentaram, com um e três meses, melhora média da AV superior aos demais ($p = 0,02$ e $p = 0,03$, respectivamente). Um maior número de portadores do genótipo *TT* apresentou melhora da AV \geq três linhas no primeiro mês ($p = 0,005$). Não houve diferença, em nenhuma das visitas, quando a melhora média da EMC foi comparada entre os genótipos ($p > 0,05$). Para os três genes estudados, não houve diferença quanto ao número de injeções intravítreas necessárias ($p > 0,05$).

CONCLUSÃO: Para os polimorfismos *rs1061170* do gene *CFH* e *rs10490924* do gene *LOC387715*, não houve diferença de resposta entre os genótipos. Para o polimorfismo *rs1413711* do gene *VEGF*, pacientes homocigotos para o alelo de risco apresentaram melhor resposta terapêutica aos antiangiogênicos.

PALAVRAS-CHAVE: Degeneração macular exsudativa; genética; polimorfismo; inibidores da angiogênese.

ABSTRACT

PURPOSE: To investigate the role of *CFH*, *LOC387715* and *VEGF* gene polymorphisms on the outcome of antiangiogenic treatment for neovascular age-related macular degeneration (AMD) with bevacizumab and ranibizumab.

METHOD: Best-corrected visual acuity (VA) and central macular thickness (CMT) were measured before and one, three and six months after bevacizumab or ranibizumab loading dose (three consecutive injections with 1 month interval) had been initiated. The patients were genotyped for three single nucleotide polymorphisms: *rs1061170* in the *CFH* gene, *rs10490924* in the *LOC387715* gene and *rs1413711* in the *VEGF* gene.

RESULTS: A total of 95 eyes of 95 patients were included in the study. For the *CFH rs1061170* and *LOC387715 rs10490924* polymorphisms, when the mean improvement of VA and CMT was compared between the different genotypes, no statistically significant difference was noted in any of the visits. For both genes, there was no difference when a VA improvement \geq three lines was evaluated ($p > 0,05$). For the *VEGF rs1413711* polymorphism, patients homozygous for the risk allele showed, at the first and third month, greater mean VA improvement than the others ($p < 0,05$). A VA improvement \geq three lines at the first month was also greater for this group of patients ($p = 0,005$). There was no difference when the mean CMT improvement was compared between the *VEGF* genotypes ($p < 0,05$). For the three studied genes, there was no statistically significant difference when the mean number of intravitreal injections required was evaluated.

CONCLUSION: For the *CFH rs1061170* and *LOC387715 rs10490924* polymorphisms, there was no difference in response between genotypes. For the *VEGF rs1413711* polymorphism, patients homozygous for the risk allele showed better response to anti-VEGF therapy for neovascular AMD.

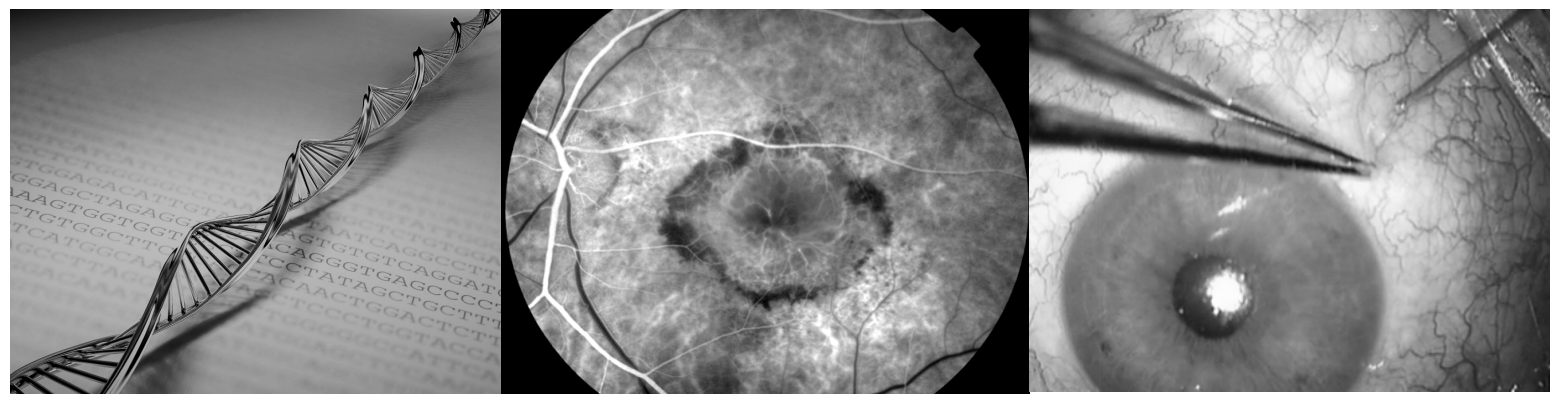
Keywords: Exudative age-related macular degeneration; genetics; polymorphisms, angiogenesis inhibitors.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	22
	2.1 Polimorfismos genéticos e a resposta ao tratamento preventivo da DMRI com vitaminas e antioxidantes.....	23
	2.2 Polimorfismos genéticos e a resposta ao tratamento da DMRI exsudativa com a PDT.....	24
	2.3 Polimorfismos genéticos e a resposta ao tratamento da DMRI exsudativa com antiangiogênicos.....	26
3	OBJETIVOS.....	30
4	MÉTODO.....	32
	4.1 Pacientes.....	33
	4.2 Tratamento com injeção intravítrea de antiangiogênicos.....	33
	4.3 Medida da acuidade visual e da espessura macular central.....	34
	4.4 Critérios de inclusão e exclusão.....	34
	4.5 Genotipagem.....	35
	4.6 Análise Estatística.....	37
5	RESULTADOS.....	39
	5.1 Polimorfismo <i>Y402H (rs1061170)</i> do gene <i>CFH</i>	42
	5.2 Polimorfismo <i>A69S (rs10490924)</i> do gene <i>LOC387715</i>	46
	5.3 Polimorfismo <i>C674T (rs1413711)</i> do gene <i>VEGF</i>	49
6	DISCUSSÃO.....	54
	6.1 Polimorfismo <i>Y402H (rs1061170)</i> do gene <i>CFH</i>	56
	6.2 Polimorfismo <i>A69S (rs10490924)</i> do gene <i>LOC387715</i>	58
	6.3 Polimorfismo <i>C674T (rs1413711)</i> do gene <i>VEGF</i>	60
7	CONCLUSÃO.....	62
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
9	ANEXOS.....	74
	ANEXO A. Classificação da DMRI de acordo com SEDDON <i>et al.</i> (2006)..	75
	ANEXO B. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	76
	ANEXO C. Aprovação do estudo pelos Comitês de Ética em Pesquisa da UFMG e do Instituto da Visão.....	78

ANEXO D. Tabela de conversão da acuidade visual (<i>Snellen versus</i> logMAR) – adaptado de HOLLADAY (1997).....	82
ANEXO E. Publicação resultante desta tese (Artigo aceito para publicação na Revista Brasileira de Oftalmologia no dia 20/06/2011).....	83
ANEXO F. Cópia da ata de defesa.....	94

1 INTRODUÇÃO



A degeneração macular relacionada à idade (DMRI) é uma doença coriorretiniana progressiva que acomete a mácula, sendo considerada a principal causa de cegueira legal em países desenvolvidos (KLEIN *et al.*, 2004). Nos Estados Unidos, a prevalência da doença em pacientes com mais de 40 anos é de 6,5% (KLEIN *et al.*, 2011). No Brasil, não há estudos epidemiológicos adequados para se estabelecer a real prevalência da doença. Contudo, baseando-se nos dados americanos e no Censo de 2010, é possível supor que existam cerca de 4.150.000 portadores de DMRI no país (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2010).

A fase inicial da doença é caracterizada por irregularidades (hiper ou hipopigmentação) do epitélio pigmentado da retina (EPR) e pela presença de depósitos amarelos sub-retinianos, denominados drusas. Estas lesões podem se tornar confluentes e causar descolamentos drusenóides do EPR, que podem, por sua vez, progredir para atrofia geográfica ou, menos comumente, para uma forma exsudativa ou neovascular. Tanto a atrofia geográfica quanto a forma exsudativa representam estágios tardios da DMRI. A atrofia geográfica é caracterizada por uma hipopigmentação bem delimitada, de qualquer tamanho no centro da mácula ou com pelo menos 350 μm de diâmetro em uma área fora da região central. A forma exsudativa acomete cerca de 15% dos pacientes e é caracterizada pela presença de uma membrana neovascular sub-retiniana (MNSR). Extravasamento de soro e/ou sangue surgem, secundariamente, devido a alterações estruturais da própria membrana e dos tecidos adjacentes a ela, ocasionando perda irreversível dos fotorreceptores e consequente baixa acuidade visual (AV) (SEDDON *et al.*, 2006; NEHEMY, 2006). Posteriormente, uma cicatriz disciforme pode se formar no local. Uma classificação recente, proposta por SEDDON *et al.* (2006), divide a maculopatia em 5 estágios de acordo com uma descrição mais detalhada dos achados fundoscópicos (anexo A).

A patogênese da DMRI ainda não é totalmente conhecida. No entanto, várias teorias têm sido descritas, incluindo peroxidação lipídica, processo inflamatório e alteração do sistema imune (NOWAK, 2006). A DMRI é considerada, atualmente, uma doença complexa e multifatorial, causada pela interação de fatores ambientais com múltiplos genes (HADDAD *et al.*, 2006). O tabagismo e a obesidade são os

principais fatores de risco modificáveis já demonstrados (CLEMONS *et al.*, 2005). Raça branca, idade avançada, dieta e hipertensão arterial sistêmica são exemplos de outros fatores de risco para a doença (SEDDON *et al.*, 2006; AGE-RELATED EYE DISEASE STUDY RESEARCH GROUP, 2000). Além de determinantes ambientais, existe forte evidência de que determinados polimorfismos genéticos desempenhem um importante papel no desenvolvimento da DMRI. Define-se polimorfismo genético como a ocorrência de múltiplos alelos em um *locus*, no qual pelo menos dois alelos aparecem com frequência superior a 1% na população. Entende-se por *locus* o local ocupado por um gene em um cromossomo e entendem-se por alelos os genes correspondentes de dois cromossomos homólogos (THOMPSON *et al.*, 1993).

Uma variação no gene *fator de complemento H (CFH)*, localizado no cromossomo 1q32, representa um dos polimorfismos genéticos mais estudados na DMRI. Este polimorfismo (*rs1061170*, também denominado *T1277C* ou *Y402H*) representa a substituição de timina por citosina no nucleotídeo 1277 e provoca a conseqüente troca de tirosina por histidina na posição 402 da proteína CFH. Esta proteína atua inibindo as vias clássica e alternativa do sistema complemento. Assim, sua ausência ou baixa atividade poderia ativar este sistema, servindo como um estímulo inflamatório para o desenvolvimento da DMRI (EDWARDS *et al.*, 2005; HAINES *et al.*; 2005; DONOSO *et al.*, 2006; BOON *et al.*, 2008; TEIXEIRA *et al.*, 2010).

Um outro polimorfismo (*rs10490924*, também denominado *A69S*) do gene *LOC387715* (também conhecido como *ARMS2*), localizado no cromossomo 10q26, leva a uma substituição do aminoácido alanina por serina na posição 69 da proteína codificada e também está associado a uma maior susceptibilidade ao desenvolvimento da DMRI (RIVERA *et al.* 2005; SHULER *et al.* 2010). Entretanto, a função desta proteína não é bem conhecida, embora alguns estudos sugiram que ela esteja relacionada à função das mitocôndrias (KANDA *et al.*, 2007; FRISTCHE *et al.*, 2008). Sabe-se que a disfunção desta organela celular está relacionada ao desenvolvimento da DMRI (JARRETT *et al.*, 2010).

Outros trabalhos observaram que há risco aumentado de desenvolvimento da doença, especialmente quando os polimorfismos *rs1061170 (Y402H)* do gene *CFH* e *rs10490924 (A69S)* do gene *LOC387715* estão presentes em indivíduos tabagistas e/ou obesos (SCHAUMBERG *et al.*, 2007). Também já foi demonstrado que estes polimorfismos estão independentemente relacionados à progressão dos estágios iniciais para as formas avançadas da doença (SEDDON *et al.*, 2007).

Alguns estudos sugeriram, ainda, que polimorfismos do gene fator de crescimento do endotélio vascular (*VEGF*), responsável pela codificação da proteína de mesmo nome, poderiam estar relacionados à patogênese da DMRI (CHURCHIL *et al.*, 2006; HAINES *et al.*, 2006; JANIK-PAPIS *et al.*, 2009; YU *et al.*, 2011). No entanto, alguns estudos não encontraram associação entre esta doença e os polimorfismos do gene *VEGF* (RICHARDSON *et al.*, 2007; BOEKHOORN *et al.*, 2008). O *VEGF* é uma proteína mediadora da neovascularização e da permeabilidade vascular, sendo sua expressão aumentada em condições de hipóxia (TAMMELA *et al.*, 2005). Polimorfismos deste gene já foram associados a níveis aumentados da proteína *VEGF*, tanto no sangue (RENNER *et al.*, 2000; PETROVIC *et al.*, 2008) quanto no vítreo (PETROVIC *et al.*, 2008).

Estudos conduzidos no Setor de Retina e Vítreo do Hospital São Geraldo e no Instituto da Visão demonstraram que os polimorfismos *rs1061170 (Y402H)* do gene *CFH*, *rs10490924 (A69S)* do gene *LOC387715* e *rs1413711* (também denominado *C674T*) do gene *VEGF* estão associados a um maior risco de desenvolvimento de DMRI na população brasileira. Para o polimorfismo *rs1061170 (Y402H)* do gene *CFH*, observou-se uma prevalência de 42,2% do genótipo *CC* entre pacientes com DMRI, comparada com 11,4% entre os controles ($p < 0,0001$), enquanto que para o polimorfismo *rs10490924 (A69S)* do gene *LOC387715*, verificou-se uma prevalência de 24,2% do genótipo *TT* entre pacientes com DMRI, comparada com 7,1% entre os controles ($p < 0,0001$) (NEHEMY *et al.*, 2010). Para o polimorfismo *rs1413711 (C674T)* do gene *VEGF*, verificou-se uma prevalência de 18,1% do genótipo *TT* entre pacientes com DMRI, comparada com 5,8% entre os controles ($p < 0,002$) (ALMEIDA *et al.*, 2011). Todos estes resultados sugerem que os polimorfismos citados dos genes *CFH*, *LOC387715* e *VEGF* estão associados à DMRI em pacientes brasileiros.

Outros polimorfismos genéticos, como, por exemplo, aqueles envolvendo o gene da *lipase hepática*, o *fator de complemento B*, o *componente do complemento 2*, o *HTRA-1* e o *CX3CR1*, também têm sido associados à DMRI (TUO *et al.*, 2004; GOLD B *et al.*, 2006; YANG *et al.*, 2006; SPENCER *et al.*, 2007; SEDDON *et al.*, 2010). Alguns destes polimorfismos podem ser protetores, conferindo um menor risco de desenvolvimento da doença (GOLD B *et al.*, 2006; SPENCER *et al.*, 2007; SEDDON *et al.*, 2010).

Nos últimos anos, alguns avanços têm sido obtidos na prevenção da DMRI e no tratamento da sua forma exsudativa. Um importante estudo multicêntrico, denominado *Age-Related Eye Disease Study (AREDS)*, demonstrou que a ingestão de uma combinação de vitamina C, betacaroteno, vitamina E, zinco e cobre é benéfica para alguns portadores de DMRI, reduzindo o risco de progressão para as formas avançadas da doença (AGE-RELATED EYE DISEASE STUDY RESEARCH GROUP, 2001).

Estudos multicêntricos randomizados demonstraram, previamente, que, para membranas subfoveais, a terapia fotodinâmica (PDT), utilizando a verteporfina, pode ser eficaz (TAP STUDY GROUP, 1999; VERTEPORFIN IN PHOTODYNAMIC THERAPY STUDY GROUP, 2001). Entretanto, os resultados deste tratamento são limitados, na medida em que apenas reduzem o risco de perda da visão, sendo raros os casos em que há melhora de AV (TAP STUDY GROUP, 1999; VERTEPORFIN IN PHOTODYNAMIC THERAPY REPORT 2, 2001; STERNBERG & LEWIS, 2004). O uso da triancinolona, por via intravítrea e associado à PDT, tem possibilitado melhores resultados e menor necessidade de retratamento (SPAIDE *et al.*, 2005).

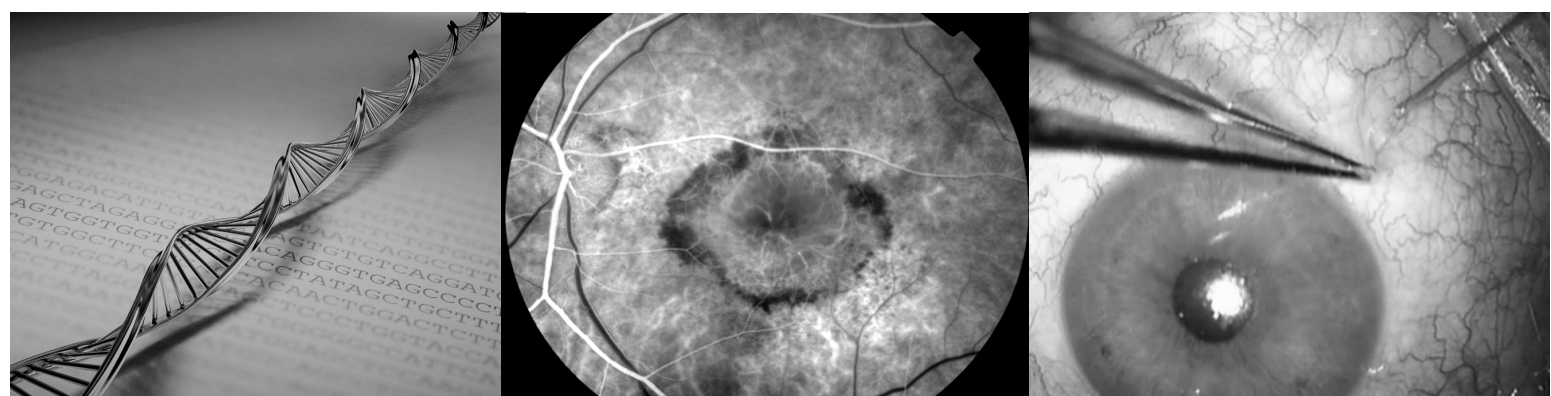
Novos conhecimentos dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos no desenvolvimento da forma exsudativa criaram um novo paradigma no tratamento da DMRI, qual seja, a intervenção no processo de formação da MNSR. Trata-se de um grande avanço, na medida em que permite, não apenas a ablação da membrana já formada, com suas inevitáveis sequelas, mas também a inibição do seu crescimento (NEHEMY, 2006). Neste contexto, a aplicação intravítrea dos agentes anti-VEGF,

como o bevacizumabe e o ranibizumabe, é considerada, atualmente, o padrão-ouro para o tratamento da DMRI exsudativa (OZKIRIS, 2010). A inibição do VEGF resulta na redução do extravasamento líquido da membrana, o que pode melhorar parcialmente a AV (GRAGOUDAS *et al.*, 2004; EYETECH STUDY GROUP, 2003). Alguns pacientes, no entanto, respondem mal a este tratamento, mostrando resistência aos antiangiogênicos (LUX *et al.*, 2007).

Estudos genéticos têm sido conduzidos com o intuito de avaliar se a resposta aos diferentes tipos de tratamento da DMRI está associada a esses fatores (BRANTLEY *et al.*, 2007; KLEIN *et al.*, 2008; BRANTLEY *et al.*, 2009). Embora o polimorfismo *rs1061170* (*Y402H*) do gene *CFH* esteja fortemente associado ao desenvolvimento da DMRI, ainda não está estabelecido se algum genótipo estaria relacionado à resposta terapêutica (NAKATA *et al.*, 2011). Com relação ao polimorfismo *rs10490924* (*A69S*) do gene *LOC387715*, a maioria dos poucos trabalhos já realizados não observou diferença estatisticamente significativa entre os genótipos e a resposta ao tratamento da DMRI exsudativa (BRANTLEY *et al.*, 2007; BRANTLEY *et al.*, 2009). Para o gene *VEGF*, diversos polimorfismos já foram avaliados, com resultados controversos (IMMONEN *et al.*, 2010; TSUCHIHASHI *et al.*, 2011). Apenas um trabalho avaliou o efeito do polimorfismo *rs1413711* (*C674T*) deste gene nos resultados terapêuticos, não tendo sido encontrada qualquer associação (KLOECKENER-GRUISSEM *et al.*, 2011).

