

Luciana Negrão Frota de Almeida

**ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES
CFH, LOC387715 E VEGF COM A DEGENERAÇÃO
MACULAR RELACIONADA À IDADE**

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 para a obtenção do título de Doutor em Medicina.

Área de Concentração: Resposta inflamatória à agressão tecidual

Orientador: Prof. Luiz Armando De Marco
Universidade Federal de Minas Gerais

Co-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. Célio Campolina Diniz

Pró-Reitor de Pós-Graduação

Prof. Ricardo Santiago Gomêz

Pró-Reitor de Pesquisa

Prof. Renato de Lima Santos

Diretor da Faculdade de Medicina

Prof. Francisco José Penna

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

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

Prof. Marcelo Dias Sanches

Chefe do Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia

Prof. Roberto Eustáquio Santos Guimarães

Membros do 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

Representante discente: Eduardo Ângelo Braga



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 - sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640



DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE LUCIANA NEGRÃO FROTA DE ALMEIDA, nº de registro 2008670796.

As quatorze horas do dia e 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: **"ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMO NOS GENES CFH, LOC387715 E VEGF COM A DEGENERAÇÃO MACULAR RELACIONADA A IDADE"**, requisito final para a obtenção do grau de Doutora 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. Luiz Armando Cunha De Marco, após dar a conhecer aos presentes o teor das normas regulamentares do trabalho final passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença da candidata e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof. Luiz Armando Cunha De Marco/Orientador	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovada</u>
Prof. Márcio Bittar Nehemy/ Co-orientador	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovada</u>
Prof. Daniel Vitor de Vasconcelos Santos	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovada</u>
Prof. Leonardo Torquetti Costa	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovada</u>
Prof. Laurentino Bicas Neto	Instituição: SCMES	Indicação: <u>Aprovada</u>
Prof. Raul Nunes Galvarro Vianna	Instituição: UFF	Indicação: <u>Aprovada</u>

Pelas indicações, a candidata foi considerada Aprovada

O resultado final foi comunicado publicamente a candidata 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. Luiz Armando Cunha De Marco/Orientador _____
 Prof. Márcio Bittar Nehemy/Coordenador _____
 Prof. Daniel Vitor de Vasconcelos Santos _____
 Prof. Leonardo Torquetti Costa _____
 Prof. Laurentino Bicas Neto _____
 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 Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia
Faculdade de Medicina UFMG

Dedico

Ao meu pai, minha segurança.

À minha mãe, meu aconchego.

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai, meu maior exemplo de disciplina e perseverança, por ter me inspirado a seguir o caminho da oftalmologia e da pesquisa.

À minha mãe, por seu colo, seu sorriso e suas palavras de amor.

Ao meu marido, Patrick, que me acompanhou nesta jornada desde o princípio, por seu amor, ternura e carinho (ATC).

Aos meus irmãos-amigos-“filhos”, Rafael, Marina e Izabela, que compartilham meus sonhos e me ajudam, cada um do seu jeito, a conquistá-los.

Ao meu sócio, cunhado, compadre e amigo, Alexandre, por salvar, literalmente, meus arquivos e estar sempre por perto.

Ao meu “cunhado” Daniel, por todos os vídeos de todas as aulas até hoje.

À minha prima Júlia, que mesmo de longe me deu de presente as figuras da aula.

Às minhas amigas-irmãs-madrinhas Paula, Carol, Eduarda, Carolina, Camille e Erika, que nunca me deixaram desanimar e sempre estiveram ao meu lado nos momentos mais baixos e nos mais altos da vida.

Ao meu orientador, Luiz Armando, que abriu as portas do seu laboratório e me reapresentou à genética, pela confiança em meu trabalho e por suas inúmeras histórias, sempre com uma moral a ser aprendida.

Ao meu orientador, Dr. Márcio, idealizador desta pesquisa, por sua orientação precisa, seus comentários sempre elegantes e por suas palavras de estímulo.

Às minhas amigas do laboratório: Kel – meu braço direito e esquerdo, Pat, Ju, Fran e Wolf, por seus ensinamentos, paciência e torcida.

Aos colegas de trabalho Lu Bastos, Helena, Cris, Diogo, Carlos e, à minha amiga, Érika Yumi, que contribuíram ativamente neste estudo.

À Suzana Oellers, por sua revisão mais do que criteriosa e divertida.

À equipe do Hospital São Geraldo (Be e Denimara), do Instituto da Visão (Gil, Lu, Jaque, Angelina e Fabiana) e do Centro Especializado em Olhos (Leila, Antonia, Rai e Helen), que me ajudaram a colher as amostras e os frutos desta pesquisa.