Considerando estes fatos, o presente trabalho foi idealizado com o objetivo de avaliar, em uma mesma amostra, a associação dos polimorfismos *rs1061170* (*Y402H*) do gene *CFH*, *rs10490924* (*A69S*) do gene *LOC387715* e *rs1413711* (*C674T*) do gene *VEGF* com a resposta terapêutica da DMRI exsudativa aos antiangiogênicos bevacizumabe e ranibizumabe.

2 REVISÃO DA LITERATURA



Após a identificação da relação do polimorfismo do gene *CFH* com a DMRI em 2005 (EDWARDS *et al.*, 2005; HAINES *et al.*; 2005), inúmeros estudos têm sido realizados com o intuito de investigar a associação de polimorfismos genéticos com o desenvolvimento da DMRI e com a resposta aos seus diferentes tratamentos. Até o momento, os principais genes associados foram o *CFH*, o *LOC387715* e, mais recentemente, o *VEGF*. Por esta razão, para os propósitos deste trabalho, serão revisados os estudos que avaliaram a relação dos polimorfismos destes três genes com a resposta terapêutica da DMRI.

Os principais polimorfismos avaliados nos estudos genéticos estão abaixo relacionados, juntamente com a especificação dos alelos ancestrais e dos alelos de risco:

- **Gene *CFH*: Polimorfismo *Y402H* (*rs1061170*)**

Alelo *T*: alelo ancestral

Alelo *C*: alelo de risco

- **Gene *LOC387715*: Polimorfismo *A69S* (*rs10490924*)**

Alelo *G*: alelo ancestral

Alelo *T*: alelo de risco

- **Gene *VEGF*: Polimorfismo *C674T* (*rs1413711*)**

Alelo *C*: alelo ancestral

Alelo *T*: alelo de risco

2.1 Polimorfismos genéticos e a resposta ao tratamento preventivo da DMRI com vitaminas e antioxidantes

KLEIN *et al.* (2008) fizeram uma análise retrospectiva dos participantes do estudo *AREDS*, com o intuito de investigar a possível associação de polimorfismos genéticos com a resposta ao uso oral de agentes antioxidantes e zinco. O *AREDS* envolveu 4757 participantes de 11 centros clínicos e determinou que uma combinação de zinco com antioxidantes (betacaroteno, vitamina C e vitamina E) reduziu em 25% a chance de desenvolvimento da DMRI ao longo de cinco anos e

em 19% a chance de perda visual grave em indivíduos considerados de alto risco para o desenvolvimento das formas avançadas da doença. Foi observada uma associação entre o polimorfismo *Y402H* (*rs1061170*) do gene *CFH* e a resposta à suplementação oral com zinco e antioxidantes, ao se demonstrar que pacientes com o genótipo de risco apresentaram piores resultados ($p = 0,03$). Não houve interação entre o polimorfismo *A69S* (*rs10490924*) do gene *LOC387715* com a resposta ao tratamento empregado.

2.2 Polimorfismos genéticos e a resposta ao tratamento da DMRI exsudativa com a PDT

Outros autores avaliaram o efeito dos polimorfismos dos genes *CFH*, *LOC387715* e *VEGF* na resposta à PDT. Os resultados revelaram-se controversos, como demonstrado a seguir.

Em 2007, foi realizado um estudo envolvendo 88 pacientes portadores de DMRI e tratados com PDT para investigar a eventual associação entre o polimorfismo *Y402H* (*rs1061170*) do gene *CFH* e a resposta ao tratamento. Observou-se que a proporção de pacientes que responderam ao tratamento foi de 69,2% entre os homozigotos para o alelo de risco, de 68,0% entre os heterozigotos e de 58,3% entre os pacientes homozigotos para o alelo ancestral ($p = 0,520$). Desta forma, o polimorfismo estudado não modificou o resultado do tratamento realizado (SEITSONEN *et al.*, 2007).

GOVERDHAN *et al.* (2008) fizeram a análise do polimorfismo *Y402H* (*rs1061170*) do gene *CFH* em 27 pacientes com DMRI e tratados com PDT. Estes pacientes apresentaram período de seguimento de até 15 meses. Desses, 70,4% possuíam o alelo de risco do *CFH*, enquanto 52,3% daqueles que não precisaram tratamento apresentavam este alelo ($p = 0,011$). Os autores concluíram que homozigotos para o alelo de risco tinham maior chance de necessitar PDT ($p = 0,015$). Além disso, o grau de perda visual após o tratamento foi maior neste grupo ($p = 0,038$), evidenciando uma pior resposta ao tratamento para estes pacientes.

CHOWERS *et al.* (2008) avaliaram 143 pacientes portadores de DMRI exsudativa tratados com PDT. Os autores verificaram se o polimorfismo A69S (*rs10490924*) do gene *LOC387715* estaria relacionado tanto à DMRI exsudativa quanto à resposta ao seu tratamento. Homozigotos para o alelo *T* tiveram maior chance de apresentar essa forma da doença (OR = 8,6; IC_{95%} = 3,2 - 35,7). No entanto, não houve associação entre esse polimorfismo e a resposta à PDT. Também não houve diferença estatisticamente significativa entre os genótipos quanto ao número de sessões de tratamento necessárias.

BRANTLEY *et al.* (2009) também avaliaram a possível associação entre os polimorfismos Y402H (*rs1061170*) do gene *CFH* e A69S (*rs10490924*) do gene *LOC387715* e a resposta ao tratamento com PDT. Foram analisados 69 pacientes com DMRI tratados por este método. Para o gene *CFH*, observou-se que pacientes homozigotos para o alelo ancestral (*TT*) tinham pior resposta à PDT do que aqueles portadores dos genótipos *TC* e *CC*. Com relação ao polimorfismo do gene *LOC387715*, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os genótipos e a resposta terapêutica.

Um outro estudo, envolvendo 273 pacientes com DMRI exsudativa, não mostrou associação entre o polimorfismo Y402H (*rs1061170*) do gene *CFH* e a resposta à PDT. Esta avaliação retrospectiva mostrou que a frequência do genótipo *CC* entre os 75 pacientes que apresentaram boa resposta à PDT foi menor do que no grupo que não respondeu a este tratamento. No entanto, a diferença não foi estatisticamente significativa (FENG *et al.*, 2009).

SAKURADA *et al.* (2010) demonstraram uma associação farmacogenética entre o polimorfismo A69S (*rs10490924*) do gene *LOC387715* e os resultados a longo prazo após a PDT em olhos com vasculopatia polipoidal da coróide. Neste estudo, que envolveu 71 olhos de 71 pacientes, a PDT foi repetida a cada três meses até o desaparecimento dos sinais angiográficos das lesões ativas. Houve diferença estatisticamente significativa na AV ao final de 12 meses de seguimento ($p = 0,002$), sendo que pacientes homozigotos para o alelo de risco (*TT*) apresentaram pior resultado.

IMMONEN *et al.* (2010) avaliaram 86 pacientes tratados com PDT e estudaram a associação de três polimorfismos do gene *VEGF* (*rs699947*, *rs2146323* e *rs3025033*) com a resposta a esse tratamento. Demonstrou-se associação estatisticamente significativa dos polimorfismos *rs699947* e *rs2146323* com a resposta terapêutica. Neste estudo, houve uma maior frequência do genótipo de risco (CC) entre os pacientes que não apresentaram resposta à PDT ($p = 0,0008$ e $p = 0,0369$, respectivamente). Entretanto, os polimorfismos estudados não estiveram associados à presença da DMRI exsudativa ou ao tamanho da MNSR.

TSUCHIHASHI *et al.* (2011) não mostraram associação estatisticamente significativa entre os polimorfismos *rs699947*, *rs1570360* e *rs2010963* do gene *VEGF* e a resposta à PDT. Este estudo, que analisou 110 pacientes tratados com esse método, revelou, no entanto, uma associação estatisticamente significativa dos polimorfismos *rs1410996* e *rs2274700* do gene *CFH* com a resposta à PDT ($p = 5,58 \times 10^{-3}$). Diferenças significativas entre os genótipos foram encontradas no que se refere ao intervalo de tempo médio entre o início do tratamento e a época de recorrência da MNSR. Pacientes homocigotos para o alelo de risco apresentaram menor intervalo de tempo para recorrência da doença que os demais.

2.3 Polimorfismos genéticos e a resposta ao tratamento da DMRI exsudativa com antiangiogênicos

A partir de 2007, alguns trabalhos começaram a avaliar a relação entre os polimorfismos genéticos e a resposta terapêutica aos agentes anti-VEGF.

BRANTLEY *et al.* (2007) conduziram um estudo em que 86 pacientes com DMRI exsudativa, submetidos a tratamento com bevacizumabe intravítreo em um dos olhos, foram incluídos. Os polimorfismos *Y402H* (*rs1061170*) do gene *CFH* e *A69S* (*rs10490924*) do gene *LOC387715* foram estudados. As injeções foram realizadas com intervalos de seis semanas e repetidas até que não houvesse mais sinal de atividade da MNSR. Os pacientes foram acompanhados por um período mínimo de seis meses. Os autores demonstraram que pacientes homocigotos para o alelo de risco do gene *CFH* (CC) apresentaram pior resultado visual do que pacientes portadores dos genótipos *TC* ou *TT* ($p = 0,016$). Com relação ao gene

LOC387715, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os genótipos e a resposta terapêutica ao bevacizumabe.

Um segundo estudo farmacogenético, conduzido pelo mesmo grupo de pesquisadores, foi publicado posteriormente. Este trabalho foi realizado com o objetivo de determinar, através de uma análise retrospectiva, o efeito dos genótipos do *CFH* na resposta ao tratamento com ranibizumabe. Foram avaliados 178 pacientes com DMRI exsudativa em atividade, tratados inicialmente com uma injeção intravítrea de ranibizumabe. Injeções subseqüentes foram realizadas de acordo com a necessidade e o período de seguimento foi de, no mínimo, nove meses. Apenas o polimorfismo *Y402H (rs1061170)* do gene *CFH* foi avaliado. Os autores não encontraram diferença estatisticamente significativa em relação à melhora da AV entre os diferentes genótipos do *CFH*. No entanto, ao longo de nove meses de acompanhamento, pacientes homozigotos para o alelo de risco receberam aproximadamente uma injeção intravítrea a mais que os demais (LEE *et al.*, 2009).

IMAI *et al.* (2010) encontraram uma associação dos polimorfismos *Y402H (rs1061170)* do gene *CFH* e *rs699947* do gene *VEGF* com a melhora da AV após o tratamento com bevacizumabe. Foram estudados 83 pacientes com DMRI exsudativa, tratados com uma única injeção intravítrea de bevacizumabe. Os pacientes foram acompanhados por um período de seis meses. Com relação ao gene *CFH*, os pacientes heterozigotos (*CT*) apresentaram pior resposta terapêutica, quando comparados com pacientes homozigotos para o alelo ancestral (*TT*), nas avaliações realizadas com um e três meses após o tratamento ($p = 0,00766$ e $p = 0,00783$, respectivamente). Na amostra estudada, não houve pacientes portadores do genótipo *CC*. Não foi observada associação entre o gene *CFH* e alteração da espessura macular central (EMC) um mês após o tratamento. Com relação ao gene *VEGF*, houve associação estatisticamente significativa com a alteração da AV apenas se considerada a avaliação realizada um mês após o tratamento. Neste caso, a frequência do alelo de risco foi maior entre pacientes que não responderam bem ao tratamento ($p = 5,11 \times 10^{-3}$). Também não houve associação entre este gene e a alteração da EMC medida um mês após a injeção. Entretanto, a redução da EMC média, em pacientes homozigotos para o alelo ancestral do gene *VEGF*, apresentou uma tendência de ser maior do que naqueles heterozigotos e

homozigotos para o alelo de risco ($p = 0,0667$). Este mesmo estudo não mostrou correlação entre a resposta ao tratamento e os polimorfismos *rs2010963* e *rs1570360* desse mesmo gene.

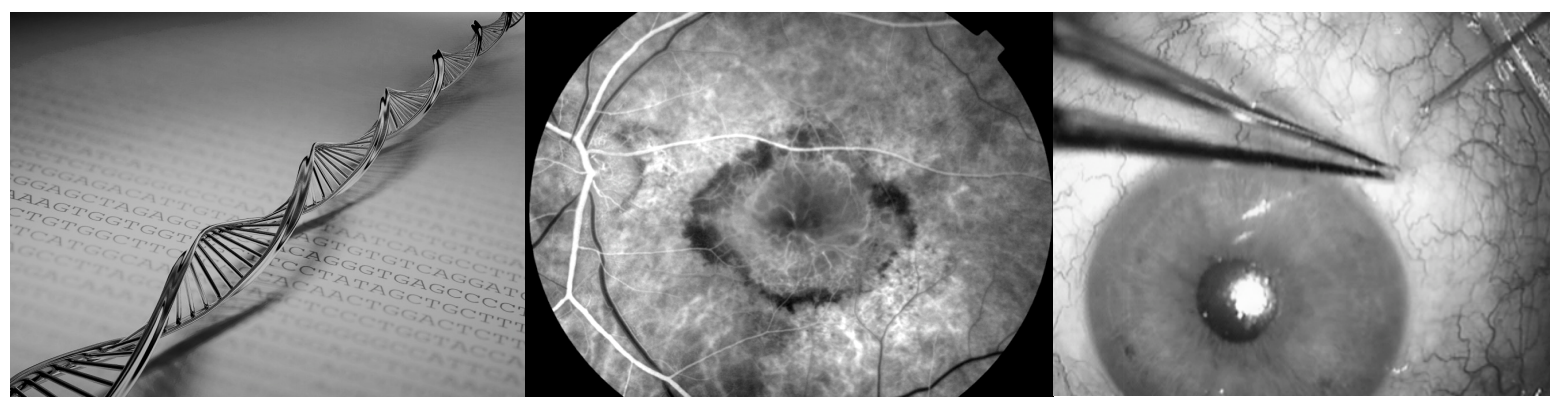
NAKATA *et al.* (2011) investigaram a associação entre o gene *VEGF* e a resposta terapêutica, tanto ao bevacizumabe intravítreo usado isoladamente quanto à PDT associada ao uso de triancinolona e bevacizumabe intravítreo. Este trabalho envolveu 94 pacientes submetidos ao bevacizumabe e 79 pacientes que receberam a terapia tríplice. Dos quatro polimorfismos estudados (*rs699946*, *rs699947*, *rs3025033* e *rs3025035*), apenas um (*rs699946*) apresentou associação estatisticamente significativa com a alteração da AV 12 meses após o tratamento, independentemente dos pacientes terem recebido bevacizumabe isoladamente ($p = 0.044$) ou tratamento combinado ($p = 0.010$). Neste caso, pacientes homozigotos para o alelo ancestral apresentaram pior resposta ao tratamento.

KLOECKENER-GRUISSEM *et al.* (2011) estudaram os polimorfismos *Y402H* (*rs1061170*) do gene *CFH* e *C674T* (*rs1413711*) do gene *VEGF* em 267 pacientes (309 olhos) submetidos ao ranibizumabe intravítreo. Injeções subseqüentes foram realizadas apenas se os sinais de atividade da lesão estivessem presentes. A AV destes pacientes foi acompanhada por um período de 12 meses, não tendo sido encontrada, ao fim deste período, associação entre o polimorfismo estudado do gene *VEGF* e a resposta terapêutica. Com relação ao polimorfismo do gene *CFH*, pacientes com o genótipo de risco (*CC*) apresentaram pior resposta ao tratamento do que aqueles portadores dos genótipos *CT* e *TT* ($p = 0,005$ e $p = 0,006$, respectivamente).

NISCHLER *et al.* (2011) realizaram um estudo prospectivo em que 197 pacientes portadores de DMRI exsudativa foram tratados com bevacizumabe intravítreo a cada seis semanas, até que não houvesse mais sinal de atividade da MNSR. Para o polimorfismo *Y402H* do gene *CFH*, observou-se que pacientes homozigotos para o alelo de risco apresentaram pior resposta terapêutica quando a AV para perto e para longe foi avaliada ($p = 0,042$). O percentual de pacientes que apresentou melhora da AV \geq três linhas foi maior no grupo dos homozigotos para o alelo ancestral e no dos heterozigotos, mas de forma não estatisticamente

significativa (para AV para longe: $p = 0,19$; para AV para perto: $p = 0,13$). Além disso, um menor percentual de pacientes mostrou piora \geq três linhas nestes grupos de pacientes (para AV para longe: $p = 0,04$; para AV para perto: $p = 0,02$). Com relação à EMC média, houve melhora estatisticamente significativa para todos os genótipos. No entanto, não houve diferença entre eles quando a EMC pós-tratamento foi avaliada.

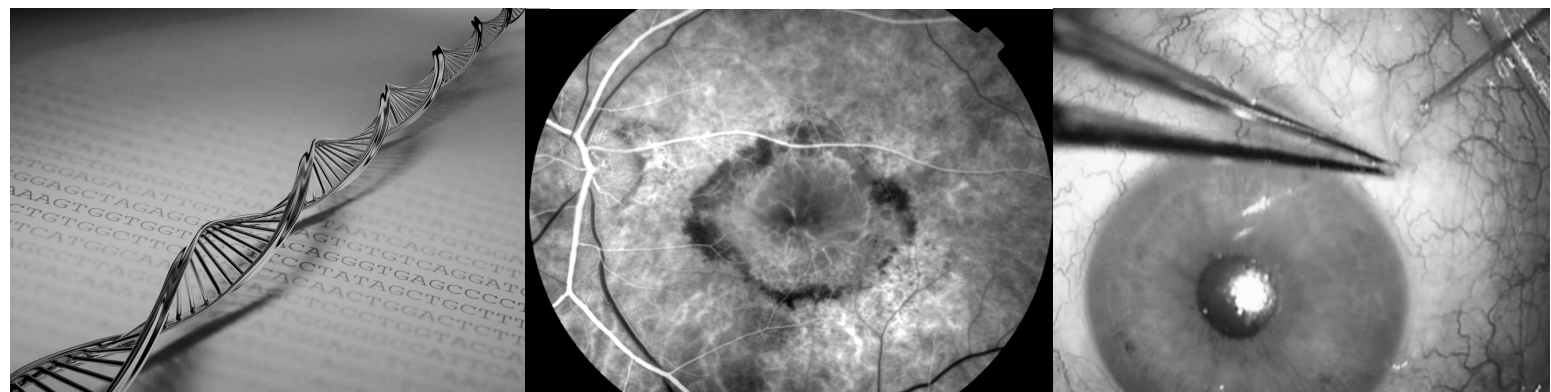
3 OBJETIVOS



Os objetivos deste trabalho foram:

- 1) Investigar a associação entre o polimorfismo *Y402H (rs1061170)* do gene *CFH* e a resposta terapêutica da DMRI exsudativa aos antiangiogênicos bevacizumabe e ranibizumabe.
- 2) Investigar a associação entre o polimorfismo *A69S (rs10490924)* do gene *LOC387715* e a resposta terapêutica da DMRI exsudativa aos antiangiogênicos bevacizumabe e ranibizumabe.
- 3) Investigar a associação entre o polimorfismo *C674T (rs1413711)* do gene *VEGF* e a resposta terapêutica da DMRI exsudativa aos antiangiogênicos bevacizumabe e ranibizumabe.

4 MÉTODO



4.1 Pacientes

Foram avaliados, para inclusão neste estudo, todos os pacientes portadores de DMRI, examinados entre 2008 e 2011, no Instituto da Visão. Dentro de uma rotina usual de avaliação e tratamento, os pacientes foram inicialmente submetidos a exame oftalmológico completo, incluindo biomicroscopia, retinografia, angiografias com indocianina verde e tomografia de coerência óptica (OCT). A angiografia com indocianina verde foi realizada em casos suspeitos de apresentarem vasculopatia polipoidal da coróide ou proliferação angiomasiosa da retina. Os pacientes portadores de DMRI exsudativa que concordaram com sua participação no estudo tiveram uma amostra de sangue coletada para a análise dos polimorfismos genéticos relacionados à doença. A classificação da DMRI foi feita baseada naquela proposta por SEDDON *et al.* (2006) (anexo A). Para efeitos deste trabalho, o grau 3 dessa classificação foi considerado DMRI inicial, enquanto os graus 4 e 5 foram considerados DMRI tardia. Pacientes portadores dos graus 1 e 2 não foram incluídos neste trabalho.

Os pacientes incluídos neste estudo foram informados a respeito de sua natureza e assinaram termo de consentimento baseado nas orientações da Declaração de Helsinki (anexo B). O projeto foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais e do Instituto da Visão (anexo C).

4.2 Tratamento com injeção intravítrea de antiangiogênicos

Os pacientes foram submetidos a um protocolo de tratamento que incluiu a realização de três injeções intravítreas consecutivas de antiangiogênico, com intervalo mensal entre elas. Após a terceira dose, instituiu-se um protocolo *pro re nata*, de modo que o intervalo entre as injeções poderia variar de acordo com a necessidade. O número de injeções intravítreas adicionais entre o terceiro e o sexto mês de seguimento foi avaliado de acordo com os genótipos dos três genes.

As injeções intravítreas de agentes anti-VEGF foram realizadas utilizando bevacizumabe 1,25mg/0,1mL (Avastin®) ou ranibizumabe 0,5mg/0,05mL

(Lucentis®). A opção por uma dessas drogas foi feita pelo paciente após explicação pelo médico das diferenças existentes entre elas. As aplicações foram realizadas em bloco cirúrgico, com técnica cirúrgica padronizada.

Os **critérios de retratamento** incluíram:

- a) Persistência ou aumento de líquido intra ou sub-retiniano;
- b) Aumento de descolamento do EPR;
- c) Piora de pelo menos uma linha de AV;
- d) Aparecimento de hemorragia sub-retiniana.

O retratamento foi feito sempre com a mesma droga utilizada nas três primeiras injeções.

4.3 Medida da acuidade visual e da espessura macular central

A resposta ao tratamento foi baseada na AV e na EMC. Os pacientes foram reavaliados mensalmente durante os primeiros três meses e a cada quatro a seis semanas nos meses subsequentes. A melhor AV corrigida e a EMC foram medidas na primeira consulta e em todas as visitas realizadas após o início do tratamento. A AV foi obtida através do exame refracional, utilizando-se a tabela de *Snellen*, de forma padronizada para todos os pacientes. Para fins estatísticos, a AV foi convertida para os valores do logaritmo do mínimo ângulo de resolução - logMAR (anexo D) (HOLLADAY, 1997). Melhora da AV \geq três linhas foi também analisada. Para a obtenção da EMC, foi utilizada OCT de domínio espectral (Spectralis OCT® [Heidelberg Engineering, Heidelberg, Alemanha]), sendo que a medida foi baseada no subcampo central de 1mm do mapa de espessura fornecido pelo tomógrafo. A segmentação automática dos limites da retina foi utilizada, mas, em casos de erro, a correção manual foi empregada. As medidas da AV, da EMC e o tratamento com injeção intravítrea foram realizados por diferentes pesquisadores.

4.4 Critérios de inclusão e exclusão

Os **critérios de inclusão** foram:

- a) Idade acima de 50 anos;

- b) Diagnóstico de DMRI exsudativa confirmado pelos exames complementares;
- c) Acuidade visual melhor ou igual a 20/400 (em caso de DMRI exsudativa bilateral em que ambos os olhos preencheram os critérios de inclusão, apenas o olho com pior AV foi incluído);
- d) Pacientes que receberam tratamento inicial com três doses (*loading dose*), com intervalo mensal entre elas, de bevacizumabe ou ranibizumabe;
- e) Período de seguimento de pelo menos seis meses.

Os **critérios de exclusão** foram:

- a) Tratamento prévio para DMRI exsudativa;
- b) Tratamento combinado durante o período estudado;
- c) Casos de vasculopatia polipoidal da coróide;
- d) Realização prévia de vitrectomia posterior;
- e) Outras doenças oculares concomitantes capazes de afetar a AV.

4.5 Genotipagem

Inicialmente, amostras de sangue (10 mL) foram obtidas através da punção venosa realizada previamente ao exame de angiofluoresceinografia dos pacientes. O material foi imediatamente imerso em um tubo estéril contendo EDTA e mantido em temperatura ambiente.

As amostras foram, em seguida, enviadas ao Laboratório de Genética da Faculdade de Medicina da UFMG. A extração do ácido desoxirribonucléico (DNA) das amostras de sangue foi realizada através de método padronizado, baseado naquele previamente descrito por LAHIRI & NURNBERGER (1991).

A genotipagem foi realizada através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, que envolve a utilização de um termociclador. Para sua realização, foram utilizados insumos da *Applied Biosystems: TaqMan® SNP Genotyping Assays*. As sondas utilizadas foram exclusivas para cada polimorfismo: *rs1061170 (CFH)*, *rs10490924 (LOC387715)* e *rs1413711 (VEGF)*.

Cada sonda possuía dois marcadores específicos para cada alelo do polimorfismo, chamados fluoróforos - moléculas que absorvem e emitem luz em um comprimento de onda característico, utilizadas para a detecção dos polimorfismos ao longo dos ciclos da PCR. O protocolo empregado para a realização da PCR foi o sugerido pelas instruções de uso do *TaqMan® Genotyping Master Mix (Applied Biosystems)*, como mostrado a seguir: 3,5 μL do tampão, 0,1 μL da sonda, 3,4 μL de água deionizada, 1,0 μL de DNA (50 ng/ μL), formando um volume total de 8 μL . Este produto foi, então, colocado no aparelho de PCR em tempo real. As condições para realização da PCR foram: um ciclo de 10 minutos a 95°C (para ativação enzimática); 50 ciclos de 15 segundos a 95°C (para a desnaturação) e 60 segundos a 60°C (para hibridização ou anelamento e extensão). Para controle de qualidade de cada placa de PCR, 10% das amostras testadas foram novamente analisadas na mesma placa. A aquisição dos dados e análise final da reação foi feita por um software específico para a discriminação alélica (*Stratagene Mx3005 – MxPro QPCR- Software, 2007*). A análise foi realizada de acordo com a proximidade de cada amostra em relação ao eixo de fluorescência (Figura 1).

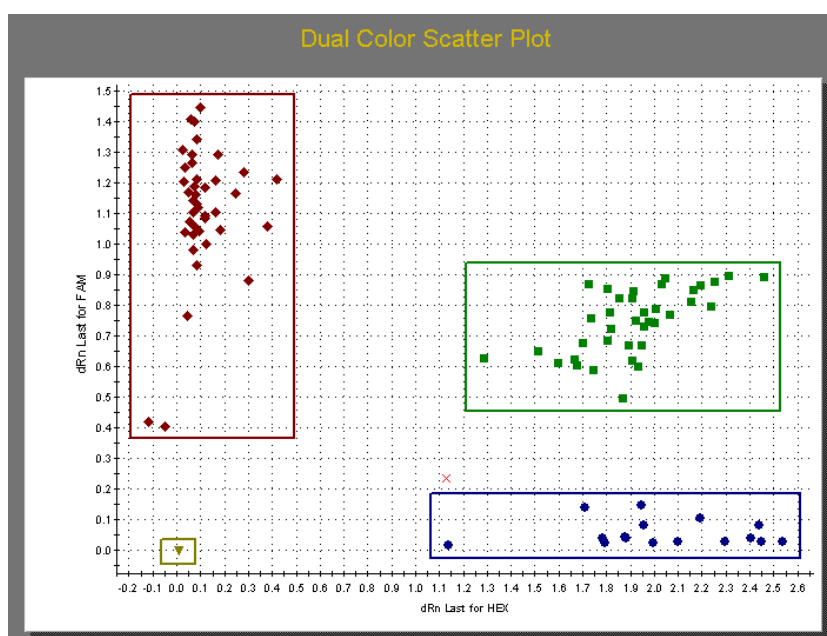


FIGURA 1. Resultado da leitura da PCR em tempo real.

Os fluoróforos de cada sonda indicavam a presença de um alelo específico de cada polimorfismo pré-determinado pelo fabricante como mostrado a seguir:

- **Polimorfismo: rs1061170 (CFH)**

FAM: Alelo *T* (alelo ancestral)

HEX: Alelo *C* (alelo de risco)

- **Polimorfismo: rs10490924 (LOC387715)**

FAM: Alelo *T* (alelo de risco)

HEX: Alelo *G* (alelo ancestral)

- **Polimorfismo: rs1413711 (VEGF)**

FAM: Alelo *T* (alelo de risco)

HEX: Alelo *A* (alelo ancestral)

O resultado da genotipagem não foi fornecido aos pesquisadores responsáveis pelo tratamento e pelas medidas da AV e da EMC.

4.6 Análise Estatística

As informações coletadas foram digitadas em um banco de dados desenvolvido no Excel[®]. Os resultados descritivos foram obtidos utilizando frequências e porcentagens para as características das diversas variáveis categóricas, e medidas de tendência central (média e mediana), assim como medidas de dispersão (desvio-padrão), para as variáveis contínuas. Significância estatística foi considerada se valor- $p < 0,05$.

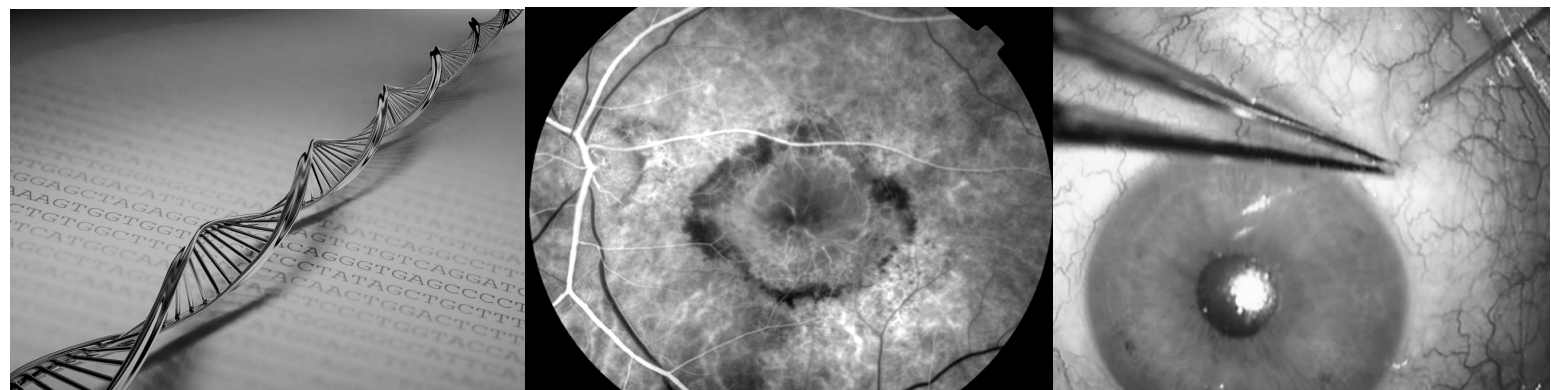
As comparações entre uma variável quantitativa e uma variável qualitativa com duas categorias foram realizadas por meio do teste *t* de *Student*, quando a suposição de normalidade foi atendida (verificada pelo teste de *Hosmer-Lemeshow*) e *Mann-Whitney*, caso contrário. As variáveis quantitativas foram comparadas com três categorias a partir do teste F(ANOVA) se a suposição de normalidade foi atendida, e *Kruskal-Wallis*, caso contrário.

As comparações de proporções entre duas variáveis qualitativas binárias foram realizadas por meio do teste Qui-Quadrado com correção *Yates*. Na presença de pelo menos uma frequência esperada menor que cinco, foi utilizado o teste exato

de *Fisher*. As comparações de proporções com pelo menos uma das variáveis com mais de duas categorias foram realizadas por meio do teste Qui-Quadrado de *Pearson*.

As comparações dos dados pareados (medidas de um mesmo paciente) foram realizadas por meio do teste *t* pareado quando a suposição de normalidade foi satisfeita e teste de *Wilcoxon*, caso contrário.

5 RESULTADOS



Um total de 585 olhos de 362 pacientes portadores de todas as formas de DMRI foi avaliado. A fase inicial da DMRI foi diagnosticada em 151 olhos (25,8%), enquanto que 434 (74,2%) apresentaram os estágios tardios da doença. A forma exsudativa/cicatricial da DMRI foi diagnosticada em 370 olhos (63,2%) e 64 olhos (11,0%) mostraram atrofia geográfica (gráfico 1).

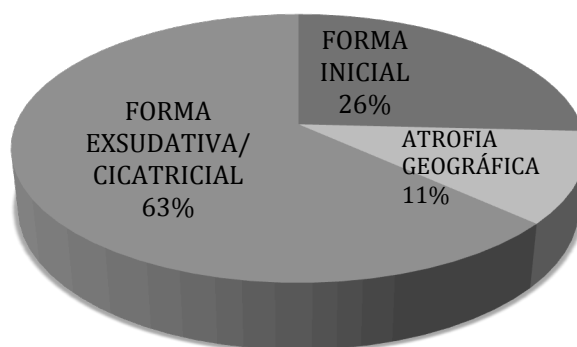


Gráfico 1. Classificação da DMRI em todos os pacientes avaliados entre 2008 e 2011.

DMRI exsudativa em atividade foi diagnosticada em 253 olhos. Para este estudo, foram avaliadas as amostras de sangue de todos os pacientes portadores de DMRI exsudativa que concordaram em participar do trabalho e cuja análise pôde ser disponibilizada pelo Laboratório de Genética da Faculdade de Medicina da UFMG. Após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, um total de 95 olhos de 95 pacientes foi incluído.

A idade média de todo o grupo foi de $75,0 \pm 8,9$ anos (mediana: 77; mínimo: 54; máximo: 91) e 51 pacientes (53,6%) eram do sexo feminino. A idade média foi de $76,1 \pm 9,2$ anos (mediana: 78) para as mulheres e de $73,9 \pm 8,5$ anos (mediana: 75) para os homens ($p = 0,23$; teste t de *Student*). Ranibizumabe foi o antiangiogênico utilizado em 40 olhos (42,1%), enquanto o bevacizumabe foi aplicado em 55 olhos (57,9%).

Para o total de 95 pacientes, observou-se que, em uma análise pareada, houve melhora estatística quando a AV média obtida com um, três e seis meses foi comparada com a AV média pré-tratamento. Em uma análise pareada da EMC média, a diferença foi estatisticamente significativa em todas as visitas (tabela 1).

TABELA 1. Acuidade visual média e espessura macular central média dos 95 olhos incluídos no estudo.

	Pré-tratamento	1 mês	3 meses	6 meses
AV* - logMAR	0,67 ± 0,39 (0,6)	0,62 ± 0,43 (0,5)	0,60 ± 0,46 (0,5)	0,64 ± 0,46 (0,5)
Valor-p		0,01¹	0,01¹	0,04¹
EMC* - μm	338,1 ± 93,7 (322)	303,6 ± 94,7 (290)	291,6 ± 87,4 (277)	288,9 ± 85,7 (275)
Valor-p		< 0,001¹	< 0,001¹	< 0,001¹

AV: acuidade visual; EMC: espessura macular central; logMAR: logaritmo do mínimo ângulo de resolução.

*: média ± desvio-padrão (mediana).

1: teste de *Wilcoxon*.

A AV e a EMC média obtidas com um, três e seis meses também foram comparadas com os dados pré-tratamento, de acordo o tipo de droga intravítrea utilizada: bevacizumabe ou ranibizumabe. Os resultados foram semelhantes entre os dois grupos estudados. Quando foi avaliada a melhora média da AV e da EMC obtida em cada uma das visitas, de acordo com o tipo de injeção intravítrea empregada, não houve diferença estatisticamente significativa (tabelas 2 a 5).

TABELA 2. Comparação da acuidade visual média, de acordo com o tipo de droga intravítrea utilizada, entre o período pré-tratamento e 1, 3 e 6 meses após.

	Pré-tratamento	1 mês	3 meses	6 meses
Bevacizumabe				
AV* - logMAR	0,66 ± 0,42 (0,6)	0,62 ± 0,45 (0,5)	0,61 ± 0,47 (0,5)	0,64 ± 0,48 (0,5)
Valor-p		0,04¹	0,04¹	0,34 ¹
Ranibizumabe				
AV* - logMAR	0,68 ± 0,37 (0,5)	0,64 ± 0,42 (0,5)	0,60 ± 0,45 (0,5)	0,64 ± 0,45 (0,5)
Valor-p		0,04¹	0,01¹	0,06 ¹

AV: acuidade visual; logMAR: logaritmo do mínimo ângulo de resolução.

*: média ± desvio-padrão (mediana).

1: teste de *Wilcoxon*.

TABELA 3. Comparação da melhora média da acuidade visual, de acordo com o tipo de droga intravítrea utilizada, com 1, 3 e 6 meses após o início do tratamento.

	1 mês	3 meses	6 meses
Bevacizumabe			
Melhora da AV* - logMAR	0,04 ± 0,24 (0)	0,05 ± 0,26 (0,1)	0,02 ± 0,30 (0,05)
Ranibizumabe			
Melhora da AV* - logMAR	0,04 ± 0,25 (0)	0,08 ± 0,29 (0,1)	0,04 ± 0,32 (0,1)
Valor-p	0,57 ¹	0,52 ¹	0,63 ¹

AV: acuidade visual; logMAR: logaritmo do mínimo ângulo de resolução.

*: média ± desvio-padrão (mediana).

1: Teste de *Mann-Whitney*.

TABELA 4. Comparação da espessura macular central média, de acordo com o tipo de droga intravítrea utilizada, entre o período pré-tratamento e 1, 3 e 6 meses após.

	Pré-tratamento	1 mês	3 meses	6 meses
Bevacizumabe				
EMC* - μm	325,3 \pm 84,3 (302,5)	292,3 \pm 80,3 (269)	284,1 \pm 75,1 (268)	275,2 \pm 72,8 (273)
Valor-p		< 0,0001 ²	<0,0001 ¹	<0,0001 ²
Ranibizumabe				
EMC* - μm	348,3 \pm 102,6 (332)	313,1 \pm 107,0 (296)	298,5 \pm 98,0 (278)	301,4 \pm 95,4 (275)
Valor-p		<0,0001 ¹	<0,0001 ¹	<0,0001 ¹

EMC: espessura macular central.

*: média \pm desvio-padrão (mediana).

1: teste de *Wilcoxon*.

2: teste *t* pareado.

TABELA 5. Comparação da melhora média da espessura macular central, de acordo com o tipo de droga intravítrea utilizada, com 1, 3 e 6 meses após o início do tratamento.

	1 mês	3 meses	6 meses
Bevacizumabe			
Melhora da EMC* - μm	33,4 \pm 40,7 (26)	42,2 \pm 59,1 (36)	51,2 \pm 69,2 (36)
Ranibizumabe			
Melhora da EMC* - μm	34,6 \pm 88,8 (11,5)	48,7 \pm 85,3 (21,5)	45,8 \pm 103,6 (20)
Valor-p	0,21 ¹	0,70 ¹	0,38 ¹

EMC: espessura macular central.

*: média \pm desvio-padrão (mediana).

1: Teste de *Mann-Whitney*.

A seguir, são demonstrados os resultados de acordo com cada polimorfismo genético estudado.

5.1 Polimorfismo *Y402H (rs1061170)* do gene *CFH*

Dos 95 pacientes, 15 (15,8%) eram portadores do genótipo *TT*, 56 (58,9%) eram heterozigotos (*TC*) e 24 (25,3%) eram homozigotos para o alelo de risco (*CC*). Todas as características pré-tratamento, de acordo com os genótipos do gene *CFH*, estão mostradas na tabela 6. A AV média e a EMC média pré-tratamento não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os diferentes genótipos. Da mesma forma, não houve diferença com relação à idade, sexo e tipo de tratamento realizado.

TABELA 6. Características pré-tratamento agrupadas de acordo com os genótipos do gene *CFH*.

	Genótipos			Valor-p
	<i>TT</i>	<i>TC</i>	<i>CC</i>	
Idade*	80,1 ± 4,8 (79)	74,1 ± 10,4 (76)	74,2 ± 6,1 (75)	0,06 ¹
Masculino/Feminino	6/9	24/32	14/10	0,38 ²
Bevacizumabe/Ranibizumabe	11/4	31/25	13/11	0,40 ²
AV* - logMAR	0,81 ± 0,4 (0,9)	0,63 ± 0,4 (0,5)	0,66 ± 0,5 (0,6)	0,26 ³
EMC* - μm	340,7 ± 98,3 (327)	326,2 ± 80,1 (308)	364,3 ± 116,7 (348)	0,43 ³

AV: acuidade visual; EMC: espessura macular central; logMAR: logaritmo do mínimo ângulo de resolução.

*: média ± desvio-padrão (mediana).

1: F(ANOVA).

2: teste Qui-Quadrado de *Pearson*.

3: *Kruskal-Wallis*.