À equipe do CPG, em especial à Mari, secretária do curso, que com sua voz doce e tranquila apazigua os ânimos dos doutorandos.

Aos pacientes e seus familiares, cuja participação generosa nesta pesquisa contribuiu de forma determinante para a sua realização.

*Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.*

Fernando Pessoa

RESUMO

Objetivo: Investigar a associação entre polimorfismos nos genes *CFH*, *LOC387715/ARMS2* e *VEGF* e a degeneração macular relacionada à idade (DMRI) em uma amostra da população brasileira. **Métodos:** Foram coletadas amostras de sangue de 163 pacientes portadores de DMRI, atendidos no Instituto da Visão, e de 140 pacientes sem DMRI, como grupo controle, atendidos no Hospital São Geraldo/HC da Universidade Federal de Minas Gerais e no Centro Especializado em Olhos. O DNA foi extraído das amostras para amplificação por reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) para genotipagem utilizando discriminação alélica e posterior análise estatística dos polimorfismos. **Resultados:** Na análise dos três genes pesquisados, foi encontrada diferença na distribuição dos genótipos entre o grupo DMRI e o grupo controle. No estudo do gene *CFH*, 33,3% dos indivíduos do grupo DMRI e 10,1% do grupo controle eram homozigotos para o alelo de risco (*odds ratio* – OR 7,8; intervalo de confiança 95% – IC 95%: 4,1-15,4). A prevalência de homozigose para o alelo selvagem do gene *LOC387715/ARMS2* também foi maior no grupo DMRI (23,6%) do que no grupo controle (7,2%) (OR 5,6; IC 95%: 2,7-11,7). A presença de heterozigose para esses dois genes também foi estatisticamente significativa para o *CFH* (OR 2,7; IC 95%: 1,6-4,4) e para o *LOC387715/ARMS2* (OR 2,1; IC 95%: 1,3-3,2). Entretanto, o gene *VEGF* somente apresentou significância estatística quando em presença de homozigose com prevalência de 18,1% no grupo DMRI e de 5,8% no grupo controle (OR 3,6; IC 95%: 1,6-8,2). **Conclusão:** O estudo sugere que os polimorfismos dos três genes pesquisados estão associados à DMRI nesta amostra da população brasileira.

Palavras chaves: Degeneração macular. Frequência do gene. Polimorfismo de um único nucleotídeo. Polimorfismo genético.

ABSTRACT

Association of *CFH*, *LOC387715*, and *VEGF* gene polymorphisms with age-related macular degeneration

Purpose: Investigate the association between *CFH*, *LOC387715/ARMS2*, and *VEGF* gene polymorphisms and age-related macular degeneration (AMD) in a Brazilian cohort. **Methods:** Blood samples were collected from 163 individuals with AMD recruited at Instituto da Visão, and from 140 individuals without AMD, as the control group, recruited at São Geraldo Hospital/HC of the Universidade Federal de Minas Gerais and at Centro Especializado em Olhos, Brazil. Genomic DNA was isolated from whole blood for real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) amplification and the allelic discrimination mode was used for genotyping and subsequent statistical analysis of polymorphisms. **Results:** Analyzing the three genes, a significant difference was observed in genotype distribution between the AMD and the control groups. Studying *CFH* gene, 33.3% of the individuals in the AMD group and 10.1% in the control group were homozygous for the at-risk allele (odds ratio – OR 7.8; 95% confidence interval – 95% CI: 4.1-15.4). Homozygosity for *LOC387715/ARMS2* wild-type allele was also higher in the AMD group (23.6%) than in the control group (7.2%) (OR 5.6; 95% CI: 2.7-11.7). Heterozygosity for these two genes was also statistically significant for *CFH* (OR 2.7; 95% CI: 1.6-4.4) and for *LOC387715/ARMS2* (OR 2.1; 95% CI: 1.3-3.2). However, *VEGF* gene showed significant association only for homozygosity, with a prevalence of 18.1% in the AMD group and 5.8% in the control group (OR: 3.6; 95% CI 1.6-8.2). **Conclusion:** Our results suggest that the polymorphisms of the three genes studied are associated with AMD in this Brazilian cohort.

Key words: Macular degeneration. Gene frequency. Single nucleotide polymorphism. Genetic polymorphism.