Na avaliação realizada um mês após o início do tratamento, houve melhora da AV média em todos os grupos, principalmente para os genótipos *TT* e *TC*. No entanto, esta diferença não foi estatisticamente significativa. A AV média melhorou de forma significativa para os pacientes portadores dos genótipos *TT* e *TC* quando a medida obtida aos três meses foi comparada com aquela tomada antes do início do tratamento. A medida da AV aos seis meses também mostrou melhora em relação ao pré-tratamento, mas de forma não significativa. Para os portadores do genótipo *CC*, não houve melhora estatisticamente significativa da AV aos três e seis meses (tabela 7). Quando a melhora média da AV foi comparada entre os três genótipos, não se observou diferença estatisticamente significativa (tabela 8).

TABELA 7. Comparação da acuidade visual média, de acordo com os genótipos do gene *CFH*, entre o período pré-tratamento e 1, 3 e 6 meses após.

	Pré-tratamento	1 mês	3 meses	6 meses
Genótipo <i>TT</i>				
AV* - logMAR	0,81 ± 0,4 (0,9)	0,75 ± 0,4 (0,7)	0,64 ± 0,4 (0,7)	0,73 ± 0,4 (0,6)
Valor-p		0,10 ¹	0,03¹	0,34 ¹
Genótipo <i>TC</i>				
AV* - logMAR	0,63 ± 0,4 (0,5)	0,59 ± 0,4 (0,5)	0,58 ± 0,45 (0,5)	0,61 ± 0,4 (0,5)
Valor-p		0,10 ²	0,02²	0,20 ²
Genótipo <i>CC</i>				
AV* - logMAR	0,66 ± 0,5 (0,6)	0,65 ± 0,5 (0,6)	0,62 ± 0,6 (0,5)	0,64 ± 0,4 (0,7)
Valor-p		0,82 ¹	0,44 ¹	0,68 ¹

AV: acuidade visual; logMAR: logaritmo do mínimo ângulo de resolução.

*: média ± desvio-padrão (mediana).

1: teste *t* pareado.

2: teste de *Wilcoxon*.

TABELA 8. Comparação da melhora média da acuidade visual entre os genótipos do gene *CFH* com 1, 3 e 6 meses após o início do tratamento.

	1 mês	3 meses	6 meses
Genótipo TT			
Melhora da AV* - logMAR	0,06 ± 0,14 (0)	0,17 ± 0,28 (0)	0,09 ± 0,35 (0,1)
Genótipo TC			
Melhora da AV* - logMAR	0,04 ± 0,26 (0)	0,05 ± 0,27 (0,1)	0,02 ± 0,32 (0,05)
Genótipo CC			
Melhora da AV* - logMAR	0,01 ± 0,27 (0)	0,05 ± 0,29 (0,1)	0,03 ± 0,30 (0,1)
Valor-p	0,94 ¹	0,83 ¹	0,85 ¹

AV: acuidade visual; logMAR: logaritmo do mínimo ângulo de resolução.

*: média ± desvio-padrão (mediana).

1: teste de *Kruskal-Wallis*.

Quando a melhora da AV \geq três linhas foi comparada entre os diferentes genótipos do gene *CFH*, não foi observada diferença estatisticamente significativa em nenhuma das visitas realizadas (tabela 9).

TABELA 9. Comparação da melhora da acuidade visual \geq 3 linhas, de acordo com os genótipos do gene *CFH*, entre o período pré-tratamento e 1, 3 e 6 meses após.

	1 mês			3 meses			6 meses		
	Genótipos			Genótipos			Genótipos		
	TT	TC	CC	TT	TC	CC	TT	TC	CC
Melhora \geq 3 linhas									
Sim	2	11	3	5	11	4	6	11	3
	13,3%	19,6%	12,5%	33,3%	19,6%	16,6%	40,0%	19,6%	12,5%
Não	13	45	21	10	45	20	9	45	21
	86,7%	80,4%	87,5%	66,7%	80,4%	83,4%	60,0%	80,4%	87,5%
Valor-p		0,74 ¹			0,43 ¹			0,13 ¹	

1: Teste exato de *Fisher*.

Com relação à EMC, a tabela 10 mostra que houve melhora significativa, em relação ao pré-tratamento, para os três genótipos em todas as avaliações realizadas. Não houve diferença estatisticamente significativa quando a melhora média da EMC foi comparada entre os diferentes genótipos do gene *CFH* (tabela 11).

TABELA 10. Comparação da espessura macular central média, de acordo com os genótipos do gene *CFH*, entre o período pré-tratamento e 1, 3 e 6 meses após.

	Pré-tratamento	1 mês	3 meses	6 meses
Genótipo TT				
EMC* - μm	340,7 \pm 98,3 (327)	304,1 \pm 101,8 (304)	276,1 \pm 97,1 (238)	276,5 \pm 76,8 (272)
Valor-p		0,006²	0,008²	0,007¹
Genótipo TC				
EMC* - μm	326,2 \pm 80,1 (308)	290,1 \pm 87,8 (275)	283,8 \pm 78,5 (275)	285,4 \pm 80,8 (275)
Valor-p		<0,001²	<0,001²	<0,001²
Genótipo CC				
EMC* - μm	364,3 \pm 116,7 (348)	334,8 \pm 102,6 (331)	319,8 \pm 98,3 (295)	304,8 \pm 102,2 (284)
Valor-p		0,022¹	0,003²	0,003²

EMC: espessura macular central.

*: média \pm desvio-padrão (mediana).

1: teste *t* pareado.

2: teste de *Wilcoxon*.

TABELA 11. Comparação da melhora média da espessura macular central entre os genótipos do gene *CFH* com 1, 3 e 6 meses após o início do tratamento.

	1 mês	3 meses	6 meses
Genótipo TT			
Melhora da EMC* - μm	36,6 \pm 51,2 (23)	64,5 \pm 74,1 (58)	64,2 \pm 117,5 (50)
Genótipo TC			
Melhora da EMC* - μm	35,1 \pm 78,8 (29)	42,4 \pm 73,9 (28)	40,8 \pm 79,8 (28)
Genótipo CC			
Melhora da EMC* - μm	29,6 \pm 59,1 (12,5)	44,6 \pm 74,3 (21)	59,5 \pm 89,0 (47)
Valor-p	0,79 ¹	0,42 ¹	0,50 ¹

EMC: espessura macular central.

*: média \pm desvio-padrão (mediana).

1: teste de *Kruskal-Wallis*.

Para pacientes portadores do genótipo CC, foi necessário um número médio de injeções intravítreas entre três e seis meses de $1,2 \pm 0,8$ (mediana: 1,0), enquanto que para pacientes heterozigotos e homozigotos para o alelo ancestral, as médias foram $1,1 \pm 0,8$ (mediana: 1,0) e $1,0 \pm 0,9$ (mediana: 1,0), respectivamente ($p = 0,76$; teste de *Kruskal-Wallis*). Estes dados mostram, portanto, que não houve diferença estatisticamente significativa no número de injeções necessárias entre três e seis meses com relação aos três genótipos estudados.

5.2 Polimorfismo A69S (rs10490924) do gene LOC387715

Dos 95 pacientes, 35 (36,8%) eram portadores do genótipo GG, 41 (43,2%) eram heterozigotos (GT) e 19 (20,0%) eram homozigotos para o alelo de risco (TT). Todas as características pré-tratamento, de acordo com os genótipos do gene LOC387715, estão mostradas na tabela 12. A AV média e a EMC média pré-tratamento não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os diferentes genótipos. Da mesma forma, não houve diferença estatisticamente significativa com relação ao sexo e ao tipo de tratamento realizado. Observou-se, no entanto, uma maior frequência de pacientes do gênero feminino entre aqueles com genótipos GT e TT ($p = 0,04$).

TABELA 12. Características pré-tratamento agrupadas de acordo com os genótipos do gene LOC387715.

	Genótipos			Valor-p
	GG	GT	TT	
Idade*	75,7 ± 9,4 (80)	74,4 ± 9,4 (75)	75,4 ± 7,3 (77)	0,53 ³
Masculino/Feminino	22 /13	14/27	8 /11	0,04 ²
Bevacizumabe/Ranibizumabe	23/12	25/16	7/12	0,10 ²
AV* - logMAR	0,73 ± 0,4 (0,6)	0,66 ± 0,4 (0,6)	0,56 ± 0,4 (0,4)	0,33 ¹
EMC* - μm	350,2 ± 95,3 (338)	326,2 ± 87,5 (306)	341,6 ± 105,4 (305)	0,57 ³

AV: acuidade visual; EMC: espessura macular central; logMAR: logaritmo do mínimo ângulo de resolução.

*: média ± desvio-padrão (mediana).

1: F(ANOVA).

2: Teste Qui-Quadrado de *Pearson*.

3: *Kruskal-Wallis*.

A AV média melhorou de forma estatisticamente significativa para os pacientes portadores dos genótipos GG e GT quando a medida obtida aos três meses foi comparada com aquela tomada antes do início do tratamento. Em todas as demais visitas, não houve diferença estatisticamente significativa. Os portadores do genótipo TT não apresentaram melhora significativa em qualquer uma das visitas. (tabela 13). No entanto, quando a melhora média da AV foi comparada entre os diferentes genótipos, não foi observada diferença estatisticamente significativa (tabela 14).

TABELA 13. Comparação da acuidade visual média, de acordo com os genótipos do gene *LOC387715*, entre o período pré-tratamento e 1, 3 e 6 meses após.

	Pré-tratamento	1 mês	3 meses	6 meses
Genótipo GG				
AV* - logMAR	0,73 ± 0,4 (0,6)	0,67 ± 0,4 (0,5)	0,64 ± 0,4 (0,5)	0,68 ± 0,4 (0,6)
Valor-p		0,06 ¹	0,01¹	0,22 ¹
Genótipo GT				
AV* - logMAR	0,66 ± 0,4 (0,6)	0,65 ± 0,5 (0,5)	0,61 ± 0,5 (0,4)	0,66 ± 0,5 (0,5)
Valor-p		0,31 ²	0,04²	1,00 ¹
Genótipo TT				
AV* - logMAR	0,56 ± 0,4 (0,4)	0,51 ± 0,4 (0,4)	0,49 ± 0,5 (0,3)	0,49 ± 0,4 (0,3)
Valor-p		0,12 ¹	0,14 ¹	0,24 ¹

AV: acuidade visual; logMAR: logaritmo do mínimo ângulo de resolução.

*: média ± desvio-padrão (mediana).

1: teste *t* pareado.

2: teste de *Wilcoxon*.

TABELA 14. Comparação da melhora média da acuidade visual entre os genótipos do gene *LOC387715* com 1, 3 e 6 meses após o início do tratamento.

	1 mês	3 meses	6 meses
Genótipo GG			
Melhora da AV* - logMAR	0,06 ± 0,20 (0)	0,09 ± 0,20 (0,1)	0,05 ± 0,24 (0)
Genótipo GT			
Melhora da AV* - logMAR	0,01 ± 0,3 (0)	0,05 ± 0,36 (0,1)	0,00 ± 0,38 (0,1)
Genótipo TT			
Melhora da AV* - logMAR	0,06 ± 0,16 (0)	0,07 ± 0,21 (0)	0,07 ± 0,27 (0,1)
Valor-p	0,97 ¹	0,39 ¹	0,88 ¹

AV: acuidade visual; logMAR: logaritmo do mínimo ângulo de resolução.

*: média ± desvio-padrão (mediana).

1: teste de *Kruskal-Wallis*.

Quando foi comparada a melhora da AV ≥ três linhas entre portadores dos diferentes genótipos, não foi observada diferença estatisticamente significativa em nenhuma das visitas realizadas (tabela 15).

TABELA 15. Comparação da melhora da acuidade visual ≥ 3 linhas, de acordo com os genótipos do gene *LOC387715*, entre o período pré-tratamento e 1, 3 e 6 meses após.

	1 mês			3 meses			6 meses		
	Genótipos			Genótipos			Genótipos		
	GG	GT	TT	GG	GT	TT	GG	GT	TT
Melhora ≥ 3 linhas									
Sim	4 11,8%	9 21,9%	3 15,8%	6 17,1%	11 26,8%	3 15,8%	7 20,0%	9 21,9%	4 21,0%
Não	31 88,2%	32 78,1%	16 84,2%	29 82,9%	30 73,2%	16 84,2%	28 80,0%	32 78,1%	15 79,0%
Valor-p		0,49 ¹			0,57 ¹			1,00 ¹	

1: Teste exato de Fisher.

Com relação à EMC, a tabela 16 mostra que houve melhora significativa, em relação ao pré-tratamento, para os três genótipos em todas as avaliações realizadas. Não houve diferença estatisticamente significativa quando a melhora média da EMC foi comparada entre os diferentes genótipos do gene *LOC387715* (tabela 17).

TABELA 16. Comparação da espessura macular central média, de acordo com os genótipos do gene *LOC387715*, entre o período pré-tratamento e 1, 3 e 6 meses após.

	Pré-tratamento	1 mês	3 meses	6 meses
Genótipo GG				
EMC* - μm	350,2 \pm 95,3 (338)	294,3 \pm 81,6 (300)	274,2 \pm 77,5 (258)	273,2 \pm 72,9 (268)
Valor-p		<0,001 ¹	<0,001 ²	<0,001 ¹
Genótipo GT				
EMC* - μm	326,2 \pm 87,5 (306)	310,0 \pm 99,9 (284)	294,9 \pm 86,4 (273)	292,3 \pm 83,1 (278)
Valor-p		0,006 ²	0,001 ²	0,003 ²
Genótipo TT				
EMC* - μm	341,6 \pm 105,4 (305)	306,9 \pm 109,0 (284)	296,2 \pm 84,83 (306)	283,8 \pm 82,9 (275)
Valor-p		0,003 ²	0,012 ¹	0,005 ¹

EMC: espessura macular central.

*: média \pm desvio-padrão (mediana).

1: teste *t* pareado.

2: teste de Wilcoxon.

TABELA 17. Comparação da melhora média da espessura macular central entre os genótipos do gene *LOC387715* com 1, 3 e 6 meses após o início do tratamento.

	1 mês	3 meses	6 meses
Genótipo GG			
Melhora da EMC* - μm	56,0 \pm 76,3 (27)	76,0 \pm 80,5 (51)	77,0 \pm 105,1 (50)
Genótipo GT			
Melhora da EMC* - μm	16,1 \pm 71,5 (11)	31,2 \pm 66,4 (19)	33,9 \pm 77,6 (27)
Genótipo TT			
Melhora da EMC* - μm	34,7 \pm 38,7 (34)	38,9 \pm 77,6 (19)	57,8 \pm 78,2 (58)
Valor-p	0,06 ¹	0,06 ¹	0,19 ¹

EMC: espessura macular central.

*: média \pm desvio-padrão (mediana).

1: teste de *Kruskal-Wallis*.

Para pacientes portadores do genótipo *TT*, foi necessário um número médio de injeções intravítreas entre o terceiro e o sexto mês de tratamento de $1,3 \pm 0,8$ (mediana: 1,0), enquanto que para pacientes heterozigotos e homozigotos para o alelo ancestral, a média foi de $1,0 \pm 0,8$ (mediana: 1,0) e $0,8 \pm 0,7$ (mediana: 1,0), respectivamente ($p = 0,06$; teste de *Kruskal-Wallis*).

5.3 Polimorfismo *C674T (rs1413711)* do gene *VEGF*

Dos 95 pacientes, 34 (35,8%) eram portadores do genótipo *CC*, 44 (46,3%) eram heterozigotos (*CT*) e 17 (17,9%) eram homozigotos para o alelo de risco (*TT*). Todas as características pré-tratamento, agrupadas de acordo com os genótipos do gene *VEGF*, estão mostradas na tabela 18. A AV média e a EMC média pré-tratamento não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os diferentes genótipos. Da mesma forma, não houve diferença estatística com relação à idade, sexo e tipo de tratamento realizado.

TABELA 18. Características pré-tratamento agrupadas de acordo com os genótipos do gene *VEGF*.

	Genótipos			Valor-p
	CC	CT	TT	
Idade*	73,7 ± 8,8 (78,0)	75,0 ± 9,0 (76,5)	75,9 ± 9,2 (77,0)	0,76 ³
Masculino/Feminino	16/18	19/25	8/9	0,83 ²
Bevacizumabe/Ranibizumabe	26/8	21/23	11/6	0,10 ²
AV* - logMAR	0,77 ± 0,4 (0,9)	0,68 ± 0,4 (0,6)	0,60 ± 0,4 (0,5)	0,38 ³
EMC* - μm	342,8 ± 81,9 (332,0)	322,0 ± 89,3 (304,5)	356,7 ± 103,4 (343,0)	0,29 ³

AV: acuidade visual; EMC: espessura macular central; logMAR: logaritmo do mínimo ângulo de resolução.

*: média ± desvio-padrão (mediana).

1: F(ANOVA).

2: Teste Qui-Quadrado de *Pearson*.

3: *Kruskal-Wallis*.

A AV média melhorou de forma estatisticamente significativa para os pacientes portadores do genótipo *TT* quando a medida obtida com um e três meses foi comparada com aquela tomada antes do início do tratamento. Para os portadores deste genótipo, houve melhora da AV média aos seis meses, porém sem significância estatística. Para os portadores dos genótipos *CC* e *CT*, não houve diferença significativa nas avaliações realizadas com um, três e seis meses (tabela 19). Quando a melhora média da AV foi comparada entre os diferentes genótipos do gene *VEGF*, observou-se que pacientes portadores do genótipo *TT* tiveram melhora mais acentuada que os portadores dos genótipos *CC* e *CT*. Diferença estatisticamente significativa, no entanto, só foi observada com um e três meses após o início do tratamento (tabela 20).

TABELA 19. Comparação da acuidade visual média, de acordo com os genótipos do gene *VEGF*, entre o período pré-tratamento e 1, 3 e 6 meses após.

	Pré-tratamento	1 mês	3 meses	6 meses
Genótipo CC				
AV* logMAR	0,60 ± 0,4 (0,5)	0,63 ± 0,5 (0,5)	0,60 ± 0,5 (0,5)	0,62 ± 0,5 (0,5)
Valor-p		0,69 ²	0,64 ²	0,95 ²
Genótipo CT				
AV* - logMAR	0,68 ± 0,4 (0,6)	0,63 ± 0,4 (0,5)	0,62 ± 0,5 (0,5)	0,64 ± 0,5 (0,5)
Valor-p		0,06 ²	0,16 ¹	0,42 ¹
Genótipo TT				
AV* logMAR	0,77 ± 0,4 (0,9)	0,60 ± 0,4 (0,5)	0,53 ± 0,4 (0,5)	0,64 ± 0,4 (0,6)
Valor-p		0,003¹	0,002¹	0,08 ¹

AV: acuidade visual; logMAR: logaritmo do mínimo ângulo de resolução.

*: média ± desvio-padrão (mediana).

1: teste *t* pareado.

2: teste de *Wilcoxon*.

TABELA 20. Comparação da melhora média da acuidade visual entre os genótipos do gene *VEGF* com 1, 3 e 6 meses após o início do tratamento.

	1 mês	3 meses	6 meses
Genótipo CC			
Melhora da AV* - logMAR	-0,04 ± 0,25 (0)	0,00 ± 0,27 (0,0)	-0,03 ± 0,29 (0,1)
Genótipo CT			
Melhora da AV* - logMAR	0,04 ± 0,24 (0)	0,05 ± 0,27 (0,1)	0,04 ± 0,32 (0,1)
Genótipo TT			
Melhora da AV* - logMAR	0,18 ± 0,21 (0,1)	0,24 ± 0,27 (0,1)	0,14 ± 0,31 (0,1)
Valor-p	0,02¹	0,03¹	0,35 ¹

AV: acuidade visual; logMAR: logaritmo do mínimo ângulo de resolução.

*: média ± desvio-padrão (mediana).

1: *Kruskal-Wallis*.

Quando foi comparada a melhora da AV \geq três linhas entre os diferentes genótipos do gene *VEGF*, verificou-se que esta foi maior para os pacientes portadores do genótipo *TT*, quando avaliados um mês após o tratamento (tabela 21). Nas visitas realizadas com três e seis meses, os homozigotos para o alelo *T* também tiveram forte tendência a apresentar um resultado superior aos portadores dos demais genótipos, porém o resultado não foi estatisticamente significativo ($p = 0,058$ e $p = 0,054$, respectivamente).

TABELA 21. Comparação da melhora da acuidade visual ≥ 3 linhas, de acordo com os genótipos do gene *VEGF*, entre o período pré-tratamento e 1, 3 e 6 meses após.

	1 mês			3 meses			6 meses		
	Genótipos			Genótipos			Genótipos		
	CC	CT	TT	CC	CT	TT	CC	CT	TT
Melhora ≥ 3 linhas									
Sim	1 2,9%	9 20,4%	6 35,3%	4 11,7%	9 20,4%	7 41,8%	3 8,8%	11 25,0%	6 35,3%
Não	33 97,1%	35 79,6%	11 64,7%	30 88,3%	35 79,6%	10 58,2%	31 91,2%	33 75,0%	11 64,7%
Valor-p		0,005 ¹			0,058 ¹			0,054 ¹	

1: Teste exato de Fisher.

Com relação à EMC média, a tabela 22 mostra que houve melhora significativa para os três genótipos em todas as avaliações realizadas, quando os dados foram comparados com aqueles obtidos antes do tratamento. Não houve diferença estatisticamente significativa quando a melhora média da EMC foi comparada entre os diferentes genótipos do gene *VEGF* (tabela 23). Analisando-se a melhora média da EMC, observa-se uma maior redução da EMC em portadores do genótipo *TT* com um e três meses. Esta diferença, no entanto, não foi estatisticamente significativa.

TABELA 22. Comparação da espessura macular central média, de acordo com os genótipos do gene *VEGF*, entre o período pré-tratamento e 1, 3 e 6 meses após.

	Pré-tratamento	1 mês	3 meses	6 meses
Genótipo CC				
EMC* - μm	356,7 \pm 103,4 (343)	318,5 \pm 106,2 (296)	306,7 \pm 104,6 (278)	292,8 \pm 100,6 (270)
Valor-p		<0,001 ²	<0,001 ²	0,001 ²
Genótipo CT				
EMC* - μm	322,0 \pm 89,3 (305)	292,7 \pm 95,1 (275)	286,1 \pm 79,0 (276)	288,8 \pm 81,5 (275)
Valor-p		<0,001 ²	0,001 ²	0,008 ²
Genótipo TT				
EMC* - μm	342,8 \pm 81,9 (332)	302,1 \pm 66,6 (315)	276,1 \pm 69,0 (269)	281,3 \pm 66,1 (280)
Valor-p		0,001 ¹	<0,001 ¹	0,001 ¹

EMC: espessura macular central.

*: média \pm desvio-padrão (mediana).

1: teste *t* pareado.

2: teste de Wilcoxon.

TABELA 23. Comparação da melhora média da espessura macular central entre os genótipos do *VEFG* com 1, 3 e 6 meses após o início do tratamento.

	1 mês	3 meses	6 meses
Genótipo CC			
Melhora da EMC* - μm	38,2 \pm 69,7 (14,5)	50,0 \pm 75,4 (24)	63,9 \pm 102,1 (36,5)
Genótipo CT			
Melhora da EMC* - μm	29,3 \pm 76,5 (29,5)	35,8 \pm 76,6 (30,5)	33,1 \pm 85,4 (23)
Genótipo TT			
Melhora da EMC* - μm	40,7 \pm 52,8 (23)	66,8 \pm 60,3 (56)	61,5 \pm 59,7 (57)
Valor-p	0,87 ¹	0,21 ¹	0,27 ¹

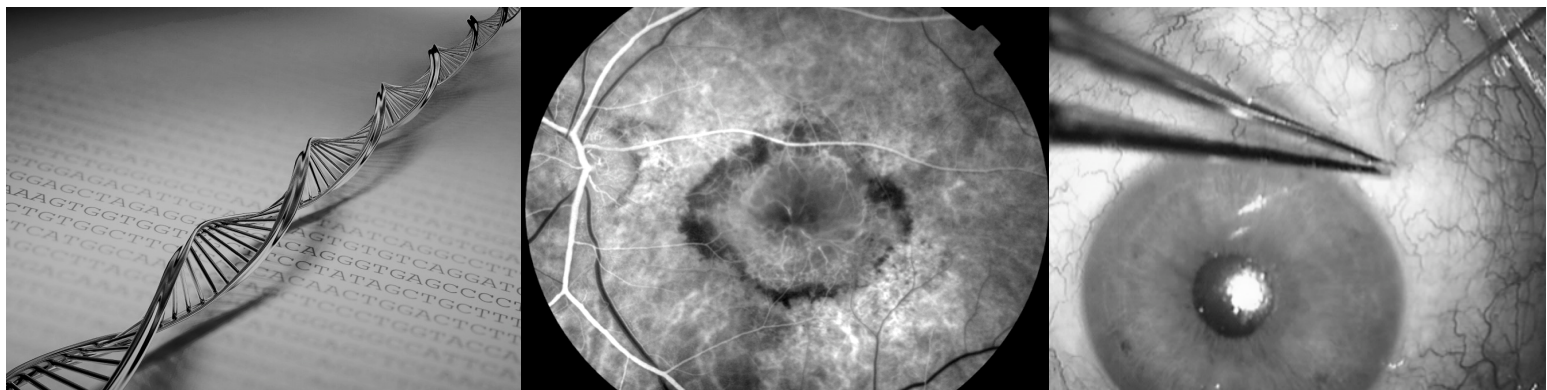
EMC: espessura macular central.

*: média \pm desvio-padrão (mediana).

1: *Kruskal-Wallis*.

Para pacientes portadores do genótipo *CC*, foi necessário um número médio de injeções intravítreas entre o terceiro e o sexto mês de $1,4 \pm 0,7$ (mediana: 1,0), enquanto que para pacientes heterozigotos e homozigotos para o alelo de risco, a média foi de $1,1 \pm 0,8$ (mediana: 1,0) e $0,9 \pm 0,8$ (mediana:1,0), respectivamente ($p = 0,26$; teste de *Kruskal-Wallis*).

6 DISCUSSÃO



Dos 585 olhos portadores de DMRI, 151 (25,8%) apresentaram a forma inicial, 370 (63,2%) a forma exsudativa/cicatricial e 64 (11,0%) atrofia geográfica. É importante ressaltar que os pacientes avaliados neste estudo foram examinados no Instituto da Visão, clínica privada de referência no tratamento da DMRI. É provável, no entanto, que portadores de DMRI não exsudativa, por necessitarem apenas do tratamento preventivo com vitaminas e antioxidantes, sejam encaminhados com menor frequência a esta instituição. Desta forma, os dados de prevalência encontrados não refletem a distribuição usualmente encontrada na população.

Os pacientes portadores de vasculopatia polipoidal da coróide foram excluídos deste estudo, uma vez que esta entidade clínica apresenta peculiaridades que a distinguem das formas típicas de DMRI exsudativa, entre as quais se destaca uma resposta terapêutica aos antiangiogênicos menos satisfatória (LAI *et al.*, 2008; MITAMURA *et al.*, 2010). Por esta razão, muitos dos pacientes portadores de vasculopatia polipoidal da coróide foram tratados com PDT isoladamente ou de forma associada a antiangiogênico, corticosteróide ou laser fototérmico.

Os pacientes com DMRI exsudativa foram submetidos a um protocolo que incluiu a aplicação de três injeções intravítreas consecutivas de agentes antiangiogênicos, com intervalo mensal entre elas. Após este período inicial, os pacientes foram retratados de acordo com a necessidade. Um importante trabalho (PrONTO), conduzido com o objetivo de permitir a aplicação de um menor número de injeções intravítreas ao longo de um ano, serviu de base para a definição deste protocolo (FUNG *et al.*, 2007). Os resultados finais desse estudo foram semelhantes aos obtidos pelos estudos multicêntricos ANCHOR e MARINA, que preconizavam uso mensal do antiangiogênico por 12 meses (FUNG *et al.*, 2007; BROWN *et al.*, 2006; ROSENFELD *et al.*, 2006). Assim, o protocolo utilizado no estudo PrONTO tornou-se uma das referências para o tratamento da DMRI exsudativa.

O VEGF é considerado um importante estímulo angiogênico para a neovascularização na DMRI (ROSENFELD *et al.*, 2005, OZKIRIS *et al.*, 2010). Agentes anti-VEGF são capazes de inibir a angiogênese e reduzir a permeabilidade vascular, permitindo um tratamento eficaz para a forma exsudativa da doença (NEHEMY *et al.*, 2006). O bevacizumabe é um anticorpo monoclonal humanizado de

cadeia completa que se liga a todas as isoformas do VEGF, inibindo sua atividade. Já o ranibizumabe, é um fragmento do anticorpo (desenvolvido a partir da fragmentação do bevacizumabe), que também se liga a todas as isoformas do VEGF e que foi desenvolvido por se acreditar que uma molécula menor pudesse ter uma melhor penetração retiniana, com conseqüente melhor resultado terapêutico (ROSENFELD *et al.*, 2006; NEHEMY *et al.*, 2006). No entanto, um recente estudo multicêntrico envolvendo 1208 pacientes demonstrou que os antiangiogênicos bevacizumabe e ranibizumabe, quando aplicados em intervalos semelhantes, apresentaram efeitos equivalentes na AV medida um ano após o início do tratamento (THE CATT RESEARCH GROUP, 2011). No presente estudo, os resultados obtidos para o grupo de pacientes tratado com bevacizumabe foram muito semelhantes aos daqueles tratados com ranibizumabe, quando a melhora da AV e da EMC tomada com um, três e seis meses foi comparada com os dados obtidos antes do início do tratamento. Além disso, não houve diferença na melhora média da AV obtida em cada uma das visitas, entre os dois grupos.

A maioria dos pacientes incluídos neste trabalho era do sexo feminino (58,1%), o que está de acordo com a literatura, que mostra uma prevalência de DMRI um pouco maior em mulheres (KLEIN *et al.*, 2011). As mulheres também apresentaram uma idade média mais avançada que os homens, embora sem significância estatística. Para o conjunto desses pacientes, houve melhora estatisticamente significativa da AV média nas visitas realizadas com um, três e seis meses. Com relação à EMC, a melhora também foi estatisticamente significativa em todas as visitas. Estes resultados são similares aos observados pelos estudos multicêntricos PrONTO e CATT (FUNG *et al.*, 2007; THE CATT RESEARCH GROUP, 2011).

6.1 Polimorfismo Y402H (rs1061170) do gene CFH

Analisando-se a tabela 6, observa-se que não houve diferença significativa no que se refere à idade, sexo e tipo de droga intravítrea usada. Também não houve associação dos genótipos do gene *VEGF* com a AV e com a EMC média pré-tratamento, mostrando tratar-se de uma amostra bem balanceada.

Os dados da literatura, com relação à influência do polimorfismo *Y402H* (*rs1061170*) do gene *CFH* no tratamento da DMRI exsudativa, são controversos. Para uma melhor comparação, os estudos já publicados são apresentados, de maneira resumida, na tabela 24. É importante ressaltar que o esquema de tratamento empregado foi diferente na maior parte dos trabalhos, o que impede uma comparação mais precisa. A resposta após PDT já foi avaliada por quatro estudos, sendo que em dois deles, nenhuma associação foi encontrada (SEITSONEN *et al.*, 2007; FENG *et al.*, 2009). Pior resposta relacionada ao genótipo CC foi demonstrada em um estudo e, em outro, o genótipo *TT* esteve associado a um desfecho menos favorável (GOVERDHAN *et al.*, 2008; BRANTLEY *et al.*, 2009). A avaliação dos resultados após terapia antiangiogênica foi feita por outros cinco trabalhos. Em três destes estudos, foi encontrada associação do genótipo CC com uma pior resposta ao tratamento (BRANTLEY *et al.*, 2007; KLOECKENER-GRUISSEM *et al.*, 2011; NISCHLER *et al.*, 2011). Um estudo mostrou que pacientes homocigotos para o alelo de risco necessitaram mais injeções intravítreas ao longo de um período de nove meses, embora não tenha demonstrado diferença estatisticamente significativa com relação à melhora da AV entre os diferentes genótipos do *CFH* (LEE *et al.*, 2009). Já IMAI *et al.* (2010) demonstraram associação do genótipo *TC* com pior resposta ao tratamento. Esse estudo, no entanto, apresenta limitações significativas, tais como a utilização de apenas uma única injeção e ausência de pacientes homocigotos para o alelo de risco na amostra estudada.

TABELA 24. Resumo dos estudos referentes à resposta terapêutica da DMRI exsudativa de acordo com o polimorfismo *Y402H* (*rs1061170*) do gene *CFH*

Estudo	Tratamento	Associação com a resposta terapêutica	Observação
SEITSONEN <i>et al.</i> (2007)	PDT	Sem associação	
FENG <i>et al.</i> (2009)	PDT	Sem associação	
GOVERDHAN <i>et al.</i> (2008)	PDT	Genótipo CC: pior resposta	
BRANTLEY <i>et al.</i> (2009)	PDT	Genótipo <i>TT</i> : pior resposta	
BRANTLEY <i>et al.</i> (2007)	Bevacizumabe	Genótipo CC: pior resposta	
LEE <i>et al.</i> (2009)	Ranibizumabe	Sem associação	Genótipo CC: necessidade de um maior número de injeções
IMAI <i>et al.</i> (2010)	Bevacizumabe	Genótipo <i>TC</i> : pior resposta	Ausência de CC na amostra
KLOECKENER-GRUISSEM <i>et al.</i> (2011)	Ranibizumabe	Genótipo CC: pior resposta	
NISCHLER <i>et al.</i> (2011)	Bevacizumabe	Genótipo CC: pior resposta	

No presente estudo, houve melhora da AV, para cada um dos genótipos do gene *CFH*, com um, três e seis meses (tabela 7). Embora esta resposta tenha sido estatisticamente significativa para os genótipos *TT* e *TC* com três meses, a comparação da melhora média da AV entre os genótipos não se mostrou estatisticamente significativa (tabela 8). Ao se considerar uma melhora da AV \geq três linhas, também não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os genótipos *TT*, *TC* e *CC* (tabela 9). Com relação à EMC, todos os pacientes melhoraram de forma estatisticamente significativa em todas as visitas (tabela 10). Além disso, não houve diferença na melhora média da EMC observada entre os diferentes genótipos (tabela 11). Pacientes portadores do genótipo *CC* receberam um número médio de injeções intravítreas, entre o terceiro e o sexto mês após o início do tratamento, maior que os demais. No entanto, a diferença não foi estatisticamente significativa. Com base nestes dados, pode-se concluir que, no presente estudo, o polimorfismo estudado do gene *CFH* não interferiu na resposta terapêutica aos antiangiogênicos bevacizumabe e ranibizumabe. Estes resultados estão de acordo com os achados de LEE *et al.* (2009) e não corroboram os achados de outros autores (BRANTLEY *et al.*, 2007; IMAI *et al.*, 2010; KLOECKENER-GRUISSEM *et al.*, 2011; NISCHLER *et al.*, 2011). É possível que estas diferenças se devam às características e/ou ao tamanho das amostras estudadas.

6.2 Polimorfismo A69S (*rs10490924*) do gene *LOC387715*

Analisando-se a tabela 12, observa-se que houve uma maior frequência de mulheres entre os pacientes portadores dos genótipos *GT* e *TT*. Esta diferença parece ser devida ao acaso, já que não se encontra na literatura qualquer evidência que possa justificá-la. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os genótipos do gene *LOC387715* e a AV e a EMC média pré-tratamento. Também não foi encontrada diferença significativa em relação à idade e ao tipo de droga intravítrea usada.

Poucos trabalhos publicados avaliaram a possível influência do polimorfismo A69S (*rs10490924*) do gene *LOC387715* na resposta terapêutica da DMRI exsudativa. A tabela 24 resume os principais resultados destes artigos. CHOWERS *et al.* (2008) concluíram que não havia diferença estatisticamente significativa entre

os genótipos do gene *LOC387715* e a resposta terapêutica à PDT. BRANTLEY *et al.* (2009) também não encontram associação entre os três genótipos e a resposta a este tratamento. Já SAKURADA *et al.* (2010) mostraram que homocigotos para o alelo *T* apresentavam pior resposta a este tratamento em casos de vasculopatia polipoidal da coróide. A resposta aos antiangiogênicos foi avaliada por apenas um estudo. BRANTLEY *et al.* (2007) não encontraram associação estatisticamente significativa entre os genótipos do gene *LOC387715* e a resposta terapêutica ao bevacizumabe. Nesse estudo, uma injeção intravítrea foi inicialmente realizada e o retratamento foi feito a cada seis semanas, até que não houvesse mais sinais de atividade da MNSR.

TABELA 25. Resumo dos estudos referentes à resposta terapêutica da DMRI exsudativa de acordo com o polimorfismo *A69S* (*rs10490924*) do gene *LOC387715*

Estudo	Tratamento	Associação com a resposta terapêutica	Observação
CHOWERS <i>et al.</i> (2008)	PDT	Sem associação	
BRANTLEY <i>et al.</i> (2009)	PDT	Sem associação	
SAKURADA <i>et al.</i> (2010)	PDT	Genótipo <i>TT</i> : pior resposta	Casos de vasculopatia polipoidal da coróide
BRANTLEY <i>et al.</i> (2007)	Bevacizumabe	Sem associação	

No presente estudo, houve melhora da AV, para cada um dos genótipos do gene *LOC387715*, em todas as avaliações realizadas (tabela 13). Embora esta resposta tenha sido estatisticamente significativa para os genótipos *GG* e *GT* aos três meses, a comparação da melhora média da AV entre estes os diferentes genótipos não se mostrou estatisticamente significativa (tabela 14). Ao se considerar uma melhora da AV \geq três linhas, também não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os genótipos do gene *LOC387715* (tabela 15). Com relação à EMC, todos os pacientes melhoraram de forma estatisticamente significativa em todas as visitas (tabela 16). Além disso, não houve diferença na melhora média da EMC observada entre os genótipos (tabela 17). Pacientes portadores do genótipo *TT* receberam um número médio de injeções intravítreas, entre o terceiro e o sexto mês após o início do tratamento, maior que os demais. No entanto, a diferença não foi estatisticamente significativa. Com base nestes dados, pode se concluir que, no presente estudo, o polimorfismo estudado do gene *LOC387715* não teve efeito na resposta terapêutica aos antiangiogênicos

bevacizumabe e ranibizumabe. Estes resultados estão de acordo com os achados registrados por BRANTLEY *et al.* (2007).

6.3 Polimorfismo C674T (rs1413711) do gene VEGF

Analisando-se a tabela 18, observa-se que não houve diferença estatisticamente significativa no que se refere à idade, sexo e tipo de droga intravítrea usada. Também não houve associação dos genótipos do gene *CFH* com a AV e com a EMC média pré-tratamento, mostrando tratar-se de uma amostra bem balanceada.

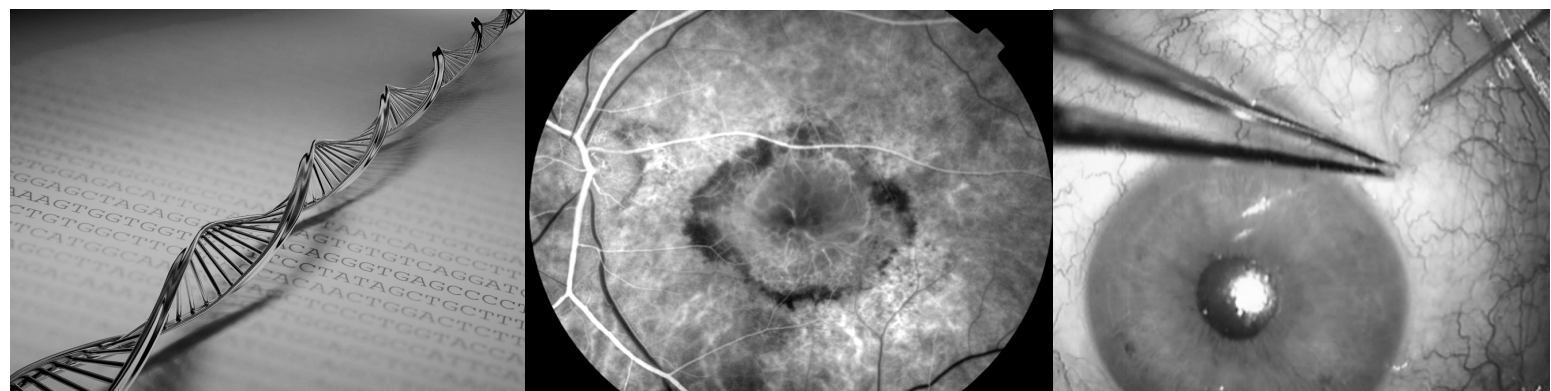
A eventual relação entre o polimorfismo C674T (rs1413711) do gene *VEGF* e a resposta terapêutica da DMRI exsudativa aos antiangiogênicos foi avaliada apenas pelo estudo conduzido por KLOECKENER-GRUISSEM *et al.* (2011). Neste estudo, uma injeção intravítrea de bevacizumabe foi inicialmente realizada e tratamento subsequente foi empregado apenas se os sinais de atividade da lesão estivessem presentes. Os autores não encontraram associação estatisticamente significativa entre o polimorfismo estudado e a resposta aos antiangiogênicos.

Em um estudo recente, NAKATA *et al.* (2011) avaliaram a influência de outros polimorfismos do gene *VEGF* no tratamento com antiangiogênicos. Foi observado que, para o polimorfismo rs699946, portadores do alelo de risco em homozigose apresentaram uma melhor resposta terapêutica. Estes autores sugerem que o polimorfismo do gene *VEGF* pode afetar a quantidade da proteína VEGF produzida e, desta forma, alterar o prognóstico visual. De fato, polimorfismos do gene *VEGF* foram previamente associados a níveis aumentados desta proteína, tanto no sangue (RENNER *et al.*, 2000; PETROVIC *et al.*, 2008) quanto no vítreo (PETROVIC *et al.*, 2008). Assim, seria de se esperar que polimorfismos deste gene pudessem influenciar a resposta terapêutica da DMRI exsudativa.

O presente estudo mostrou que pacientes portadores do genótipo *TT* apresentaram melhora estatisticamente significativa da AV após a primeira e a terceira injeção intravítrea. Embora tenha ocorrido também uma melhora expressiva da AV com seis meses, esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p =$

0,08). A tabela 19 mostra que os pacientes homozigotos para o alelo ancestral e os heterozigotos não apresentaram melhora estatisticamente significativa da AV em nenhuma das visitas realizadas. Ao se comparar a melhora média da AV entre os genótipos do gene *VEGF*, confirma-se que portadores do genótipo *TT* apresentaram uma melhor resposta funcional com um e três meses quando comparados com os demais genótipos ($p = 0,02$ e $p = 0,03$, respectivamente) (tabela 20). Embora este grupo de pacientes tenha sido o que apresentou melhora mais acentuada da AV também com seis meses, a diferença, nesta visita, não foi estatisticamente significativa. Além disso, um maior número de pacientes portadores do genótipo *TT* apresentou melhora \geq três linhas, quando estes foram comparados com os demais (tabela 21). Esta diferença foi estatisticamente significativa com um mês após o início do tratamento. Houve, também, forte tendência de que esta melhora fosse estatisticamente significativa com três e seis meses ($p = 0,058$ e $p = 0,054$, respectivamente). Com relação à EMC média, todos os pacientes avaliados para este gene apresentaram melhora em todas as avaliações realizadas (tabela 22). Não houve diferença entre os genótipos quando a melhora média da EMC foi avaliada (tabela 23). Também não houve associação estatisticamente significativa entre o número de injeções intravítreas necessárias entre o terceiro e o sexto mês após o início do tratamento com os genótipos do gene *VEGF*, embora pacientes homozigotos para o alelo *C* tenham recebido um número médio maior de injeções. Estes achados sugerem, assim, que portadores do alelo de risco em homozigose apresentam uma melhor resposta terapêutica aos antiangiogênicos. Portanto, o presente estudo oferece uma base racional para que a influência deste polimorfismo genético seja avaliada por um estudo prospectivo, com um maior número de pacientes e com um tempo de seguimento mais prolongado.

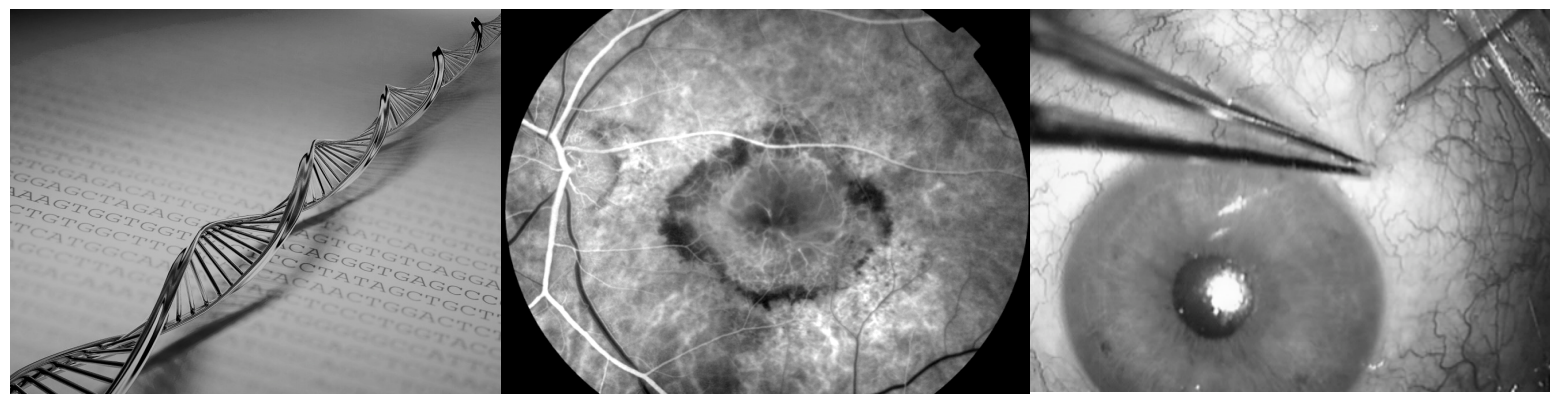
7 CONCLUSÃO



O presente trabalho permite concluir que, na amostra estudada:

- 1) Não houve associação entre o polimorfismo *Y402H* (*rs1061170*) do gene *CFH* e a resposta terapêutica da DMRI exsudativa aos antiangiogênicos bevacizumabe e ranibizumabe.
- 2) Não houve associação entre o polimorfismo *A69S* (*rs10490924*) do gene *LOC387715* e a resposta terapêutica da DMRI exsudativa aos antiangiogênicos bevacizumabe e ranibizumabe.
- 3) Houve associação entre o polimorfismo *C674T* (*rs1413711*) do gene *VEGF* e a resposta terapêutica da DMRI exsudativa aos antiangiogênicos bevacizumabe e ranibizumabe. Portadores do genótipo *TT* apresentam melhor resposta a este tratamento.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



ADAMIS, A.P.; SHIMA, D.T. The role of vascular endothelial growth factor in ocular health and disease. **Retina**, Philadelphia, v.25, n.2 ,p.111-8, Feb-Mar, 2005.

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. **Archives of Ophthalmology**, Chicago, v.119, n.10, p.1417-36, Oct. 2001.

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: AREDS report n^o. 3. **Ophthalmology**, Philadelphia, v.107, n. 12, p. 2224-32, Dec. 2000.

ALMEIDA, L.N. et al. Homozygosity for the +674C>T polymorphism on VEGF gene is associated with age-related macular degeneration in a Brazilian cohort. **Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, Berlin, 2011. In press.

BOEKHOORN, S.S. et al. Polymorphisms in the vascular endothelial growth factor gene and risk of age-related macular degeneration: the Rotterdam Study. **Ophthalmology**, Philadelphia, v.115, n.11, p.1899-903, Nov. 2008.

BOON, C.J. et al. Basal laminar drusen caused by compound heterozygous variants in the CFH gene. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v.82, n.2, p.516-23, Feb. 2008.

BRANTLEY, M.A. JR et al. Association of complement factor H and LOC387715 genotypes with response of exudative age-related macular degeneration to intravitreal bevacizumab. **Ophthalmology**, Philadelphia, v.114, n.12, p. 2168-73, Dec. 2007.

BRANTLEY, M.A. JR et al. Association of complement factor H and LOC387715 genotypes with response of exudative age-related macular degeneration to photodynamic therapy. **Eye**, London, v.23, n.3, p.626-31, Mar. 2009.

BROWN D.M., et al. Ranibizumab versus verteporfin for neovascular age-related macular degeneration, **The New England Journal of Medicine**, Boston, v.355, n.14, p.1432-1444, Oct. 2006.

CHOWERS, I. et al. Sequence variants in HTRA1 and LOC387715/ARMS2 and phenotype and response to photodynamic therapy in neovascular age-related macular degeneration in populations from Israel. **Molecular vision**, Atlanta, v.14, p.2263-71, Dec. 2008.

CHURCHIL, A.J. et al. VEGF polymorphisms are associated with neovascular age-related macular degeneration. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v.15, n.19, p.2955-61, Oct. 2006.

CLEMONS, T.E. et al. Risk factors for the incidence of Advanced Age-Related Macular Degeneration in the Age-related Eye Disease Study Group (AREDS). AREDS report n° 19. **Ophthalmology**, Philadelphia, v.112, n.4, p.533-9, Apr. 2005.

DONOSO, L.A. et al. The role of inflammation in the pathogenesis of age-related macular degeneration. **Survey of Ophthalmology**, Boston, v.51, n.2, p.137-52, Mar-Apr. 2006.

EDWARDS, A.O. et al. Complement factor H polymorphisms and age-related macular degeneration. **Science**, Washington, v.309, n.5720, p.421-4, Apr. 2005.

EYETECH STUDY GROUP. Anti-vascular endothelial growth factor therapy for subfoveal choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration: phase II study results. **Ophthalmology**, Philadelphia, v.110, n.5, p.979-86, May 2003.

FENG, X. et al. Complement factor H Y402H and C-reactive protein polymorphism and photodynamic therapy response in age-related macular degeneration. **Ophthalmology**, Philadelphia, v.116, n.10, p.1908-12, Oct. 2009.

FRISTICHE, L.G. et al. Age-related macular degeneration is associated with an unstable ARMS2 (LOC387715) mRNA. **Nature genetics**, New York, v.40, n.7, p.892-6, Jul. 2008.

FUNG, A.E. et al. An optical tomography-guided, variable dosing regimen with intravitreal ranibizumab (Lucentis) for neovascular age-related macular degeneration. **American Journal of Ophthalmology**, New York, v.143, n.4, p. 566-83, Apr. 2007.

GOLD, B. et al. Variation in factor B (BF) and complement component 2 (C2) genes is associated with age-related macular degeneration. **Nature Genetics**, New York, v.38, n.4, p.458-62, Apr. 2006.

GOVERDHAN, S.V. et al. An analysis of the CFH Y402H genotype in AMD patients and controls from the UK, and response to PDT treatment. **Eye**, London, v.22, n.6, p.849-54, Jun. 2008.

GRAGOUDAS, E.S. et al. Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. **New England Journal of Medicine**, Boston, v.351, n.27, p. 2805-16, Dec. 2004.

HADDAD, S. et al. The genetics of age-related macular degeneration: A review of progress to date. **Survey of Ophthalmology**, Boston, v.51, n.4, p. 316-63, Jul-Aug-2006.

HAINES, J.L. et al. Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. **Science**, Washington, v.308, n.5720, p.419-21, Apr. 2005.

HOLLADAY, J.T. Proper method for calculating average visual acuity. **Journal of Refractive Surgery**, Thorofare, n.13, v.4, p.388-91, Jul-Aug. 1997.

IMAI, D. et al. CFH, VEGF, and PEDF genotypes and the response to intravitreal injection of bevacizumab for the treatment of age-related macular degeneration. **Journal of Ocular Biology, Diseases and Informatics**. Hershey, v.3, n.2, p.53-9, Jun. 2010.

IMMONEN, I. et al. Vascular endothelial growth factor gene variation and the response to photodynamic therapy in age-related macular degeneration. **Ophthalmology**, Philadelphia, v.117, n.1, p.103-8, Jan. 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Sinopse dos resultados do Censo 2010**. Disponível em: <<http://www.censo2010.ibge.gov.br/sinopse/webservice/.gov.br>>. Acesso em: 02 dez. 2011.

JANIK-PAPIS, K. et al. Association between vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and age-related macular degeneration in a Polish population. **Experimental and Molecular Pathology**, New York, v.87, n.3, p. 234-8, Dec. 2009.

JARRETT, S.G.; LEWIN, A.S.; BOULTON, M.E. The importance of mitochondria in age-related and inherited eye disorders. **Ophthalmic research**, Basel, v.44, n.3, p. 179-90, Sept. 2010.

KANDA, A. et al. A variant of mitochondrial protein LOC387715/ARMS2, not HTRA1, is strongly associated with age-related macular degeneration. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.104, n.41, p.16227-32, Oct. 2007.

KLEIN, M.L. et al. CFH and LOC387715/ARMS2 genotypes and treatment with antioxidants and zinc for age-related macular degeneration. **Ophthalmology**, Philadelphia, v.115, n.6, p.1019-25, Jun.2008.

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

KLEIN, R. et al. The epidemiology of age-related macular degeneration. **American Journal of Ophthalmology**, New York, v.137, n.3, p.486-95, Mar. 2004.

KLOECKENER-GRUISSEM, B. et al. Genetic association with response to intravitreal ranibizumab in patients with neovascular AMD. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, Saint Louis, v.52, n.7, p.4694-702, Jul. 2011.

LAHIRI, D.K; NURNBERGER, J.I. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Research**, London, v.19, n.19, p.5444, Oct. 1991.

LAI, T.Y. et al. Intravitreal bevacizumab (Avastin) with or without photodynamic therapy for the treatment of polypoidal choroidal vasculopathy. **British Journal of Ophthalmology**, London, v.92, n.5, p.661-6, May, 2008.

LEE, A.Y. et al. Pharmacogenetics of complement factor H (Y402H) and treatment of exudative age-related macular degeneration with ranibizumab. **British Journal of Ophthalmology**, London, v.93, n.5, p.610-3, May 2009.

LUX, A. et al. Non-responders to bevacizumab (Avastin) therapy of choroidal neovascular lesions. **British Journal of Ophthalmology**, London, v.91, n.10, p.1318-22, Oct. 2007.

MITAMURA, Y. et al. Comparison of intravitreal bevacizumab to photodynamic therapy for polypoidal choroidal vasculopathy: short-term results. **Indian Journal of Ophthalmology**, Bombay, v.58, n.4, p.291-6, Jul-Aug. 2010.

NAKATA, I. et al. VEGF gene polymorphism and response to intravitreal bevacizumab and triple therapy in age-related macular degeneration. **Japanese Journal of Ophthalmology**, Tokyo, v.55, n.5, p.435-43, Sep. 2011.

NEHEMY, M.B. Degeneração macular relacionada à idade: novas perspectivas. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v.69, n.6, p. 955-8, Nov-Dez. 2006.

NEHEMY, M.B. et al. Association analysis of CFH and LOC387715 gene polymorphisms in a brazilian cohort with age-related macular degeneration. In: **10th Euretina Congress**, 2010, Paris. Programa Científico.

NISCHLER, C. et al. Complement factor H Y402H gene polymorphism and response to intravitreal bevacizumab in exudative age-related macular degeneration. **Acta Ophthalmologica**, Copenhagen, v.89, n.4, p.344-9, Jun. 2010.

NOWAK, J.Z. Age-related macular degeneration (AMD): pathogenesis and therapy. **Pharmacological reports**, Krakow, v.58, n.3, p.353-63, May-Jun. 2006.

OZKIRIS, A. Anti-VEGF agents for age-related macular degeneration. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, New York, v.20, n.1, p.103-18, Jan. 2010.

PETROVIC, M.G. et al. Local and genetic determinants of vascular endothelial growth factor expression in advanced proliferative diabetic retinopathy. **Molecular Vision**, Atlanta, v.30, n.14, p.1382-7, Jun. 2008.

RENNER, W. et al. A common 936 C/T mutation in the gene for vascular endothelial growth factor is associated with vascular endothelial growth factor plasma levels. **Journal of Vascular Research**, Basel, v.37, n.6, p.443-8. Nov-Dec. 2000.

RICHARDSON, A.J. et al. A tag-single nucleotide polymorphisms approach to the vascular endothelial growth factor-A gene in age-related macular degeneration. **Molecular vision**, Atlanta, v.26, n.13, p.2148-52, Nov. 2007.

RIVERA, A. et al. Hypothetical LOC387715 is a second major susceptibility gene for age-related macular degeneration, contributing independently of complement factor H to disease risk, **Human Molecular Genetics**, Oxford, v.14, n.21, p.3227-36, Sep. 2005.

ROSENFELD, P.J. et al. Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v.355, n.14, p.1419-31, Oct. 2006.

SAKURADA, Y. et al. Association of LOC387715 A69S genotype with visual prognosis after photodynamic therapy for polypoidal choroidal vasculopathy. **Retina**, Philadelphia, v.30, n.10, p.1616-21, Nov-Dec. 2010.

SCHAUMBERG, D.A. et al. A prospective study of 2 major age-related macular degeneration susceptibility alleles and interactions with modifiable risk factors. **Archives of Ophthalmology**, Chicago, v.125, n.1, p.55-62, Jan. 2007.

SEDDON, J.M. et al. Association of CFH Y402H and LOC387715 A69S with progression of age-related macular degeneration. **JAMA**, Chicago, v.297, n.16, p.1793-800, Apr. 2007.

SEDDON, J.M.; CHEN, C.A. Epidemiology of age-related macular degeneration. In: Ryan, S.J. (Editor). **Retina**. California: Elsevier, p.1017-25, 2006.

SEDDON, J.M.; REYNOLDS, R.; ROSNER, B. Associations of smoking, body mass index, dietary lutein, and the LIPC gene variant rs10468017 with advanced age-related macular degeneration. **Molecular Vision**, Atlanta, v.16, p.2412-24, Nov. 2010.

SEDDON, J.M.; SHARMA, S.; ADELMAN, R.A. Evaluation of the clinical age-related maculopathy staging system. **Ophthalmology**, Philadelphia, v.113, n.2, p.260-6, Feb. 2006.

SEITSONEN, S.P., et al. The effect of complement factor H Y402H polymorphism on the outcome of photodynamic therapy in age-related macular degeneration. **European Journal of Ophthalmology**, Milan, v.17, n.6, p. 943-9, Nov-Dec. 2007.

SHULER, R.K. JR et al. Neovascular age-related macular degeneration and its association with LOC387715 and complement factor H polymorphism. **Archives of Ophthalmology**, Chicago, v. 125, n.1, p.63-7, Jan. 2007.

SPAIDE, R.F.; SORENSON, J.; MARANAN, L. Photodynamic therapy with verteporfin combined with intravitreal injection of triamcinolone acetonide for choroidal neovascularization. **Ophthalmology**, Philadelphia, v.112, n.2, p.301-4, Feb. 2005.

SPENCER, K.L. et al. Protective effect of complement factor B and complement component 2 variants in age-related macular degeneration. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v.16, n.16, p.1986-92, Aug. 2007.

STERNBERG, P. JR; LEWIS, H. Photodynamic therapy for age-related macular degeneration: a candid appraisal. **American Journal of Ophthalmology**, New York, v.137, n.3, p. 483-5, Mar. 2004.

TAMMELA, T. et al. The biology of vascular endothelial growth factors. **Cardiovascular research**, London, v.65, n. 3, p.550-63, Feb. 2005.

TAP STUDY GROUP. Photodynamic therapy of subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration with verteporfin: one-year results of 2 randomized clinical trials - TAP report: treatment of age-related macular degeneration with photodynamic therapy (TAP) Study Group. **Archives of Ophthalmology**, Chicago, v.117, n.10, p. 1329-45, Oct. 1999.

TEIXEIRA, A.G. et al. Association of complement factor H Y402H polymorphism and age-related macular degeneration in Brazilian patients. **Acta Ophthalmologica**, Copenhagen, v.88, n.5, p.165-9, Aug. 2010.

THE CATT RESEARCH GROUP. Ranibizumab and bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration, **The New England Journal of Medicine**, Boston, v.364, n.20, p.1897-908, May. 2011.

THOMPSON, M.W. **Genética médica**. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 1993.

TSUCHIHASHI, T. et al. Complement factor H and high-temperature requirement A-1 genotypes and treatment response of age-related macular degeneration. **Ophthalmology**, Philadelphia, v.118, n.1, p.93-100, Jan. 2011.

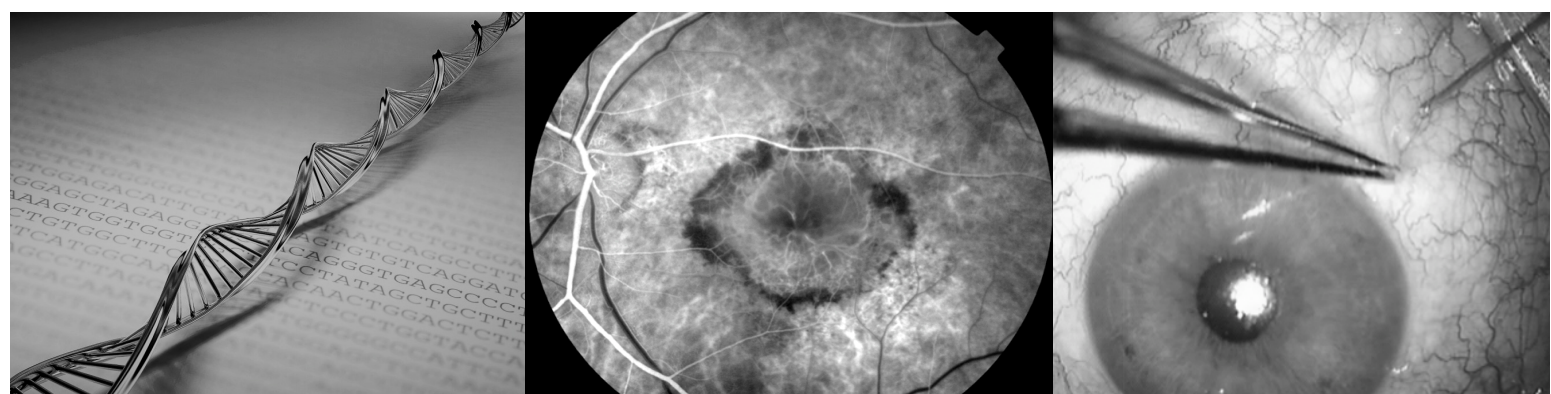
TUO, J. et al. The involvement of sequence variation and expression of CX3CR1 in the pathogenesis of age-related macular degeneration. **The FASEB Journal**, Bethesda, v.18, n.11, p.1297-9, Aug. 2004.

VERTEPORFIN IN PHOTODYNAMIC THERAPY STUDY GROUP. Verteporfin therapy of subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration: two-year results of a randomized clinical trial including lesions with occult with no classic choroidal neovascularization - verteporfin in photodynamic therapy report 2. **American Journal of Ophthalmology**, New York, v.131, n.5, p.541-60, May 2001.

YANG, Z. et al. A variant of the HTRA1 gene increases susceptibility to age-related macular degeneration. **Science**, Washington, v.314, n.5801, p.992-3, Nov. 2006.

YU, Y. et al. Common variants near FRK/COL10A1 and VEGFA are associated with advanced age-related macular degeneration. **Human Molecular Genetics**, Oxford, 2011. In press.

9 ANEXOS



ANEXO A. Classificação da DMRI de acordo com SEDDON *et al.* (2006).

Sistema de estadiamento clínico da maculopatia relacionada à idade	
Grau de Maculopatia	Achados clínicos
1	Ausência de drusas ou < 10 drusas pequenas sem anormalidades pigmentares
2	Aproximadamente ≥ 10 drusas pequenas ou < 15 drusas intermediárias, ou anormalidades pigmentares associadas com MRA <ol style="list-style-type: none">DrusasAlterações do EPR (hiperpigmentação e hipopigmentação)Drusas e alterações do EPR
3	Aproximadamente ≥ 15 drusas intermediárias ou qualquer drusa grande <ol style="list-style-type: none">Sem DEP drusenóideDEP drusenóide
4	Atrofia geográfica com envolvimento do centro da mácula, ou atrofia geográfica não-central com pelo menos $350 \mu\text{m}$ de tamanho
5	MRA exsudativa, incluindo DEP não-drusenóide, descolamento de retina seroso ou hemorrágico, MNSR com hemorragias sub-retinianas ou sub-EPR ou fibrose, ou cicatrizes consistentes com tratamento para DMRI <ol style="list-style-type: none">DEP seroso, sem MNSRMNSR ou cicatriz disciforme

DMRI = degeneração macular relacionada à idade; MRA = maculopatia relacionada à idade; MNSR = membrana neovascular sub-retiniana; EPR = epitélio pigmentado da retina; DEP = descolamento do epitélio pigmentado da retina.

Drusas pequenas: < $63 \mu\text{m}$ de diâmetro e localizadas dentro de 2 diâmetros de disco (DD) do centro da mácula; drusas intermediárias: $\geq 63 \mu\text{m}$, mas < $125 \mu\text{m}$ e localizadas dentro de 2 diâmetros de disco (DD) do centro da mácula; drusas grandes: $\geq 125 \mu\text{m}$ e localizadas dentro de 2 diâmetros de disco (DD) do centro da mácula; DEP drusenóide: drusas moles confluentes com tamanho $\geq 500 \mu\text{m}$.

ANEXO B. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS COM A DEGENERAÇÃO MACULAR RELACIONADA À IDADE (DMRI)

Introdução: Você está sendo convidado para participar do projeto de pesquisa citado acima. Antes de tomar qualquer decisão, é importante que você leia e compreenda as seguintes explicações sobre o procedimento proposto. Esta declaração descreve o objetivo, procedimento, benefícios e riscos do estudo, e o seu direito de sair do estudo a qualquer momento. Nenhuma garantia ou promessa pode ser feita sobre o resultado do estudo. Estas informações estão sendo dadas para esclarecer quaisquer dúvidas sobre a pesquisa proposta, antes de obter o seu consentimento.

Objetivo: Investigar a associação entre variações genéticas (ou polimorfismos genéticos) e a degeneração macular relacionada à idade.

Resumo: A degeneração macular relacionada à idade (DMRI) é uma doença ocular progressiva que afeta muitas pessoas no mundo inteiro. A doença atinge a mácula do olho, que é a parte da retina onde ocorre nossa visão central mais aguçada. Os danos podem ser ocasionados quando vasos sanguíneos crescem e vazam sob essa parte do olho. Embora raramente resulte em cegueira completa, ela tira do indivíduo a visão central clara e “direta” necessária para ler, dirigir, etc. e deixa as imagens desvanecidas ou causa pontos escuros no centro da visão. A visão periférica pode não ser afetada e é possível ver com o “canto do olho”.

Procedimentos: Este estudo irá consistir de exame oftalmológico de rotina no Instituto da Visão, onde serão coletados dados da história clínica, de acuidade visual, tonometria de aplanção, biomicroscopia, oftalmoscopia binocular indireta e tomografia de coerência óptica. Iremos coletar também uma pequena amostra de sangue (5mL) através de punção venosa previamente ao exame angiofluoresceinográfico, utilizando a mesma punção que é feita para a realização deste exame. Essa amostra será posteriormente processada em laboratório para a análise dos polimorfismos genéticos. O material colhido será utilizado apenas para esse projeto e caso exista material excedente este será descartado.

Critérios de inclusão: idade acima de 50 anos, com DMRI (forma seca ou exsudativa).

Benefícios: Não haverá benefício direto com sua participação nesta pesquisa. Os dados provenientes com o estudo permitirão a melhor compreensão dessa grave doença.

Confidencialidade: Os registros de sua participação neste estudo serão mantidos confidencialmente até onde é permitido por lei e todas as informações estarão restritas à equipe responsável pelo projeto. No entanto, o pesquisador e sob certas circunstâncias, o Comitê de Ética em Pesquisa/UFMG, poderão verificar e ter

acesso aos dados confidenciais que o identificam pelo nome. Qualquer publicação dos dados não o identificará. Ao assinar este formulário de consentimento, você autoriza o pesquisador a fornecer seus registros médicos para o Comitê de Ética em Pesquisa/UFMG.

Desligamento: A sua participação neste estudo é voluntária e sua recusa em participar ou seu desligamento do estudo não envolverá penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Você poderá cessar sua participação a qualquer momento sem afetar seu acompanhamento médico em andamento.

Compensação: Você não receberá qualquer compensação financeira por sua participação no estudo.

Emergência / contato com a Comissão de Ética: Durante o estudo, se você tiver qualquer dúvida ou apresentar qualquer problema médico, contate a Dra. Luciana Negrão Frota de Almeida no telefone (31) 9293.0910 / (91) 8156.8514 ou o Dr. Carlos Eduardo dos Reis Veloso no telefone (31) 86707059 / (31) 32743355 ou a Comissão de Ética no telefone (031)3248-9364 (UFMG) ou no endereço: Av. Pres. Antonio Carlos, 6627 – Unidade Administrativa II – 2º andar – Sala 2005 – Cep: 31270-901 – BH-MG, ou a Comissão de Ética do Instituto da Visão no telefone (031) 3274-3355.

Consentimento: Li e entendi as informações precedentes. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim, indicando o meu consentimento para participar do estudo, até que eu decida o contrário.

Eu,.....
....., abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade em participar como voluntário(a) do estudo “ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS COM A DEGENERAÇÃO MACULAR RELACIONADA À IDADE ”.

Belo Horizonte, ____ de _____ de _____.

Assinatura do paciente: _____

Assinatura da testemunha: _____

Assinatura do pesquisador: _____

ANEXO C. Aprovação do estudo pelos Comitês de Ética em Pesquisa da UFMG e do Instituto da Visão

UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP

Parecer nº. ETIC 395/07

Interessado(a): Prof. Márcio Bittar Nehemy
Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia
Faculdade de Medicina-UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 9 de novembro de 2007, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**Associação de polimorfismos no gene VEGF com a degeneração macular relacionada à idade**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.



Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Parecer nº. ETIC 395/07

Interessado(a): Prof. Márcio Bittar Nehemy
Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia
Faculdade de Medicina-UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 20 de setembro de 2010, a alteração do título do projeto de pesquisa intitulado "**Associação de polimorfismos no gene VEGF com a degeneração macular relacionada à idade**" para: "**Associação de polimorfismos genéticos com a degeneração macular relacionada à idade**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG



INSTITUTO DA VISÃO

Rua dos Otoni, 881 / 13º andar
30150-270 - Belo Horizonte - MG
Tel.: (31) 3274-3355 - Fax: (31) 3222-5083
ivisao@ivisao.com - www.ivisao.com

Prof. Márcio Nehemy

CRM 10526

*Professor Titular em Oftalmologia
da Universidade Federal de Minas Gerais
Chefe do Serviço de Retina e Vitreo*

Belo Horizonte, 22 de outubro de 2007.

O Comitê de Ética Médica Interno do Instituto da Visão avaliou o projeto "Associação de Polimorfismos no Gene VEGF com a Degeneração Macular Relacionada à Idade".

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética Médica do Instituto da Visão. O mesmo deve ser submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais.

Atenciosamente,

Dr. Márcio Bittar Nehemy
Presidente / Diretor
Instituto da Visão



INSTITUTO DA VISÃO

Prof. Márcio Nehemy

CRM 10526

Rua dos Otoni, 881 / 13º andar
30150-270 - Belo Horizonte - MG
Tel.: (31) 3274-3355 - Fax: (31) 3222-5083
ivisao@ivisao.com - www.ivisao.com

Professor Titular em Oftalmologia
da Universidade Federal de Minas Gerais
Chefe do Serviço de Retina e Vítreo

Belo Horizonte, 16 de agosto de 2010.

O Comitê de Ética Médica Interno do Instituto da Visão avaliou o projeto "Associação de Polimorfismos Genéticos com a Degeneração Macular Relacionada à Idade".

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética Médica do Instituto da Visão. O mesmo deve ser submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais.

Atenciosamente,


Dr. Márcio Bittar Nehemy
Presidente / Diretor
Instituto da Visão

ANEXO D. Tabela de conversão da acuidade visual (*Snellen versus logMAR*) – adaptado de HOLLADAY (1997).

Acuidades visuais correspondentes	
Equivalente em Snellen	Equivalente em logMAR
20/20	0,00
20/25	0,10
20/32	0,20
20/40	0,30
20/50	0,40
20/63	0,50
20/80	0,60
20/100	0,70
20/125	0,80
20/160	0,90
20/200	1,00
20/250	1,10
20/320	1,20
20/400	1,30

ANEXO E. Publicação resultante desta tese (Artigo aceito para publicação na Revista Brasileira de Oftalmologia no dia 20/06/2011).

Importance of genetic polymorphisms in the response to age-related macular degeneration treatment

Importância dos polimorfismos genéticos na resposta terapêutica da degeneração macular relacionada à idade

Carlos Eduardo dos Reis Veloso¹

Luciana Negrão Frota de Almeida¹

Luiz Armando De Marco²

Raul Nunes Galvarro Vianna³

Márcio Bittar Nehemy⁴

1. Pós-graduando (Doutorado), Departamento de Oftalmologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG – Belo Horizonte (MG), Brasil.

2. Professor Titular, Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG – Belo Horizonte (MG), Brasil.

3. Professor Adjunto, Departamento de Oftalmologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal Fluminense – UFF – Rio de Janeiro (RJ), Brasil.

4. Professor Titular, Departamento de Oftalmologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG – Belo Horizonte (MG), Brasil.

Autor correspondente:

Carlos Eduardo dos Reis Veloso

Rua dos Otoni, 881 -13º andar – Santa Efigênia

Belo Horizonte – MG – CEP 30150-270 – Brasil

RESUMO

A degeneração macular relacionada à idade (DMRI) é uma doença degenerativa que afeta a retina central e envolve a membrana de Bruch, o epitélio pigmentado da retina e os fotorreceptores. Estudos recentes têm mostrado que polimorfismos dos genes *CFH*, *LOC387715* e *VEGF* estão associados com a DMRI. Neste trabalho, é feita uma revisão da

literatura para a análise da associação entre os principais polimorfismos genéticos e a resposta às diferentes modalidades terapêuticas existentes. Observa-se que pacientes portadores dos alelos de risco do gene *CFH* apresentam uma pior resposta ao tratamento preventivo da DMRI com antioxidantes e zinco. Já a associação entre o polimorfismo genético e a resposta à terapia fotodinâmica e às drogas antiangiogênicas é, até o momento, controversa.

Descritores: Degeneração macular/genética; Antioxidantes; Polimorfismo genético; Resultado de tratamento

ABSTRACT

Age-related macular degeneration (AMD) is a degenerative disorder that affects the central retina and involves the Bruch's membrane, the retinal pigment epithelium and the photoreceptors. Recent studies have shown that polymorphisms of the *CFH*, *LOC387715* and *VEGF* genes are associated with AMD. Herein, we review the literature to analyze the association between the main genetic polymorphisms and the response to the existing therapeutic modalities. Patients with *CFH* high-risk alleles show a poorer response to preventive treatment of AMD with antioxidants and zinc. The association between genetic polymorphisms and response to photodynamic therapy and antiangiogenic drugs, however, is controversial until now.

Keywords: Macular degeneration/genetics; Antioxidants; Polymorphism, genetic; Treatment outcome

INTRODUÇÃO

Age-related macular degeneration (AMD) is a degenerative disorder that affects the central retina and involves the Bruch's membrane, the retinal pigment epithelium (RPE) and the photoreceptors.^{1,2} It is characterized by a progressive, painless loss of central vision associated with ageing. AMD is considered the leading cause of irreversible blindness and responsible for a low quality of life in the affected population.^{1,3} In the United States of America population aged 40 years and older, the estimated prevalence of any AMD is 6.5%.⁴ The disease is usually classified into dry and wet types, responsible for 15% and 85% of cases, respectively. In the dry form, visual loss is usually gradual and is characterized by subretinal deposits called drusen or retinal pigment epithelial (RPE) abnormalities, including hyper or hypopigmentation. Larger drusen may become confluent and evolve into drusenoid

RPE detachments, which can progress to geographic atrophy and less frequently to wet AMD. Wet AMD (also called exudative or neovascular AMD) occurs when choroidal neovascular membrane grows under the RPE or between the RPE and neurosensory retina, leading to subretinal hemorrhage and subsequent scar tissue formation.^{1,2}

Etiological research suggests that AMD is a complex disease, caused by the actions and interactions of multiple genes and environmental factors such as smoking and hypertension.^{5,6} Recent studies have shown that some genetic polymorphisms are associated with AMD. A genetic variation in the complement factor H (*CFH*) gene on chromosome 1q32 is one of the most studied gene polymorphisms related to AMD. This polymorphism (*rs1061170*) results in a tyrosine-to-histidine substitution at amino acid position 402 (*Y402H*) in the *CFH* protein.⁷⁻³³ The *A69S* polymorphism (*rs10490924*) within the *LOC387715* gene on chromosome 10q26 that leads to an alanine-to-serine substitution was also found to confer an increased risk for development of AMD.³³⁻⁵⁰ Some papers suggested that the vascular endothelial growth factor (*VEGF*) gene could play a role in the pathogenesis of AMD.⁵¹⁻⁵⁸ However, many different single nucleotide polymorphisms (SNPs) were tested and limited sample sizes and diverse ethnic origin of cases and controls were studied to ensure a statistically valid conclusion. It has also been demonstrated that common *CFH* and *LOC387715* polymorphisms were independently related to progression from early or intermediate stages to advanced forms of the disease.⁵⁹ Herein, we review the main published studies that evaluate the response to the treatment of AMD related to genetic polymorphisms.

Klein et al. made a retrospective analysis of participants of a randomized, controlled clinical trial, the Age-Related Eye Disease Study (AREDS) to investigate the possible association between the response to oral antioxidants and zinc with genetic polymorphisms. The AREDS study enrolled 4757 participants from 11 clinical centers and established that a combination of zinc and antioxidants (B-carotene, vitamin C, and vitamin E) produced a 25% reduction in development of AMD over 5 years and a 19% reduction in severe vision loss in individuals determined to be at high risk of developing the advanced forms of the disease. A treatment interaction was observed between the *CFH Y402H* high-risk genotype and supplementation with antioxidants plus zinc ($p = 0.03$). An interaction ($p = 0.004$) was observed in the AREDS treatment groups taking zinc when compared with the groups taking no zinc, but not in groups taking antioxidants compared with those taking no antioxidants ($p = 0.59$). There were no significant treatment interactions observed with *LOC387715*.⁶⁰

Other authors have studied the effect of the *LOC387715*, *CFH* and *VEGF* genotypes on the response to photodynamic therapy (PDT) with controversial results.⁶¹⁻⁶⁸ Goverdhan et al. genotyped a total of 557 cases with AMD and 551 normal controls for the *CFH Y402H*. Twenty-seven PDT-treated patients were followed up for 15 months and individuals with

different *CFH* genotypes were then analyzed for any association with visual change following PDT. The number of patients carrying the high-risk C allele was 70.4% in those requiring PDT as compared to 52.3% in the non-PDT group ($p=0.011$), and presence of the CC genotype significantly increased the risk of PDT ($p=0.015$). The degree of visual loss following PDT was significantly higher in the *CFH* CC genotype group ($p=0.038$); 50% of CC cases and 45% of the CT cases lost 15 or more ETDRS letters at final follow-up. In conclusion, they showed that patients homozygous for the *CFH* high risk allele seem to have worse outcome after PDT.⁶¹ Brantley et al. also found a potential relationship between *CFH* genotype and response to PDT. However, they showed that patients with the *CFH* TT genotype (*T*: non-risk allele) fared significantly worse with PDT than those with the *CFH* TC and CC genotypes.⁶² Other studies did not show significant association between *CFH* polymorphism and PDT response for neovascular AMD.^{63,64} For *LOC387715*, two important studies have shown that there is no statistical significant difference among the genotypes in response to PDT.^{62,65} However, Sakurada et al. have recently shown that there is a pharmacogenetic association between the *LOC387715* A69S variant and the long-term results after PDT in eyes with polypoidal choroidal vasculopathy (PCV). In this study, PDT was repeated every 3 months until the disappearance of angiographic signs of active lesions in 71 eyes of 71 patients with PCV who were followed-up for at least 12 months. There was a statistically significant difference in the visual acuity both at the 12-month and final visits ($p = 0.002$ and $P < 0.001$, respectively) with the poorer acuity in patients with the higher T-allele frequency.⁶⁶ Immonen et al. have evaluated *VEGF* gene polymorphism and the outcome after PDT and showed a strong relationship between this gene and the treatment results. The *VEGF* gene polymorphic SNPs at *rs699947* and *rs2146323* were strong determinants of the anatomic outcome after PDT, but the SNPs studied were not associated with the presence of exudative AMD or with the CNV lesion size or configuration.⁶⁷ However, Tsuchihashi et al. did not show any association between *VEGF* *rs699947* SNP and the response to PDT.⁶⁸ Other genetic polymorphisms and its relationship with the response to PDT were evaluated but showed no statistically significant results.^{62,67}

Recently, two studies have demonstrated the association between gene polymorphisms and the response to intravitreal injections of the antivascular endothelial growth factor (anti-VEGF) agents bevacizumab and ranibizumab.^{69,70} Brantley et al. conducted a study in which eighty-six patients with exudative AMD undergoing treatment with 1.25 mg intravitreal bevacizumab in one eye were enrolled. Intravitreal injections were performed at 6-week intervals until there was no longer evidence of active neovascularization. Each patient was followed for a minimum of 6 months. The authors showed that post-bevacizumab VA was significantly worse in the *CFH* CC genotype than for the *CFH* TC or TT genotypes ($p=0.016$). However, there was no significant difference in

response to this drug according to the *LOC387715* genotypes.⁶⁹ The other pharmacogenetic study published three years later was conducted to determine whether *CFH* genotypes had an effect on the treatment of exudative AMD with ranibizumab. A total of 178 patients were studied and, for each patient, an intravitreal injection of 0.5 mg of ranibizumab was performed at the initial presentation of an active choroidal neovascular complex. Subsequent injections were performed as needed and patients were followed for a minimum of 9 months. In this retrospective study, Lee et al. found no difference in VA outcomes after ranibizumab treatment among the different *CFH* genotypes, in contrast to the previous study with bevacizumab. Nevertheless, over 9 months, patients with both risk alleles received approximately 1 more intravitreal injection.⁷⁰

There is only one study with a large number of patients that addresses the preventive treatment of dry AMD related to the genetic polymorphisms. As we can observe, the majority of published articles about the therapeutic response of exudative AMD are related the photodynamic therapy and many of them are controversial. Only two papers consider the intravitreal response to anti-VEGF agents according to the genetic polymorphisms. Since antiangiogenic therapy is now considered the gold standard treatment of exudative AMD, there is a long way to be traversed until treatment could be indicated according to the genetic profile of the patient. Additional studies with a larger number of patients, longer follow-up period and including more SNPs are important to establish a definite correlation between gene polymorphism and the therapeutic response in AMD. Only then may the treatment of this disease be recommended or modified based on genetic findings.

REFERÊNCIAS

1. Seddon JM, Chen CA. Epidemiology of age-related macular degeneration. In: Ryan SJ. Retina. 4th ed. Philadelphia: Elsevier; 2006.
2. Donoso LA, Kim D, Frost A, Callahan A, Hageman G. The role of inflammation in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol.* 2006;51(2):137-52. Comment in: *Surv Ophthalmol.* 2006;51(5):532; author reply 532.
3. Brown G, Brown MM. Let us wake the nation on the treatment for age-related macular degeneration. *Curr Opin Ophthalmol.* 2010;21(3):169-71.
4. Klein R, Chou CF, Klein BE, Zhang X, Meuer SM, Saaddine JB. Prevalence of age-related macular degeneration in the US population. *Arch Ophthalmol.* 2011;129(1):75-80.
5. Scholl HP, Fleckenstein M, Charbel Issa P, Keilhauer C, Holz FG, Weber BH. An update on the genetics of age-related macular degeneration. *Mol Vis.* 2007;13:196-205. Review.
6. Klein R, Cruickshanks KJ, Nash SD, Krantz EM, Javier Nieto F, Huang GH, et al. The prevalence of age-related macular degeneration and associated risk factors. *Arch Ophthalmol.* 2010;128(6):750-8.

7. Edwards AO, Ritter R 3rd, Abel KJ, Manning A, Panhuysen C, Farrer LA. Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science*. 2005;308(5720):421-4. Comment in: *Science*. 2005;308(5720):362-4.
8. Haines JL, Hauser MA, Schmidt S, Scott WK, Olson LM, Gallins P, et al. Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. *Science*. 2005;308(5720):419-21. Comment in: *Science*. 2005;308(5720):362-4.
9. 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;308(5720):385-9. Comment in: *Science*. 2005;308(5720):362-4.
10. Zarepari S, Branham KE, Li M, Shah S, Klein RJ, Ott J, et al. Strong association of the Y402H variant in complement factor H at 1q32 with susceptibility to age-related macular degeneration. *Am J Human Genet*. 2005;77(1):149-53.
11. Souied EH, Leveziel N, Richard F, Dragon-Durey MA, Coscas G, Soubrane G, et al. Y402H complement factor H polymorphism associated with exudative age-related macular degeneration in the French population. *Mol Vis*. 2005;11:1135-40.
12. Sepp T, Khan JC, Thurlby DA, Shahid H, Clayton DG, Moore AT, et al. Complement factor H variant Y402H is a major risk determinant for geographic atrophy and choroidal neovascularization in smokers and nonsmokers. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47(2):536-40.
13. Postel EA, Agarwal A, Caldwell J, Gallins P, Toth C, Schmidt S, et al. Complement factor H increases risk for atrophic age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. 2006;113(9):1504-7.
14. Schaumberg DA, Christen WG, Kozlowski P, Miller DT, Ridker PM, Zee RY. A prospective assessment of the Y402H variant in complement factor H, genetic variants in C-reactive protein, and risk of age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47(6):2336-40.
15. Simonelli F, Frisso G, Testa F, di Fiore R, Vitale DF, Manitto MP, et al. Polymorphism p.402Y>H in the complement factor H protein is a risk factor for age related macular degeneration in an Italian population. *Br J Ophthalmol*. 2006;90(9):1142-5. Comment in: *Br J Ophthalmol*. 2006;90(9):1080-1.
16. Despret DD, Klaver CC, Witteman JC, Bergen AA, Kardys I, de Maat MP, et al. Complement factor H polymorphism, complement activators, and risk of age-related macular degeneration. *JAMA*. 2006;296(3):301-9.
17. Seitsonen S, Lemmelä S, Holopainen J, Tommila P, Ranta P, Kotamies A, et al. Analysis of variants in the complement factor H, the elongation of very long chain fatty acids-like 4 and the hemicentin 1 genes of age-related macular degeneration in the Finnish population. *Mol Vis*. 2006;12:796-801.

18. Lau LI, Chen SJ, Cheng CY, Yen MY, Lee FL, Lin MW, et al. Association of the Y402H polymorphism in complement factor H gene and neovascular age-related macular degeneration in Chinese patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47(8):3242-6.
19. Schaumberg DA, Hankinson SE, Guo Q, Rimm E, Hunter DJ. A prospective study of 2 major age-related macular degeneration susceptibility alleles and interactions with modifiable risk factors. *Arch Ophthalmol.* 2007;125(1):55-62. Comment in: *JAMA.* 2007;297(4):401-2.
20. Scott WK, Schmidt S, Hauser MA, Gallins P, Schnetz-Boutaud N, Spencer KL, et al. Independent effects of complement factor H Y402H polymorphism and cigarette smoking on risk of age-related macular degeneration. *Ophthalmology.* 2007;114(6):1151-6.
21. Wegscheider BJ, Weger M, Renner W, Steinbrugger I, März W, Mossböck G, et al. Association of complement factor H Y402H gene polymorphism with different subtypes of exudative age-related macular degeneration. *Ophthalmology.* 2007;114(4):738-42.
22. Brantley MA Jr, Edelstein SL, King JM, Apte RS, Kymes SM, Shiels A. Clinical phenotypes associated with the complement factor H Y402H variant in age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol.* 2007;144(3):404-8.
23. Ricci F, Zampatti S, D'Abbruzzi F, Missiroli F, Martone C, Lepre T, et al. Typing of ARMS2 and CFH in age-related macular degeneration: case-control study and assessment of frequency in the Italian population. *Arch Ophthalmol.* 2009;127(10):1368-72.
24. Gotoh N, Yamada R, Nakanishi H, Saito M, Iida T, Matsuda F, Yoshimura N. Correlation between CFH Y402H and HTRA1 rs11200638 genotype to typical exudative age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy phenotype in the Japanese population. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2008;36(5):437-42.
25. Chowers I, Cohen Y, Goldenberg-Cohen N, Vicuna-Kojchen J, Lichtinger A, Weinstein O, et al. Association of complement factor H Y402H polymorphism with phenotype of neovascular age related macular degeneration in Israel. *Mol Vis.* 2008;14:1829-34.
26. Kim IK, Ji F, Morrison MA, Adams S, Zhang Q, Lane AM, et al. Comprehensive analysis of CRP, CFH Y402H and environmental risk factors on risk of neovascular age-related macular degeneration. *Mol Vis.* 2008;14:1487-95.
27. Xu Y, Guan N, Xu J, Yang X, Ma K, Zhou H, et al. Association of CFH, LOC387715, and HTRA1 polymorphisms with exudative age-related macular degeneration in a northern Chinese population. *Mol Vis.* 2008;14:1373-81.
28. Teixeira AG, Silva AS, Lin FL, Velletri R, Bavia L, Belfort R, Isaac L. Association of complement factor H Y402H polymorphism and age-related macular degeneration in Brazilian patients. *Acta Ophthalmol.* 2010;88(5):e165-9.

29. Robman L, Baird PN, Dimitrov PN, Richardson AJ, Guymer RH. C-reactive protein levels and complement factor H polymorphism interaction in age-related macular degeneration and its progression. *Ophthalmology*. 2010;117(10):1982-8.
30. Hayashi H, Yamashiro K, Gotoh N, Nakanishi H, Nakata I, Tsujikawa A, et al. CFH and ARMS2 variations in age-related macular degeneration, polypoidal choroidal vasculopathy, and retinal angiomatous proliferation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51(11):5914-9.
31. Yang X, Hu J, Zhang J, Guan H. Polymorphisms in CFH, HTRA1 and CX3CR1 confer risk to exudative age-related macular degeneration in Han Chinese. *Br J Ophthalmol*. 2010;94(9):1211-4.
32. 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;30(8):1177-84.
33. Shuler RK Jr, Hauser MA, Caldwell J, Gallins P, Schmidt S, Scott WK, et al. Neovascular age-related macular degeneration and its association with LOC387715 and complement factor H polymorphism. *Arch Ophthalmol*. 2007;125(1):63-7.
34. Jakobsdottir J, Conley YP, Weeks DE, Mah TS, Ferrell RE, Gorin MB. Susceptibility genes for age-related maculopathy on chromosome 10q26. *Am J Hum Genet*. 2005;77(3):389-407.
35. Rivera A, Fisher SA, Fritsche LG, Keilhauer CN, Lichtner P, Meitinger T, Weber BH. Hypothetical LOC387715 is a second major susceptibility gene for age related macular degeneration, contributing independently of complement factor H to disease risk. *Hum Mol Genet*. 2005;14(21):3227-36.
36. Schmidt S, Hauser MA, Scott WK, Postel EA, Agarwal A, Gallins P, et al. Cigarette smoking strongly modifies the association of LOC387715 and age-related macular degeneration. *Am J Hum Genet* 2006;78(5):852-64.
37. Fisher SA, Rivera A, Fritsche LG, Babadjanova G, Petrov S, Weber BH. Assessment of the contribution of CFH and chromosome 10q26 AMD susceptibility loci in a Russian population isolate. *Br J Ophthalmol*. 2007;91(5):576-8.
38. Tanimoto S, Tamura H, Ue T, Yamane K, Maruyama H, Kawakami H, Kiuchi Y. A polymorphism of LOC387715 gene is associated with age-related macular degeneration in the Japanese population. *Neurosci Lett*. 2007;414(1):71-4.
39. Ross RJ, Bojanowski CM, Wang JJ, Chew EY, Rochtchina E, Ferris FL 3rd, et al. The LOC387715 polymorphism and age-related macular degeneration: replication in three case-control samples. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48(3):1128-32.

40. Francis PJ, George S, Schultz DW, Rosner B, Hamon S, Ott J, et al. The LOC387715 gene, smoking, body mass index, environmental associations with advanced age-related macular degeneration. *Hum Hered.* 2007;63(3-4):212-8.
41. Kanda A, Chen W, Othman M, Branham KE, Brooks M, Khanna R, et al. A variant of mitochondrial protein LOC387715/ARMS2, not HTRA1, is strongly associated with age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(41):16227-32. Comment in: *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(43):16725-6.
42. Fritsche LG, Loenhardt T, Janssen A, Fisher SA, Rivera A, Keilhauer CN, Weber BH. Age-related macular degeneration is associated with an unstable ARMS2 (LOC387715) mRNA. *Nat Genet.* 2008;40(7):892-6. Comment in: *Nat Genet.* 2008;40(7):820-1.
43. Francis PJ, Zhang H, Dewan A, Hoh J, Klein ML. Joint effects of polymorphisms in the HTRA1, LOC387715/ARMS2, and CFH genes on AMD in a Caucasian population. *Mol Vis.* 2008;14:1395-400.
44. Neuner B, Wellmann J, Dasch B, Dietzel M, Farwick A, Stoll M, et al. LOC387715, smoking and their prognostic impact on visual functional status in age-related macular degeneration-The Muenster Aging and Retina Study (MARS) cohort. *Ophthalmic Epidemiol.* 2008;15(3):148-54.
45. Shuler RK Jr, Schmidt S, Gallins P, Hauser MA, Scott WK, Caldwell J, et al. Phenotype analysis of patients with the risk variant LOC387715 (A69S) in age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol.* 2008;145(2):303-7.
46. Andreoli MT, Morrison MA, Kim BJ, Chen L, Adams SM, Miller JW, et al. Comprehensive analysis of complement factor H and LOC387715/ARMS2/HTRA1 variants with respect to phenotype in advanced age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol.* 2009;148(6):869-74.
47. Jiang H, Qu Y, Dang G, Zhang X, Yin N, Zhang Y, et al. Analyses of single nucleotide polymorphisms and haplotype linkage of LOC387715 and the HTRA1 gene in exudative age-related macular degeneration in a Chinese cohort. *Retina.* 2009;29(7):974-9.
48. Gotoh N, Nakanishi H, Hayashi H, Yamada R, Otani A, Tsujikawa A, et al. ARMS2 (LOC387715) variants in Japanese patients with exudative age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy. *Am J Ophthalmol.* 2009;147(6):1037-41,1041.e1-2.
49. Tong Y, Liao J, Zhang Y, Zhou J, Zhang H, Mao M. LOC387715/HTRA1 gene polymorphisms and susceptibility to age-related macular degeneration: A HuGE review and meta-analysis. *Mol Vis.* 2010;16:1958-81.
50. Lee SJ, Kim NR, Chin HS. LOC387715/HTRA1 polymorphisms, smoking and combined effects on exudative age-related macular degeneration in a Korean population. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2010;38(7):698-704.

51. Haines JL, Schnetz-Boutaud N, Schmidt S, Scott WK, Agarwal A, Postel EA, et al. Functional candidate genes in age-related macular degeneration: significant association with VEGF, VLDLR, and LRP6. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47(1):329-35.
52. Churchill AJ, Carter JG, Lovell HC, Ramsden C, Turner SJ, Yeung A, et al. VEGF polymorphisms are associated with neovascular age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet.* 2006;15(19):2955-61.
53. Richardson AJ, Islam FM, Guymer RH, Cain M, Baird PN. A tag-single nucleotide polymorphisms approach to the vascular endothelial growth factor-A gene in age-related macular degeneration. *Mol Vis.* 2007;13:2148-52.
54. Boekhoorn SS, Isaacs A, Uitterlinden AG, van Duijn CM, Hofman A, de Jong PT, Vingerling JR. Polymorphisms in the vascular endothelial growth factor gene and risk of age-related macular degeneration: the Rotterdam Study. *Ophthalmology.* 2008;115(11):1899-903.
55. Lin JM, Wan L, Tsai YY, Lin HJ, Tsai Y, Lee CC, et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms in age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol.* 2008;145(6):1045-51.
56. Janik-Papis K, Zaras M, Krzyzanowska A, Wozniak K, Blasiak J, Szaflik J, Szaflik JP. Association between vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and age-related macular degeneration in a Polish population. *Exp Mol Pathol.* 2009;87(3):234-8.
57. Fang AM, Lee AY, Kulkarni M, Osborn MP, Brantley MA Jr. Polymorphisms in the VEGFA and VEGFR-2 genes and neovascular age-related macular degeneration. *Mol Vis.* 2009;15:2710-9.
58. Galan A, Ferlin A, Caretti L, Buson G, Sato G, Frigo AC, Foresta C. Association of age-related macular degeneration with polymorphisms in vascular endothelial growth factor and its receptor. *Ophthalmology.* 2010;117(9):1769-74.
59. Seddon JM, Francis PJ, George S, Schultz DW, Rosner B, Klein ML. Association of CFH Y402H and LOC387715 A69S with progression of age-related macular degeneration. *JAMA.* 2007;297(16):1793-800. Erratum in: *JAMA.* 2007;297(23):2585. Comment in: *JAMA.* 2007;298(14):1637; author reply 1637.
60. Klein ML, Francis PJ, Rosner B, Reynolds R, Hamon SC, Schultz DW, et al. CFH and LOC387715/ARMS2 genotypes and treatment with antioxidants and zinc for age-related macular degeneration. *Ophthalmology.* 2008;115(6):1019-25.
61. Goverdhan SV, Hannan S, Newsom RB, Luff AJ, Griffiths H, Lotery AJ. An analysis of the CFH Y402H genotype in AMD patients and controls from the UK, and response to PDT treatment. *Eye (Lond).* 2008;22(6):849-54.
62. Brantley MA Jr, Edelstein SL, King JM, Plotzke MR, Apte RS, Kymes SM, Shiels A. Association of complement factor H and LOC387715 genotypes with response of

- exudative age-related macular degeneration to photodynamic therapy. *Eye (Lond)*. 2009;23(3):626-31.
63. Feng X, Xiao J, Longville B, Tan AX, Wu XN, Cooper MN, et al. Complement factor H Y402H and C-reactive protein polymorphism and photodynamic therapy response in age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. 2009;116(10):1908-12.e1.
 64. Seitsonen SP, Jarvela IE, Meri S, Tommila PV, Ranta PH, Immonen IJ. The effect of complement factor H Y402H polymorphism on the outcome of photodynamic therapy in age-related macular degeneration. *Eur J Ophthalmol*. 2007;17(6):943-9.
 65. Chowers I, Meir T, Lederman M, Goldenberg-Cohen N, Cohen Y, Banin E, et al. Sequence variants in HTRA1 and LOC387715/ARMS2 and phenotype and response to photodynamic therapy in neovascular age-related macular degeneration in populations from Israel. *Mol Vis*. 2008;14:2263-71.
 66. Sakurada Y, Kubota T, Imasawa M, Mabuchi F, Tanabe N, Iijima H. Association of LOC387715 A69S genotype with visual prognosis after photodynamic therapy for polypoidal choroidal vasculopathy. *Retina*. 2010;30(10):1616-21.
 67. Immonen I, Seitsonen S, Tommila P, Kangas-Kontio T, Kakko S, Savolainen ER, et al. Vascular endothelial growth factor gene variation and the response to photodynamic therapy in age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. 2010;117(1):103-8.
 68. Tsuchihashi T, Mori K, Horie-Inoue K, Gehlbach PL, Kabasawa S, Takita H, et al. Complement factor H and high-temperature requirement A-1 genotypes and treatment response of age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. 2011;118(1):93-100.
 69. Brantley MA Jr, Fang AM, King JM, Tewari A, Kymes SM, Shiels A. Association of complement factor H and LOC387715 genotypes with response of exudative age-related macular degeneration to intravitreal bevacizumab. *Ophthalmology*. 2007;114(12):2168-73.
 70. Lee AY, Raya AK, Kymes SM, Shiels A, Brantley MA Jr. Pharmacogenetics of complement factor H (Y402H) and treatment of exudative age-related macular degeneration with ranibizumab. *Br J Ophthalmol*. 2009;93(5):610-3.

ANEXO F. Cópia da ata de defesa



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640



ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE **CARLOS EDUARDO DOS REIS VELOSO**, nº de registro 2008670575.

Às nove horas do dia primeiro de março de dois mil e doze, reuniu-se na Faculdade de Medicina da UFMG, a Comissão Examinadora de tese indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: **“IMPORTANCIA DE POLIMORFISMO DOS GENES CFH, LOC387715 E VEGF E NA RESPOSTA TERAPEUTICA DA DEGENERACÃO MACULAR RELACIONADA À IDADE EXSUDATIVA AOS ANTIANGIOGENICOS”**, requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e a Oftalmologia. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Márcio Bittar Nehemy, após dar a conhecer aos presentes o teor das normas regulamentares do trabalho final passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença do candidato e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof. Márcio Bittar Nehemy/Orientador	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovado</u>
Prof. Daniel Vitor de Vasconcelos Santos	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovado</u>
Prof. Marco Aurélio Lana Peixoto	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovado</u>
Prof. Edmundo Frota de Almeida Sobrinho	Instituição: UFPA	Indicação: <u>Aprovado</u>
Prof. Raul Nunes Galvarro Vianna	Instituição: UFF	Indicação: <u>APROVADO</u>

Pelas indicações, o candidato foi considerado Aprovado.

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 01 de março de 2012.

Prof. Márcio Bittar Nehemy/Orientador _____
Prof. Daniel Vitor de Vasconcelos Santos _____
Prof. Marco Aurélio Lana Peixoto _____
Prof. Edmundo Frota de Almeida Sobrinho _____
Prof. Raul Nunes Galvarro Vianna _____
Prof. Marcelo Dias Sanches/Coordenador _____

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador.

Prof. Marcelo Dias Sanches
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Cirurgia e da Oftalmologia
Faculdade de Medicina/UFMG