LISTA DE FIGURAS

MÉTODOS

Figura 1. Resultado da leitura da RT-PCR com as amostras já selecionadas manualmente.	39
---	----

ARTIGO 2 – Association analysis of *CFH* and *LOC387715* gene polymorphisms in a Brazilian cohort with age-related macular degeneration

Figure 1. Slot plot of the proportion of European (EU), African (AF), and Amerindian (AM) ancestry in the group presenting age-related macular degeneration (AMD) and in the control group.	49
---	----

ARTIGO 3 – Homozygosity for the +674C>T polymorphism on VEGF gene is associated with age-related macular degeneration in a Brazilian cohort

Figure 1. PCR-Real time plot for +674C>T VEGF polymorphism	65
---	----

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

ARTIGO 1 – The role of molecular genetic factors in age-related macular degeneration

Table 1. A summary of associations between AMD and genetic variants. 28

MÉTODOS

Tabela 1. Sistema de estadiamento clínico da maculopatia relacionada à idade. 34

RESULTADOS

ARTIGO 2 – Association analysis of *CFH* and *LOC387715* gene polymorphisms in a Brazilian cohort with age-related macular degeneration

Table 1. Baseline characteristics of the study population. 48

Table 2. Genotype and allele frequency distribution in the group presenting age-related macular degeneration (AMD) and in the control group. . 50

Table 3. Genotype frequency distribution in patients with exudative AMD in the group presenting age-related macular degeneration (AMD) and in the control group. 52

Table 4. Genotype frequency distribution in patients with nonexudative AMD in the group presenting age-related macular degeneration (AMD) and in the control group. 53

Table 5. Joint effects of *LOC387715* and *CFH* genotypes. 54

Table 6. Joint effects of *LOC387715* and *CFH* genotypes controlling for race. 55

ARTIGO 3 – Homozygosity for the +674C>T polymorphism on VEGF gene is associated with age-related macular degeneration in a Brazilian cohort

Table 1. Genotype frequencies and alleles in AMD patients and control subjects.	65
Table 2. Genotype/allele frequencies in exudative AMD patients and control subjects.	66
Table 3. Genotype/allele frequencies in nonexudative AMD patients and control subjects.	66

RESULTADOS ADICIONAIS

Tabela 2. Efeito aditivo dos três polimorfismos estudados.	69
--	----

APÊNDICE 3

Table 1. The clinical age-related maculopathy staging system (CARMS).	87
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E NOTAÇÕES

- g** Aceleração da gravidade
- DNA** Ácido desoxirribonucleico, *deoxyribonucleic acid*
- EDTA** Ácido etilenodiamino tetracético
- A** *Adenine*
- AF** *African*
- AMD** *Age-related macular degeneration*
- AM** *Amerindian*
- APOE** *Apolipoprotein E*
- BMI** *Body mass index*
- CNS** *Central neural system*
- CNV** *Choroidal neovascularization*
- CNVM** *Choroidal neovascular membrane*
- C** Citosina, *cytosine*
- NaCl** Cloreto de sódio
- CFB** *Complement factor B*
- C2** Componente do complemento 2, *complement component 2*
- DMRI** Degeneração macular relacionada à idade
- DP** Desvio padrão
- EPR** Epitélio pigmentado da retina
- et al.** E outros, *and others*

EU	<i>European</i>
CFH	Fator de complemento H, <i>complement factor H</i>
FCB	Fator de complemento B
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular, <i>vascular endothelial growth factor</i>
FA	<i>Fluorescein angiography</i>
°C	Graus Celsius, <i>Celsius degrees</i>
G	Guanina, <i>guanine</i>
ICG	<i>Indocyanine green angiography</i>
indel	<i>Insertion/deletion polymorphism</i>
IC 95%	Intervalo de confiança 95%
MNVSR	Membrana neovascular sub-retiniana
MC	<i>Microglial cell</i>
µL	Microlitro, <i>microliter</i>
µm	Micrômetro, <i>micrometer</i>
mL	Mililitro
min	Minuto, <i>minute</i>
ng	Nanograma, <i>nanogram</i>
95% CI	<i>95% confidence interval</i>
OR	<i>Odds ratio</i>
OCT	Optical coherence tomography

%	Por cento, <i>per cent</i>
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real, <i>real-time polymerase chain reaction</i>
RCA	<i>Regulation of complement activation</i>
RPE	<i>Retinal pigment epithelium</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
s	Segundo, <i>second</i>
FAM	6-carboxifluoresceína
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
CARMS	Sistema de estadiamento clínico da maculopatia relacionada à idade, <i>clinical age-related maculopathy staging</i>
SDS	Sódio dodecil sulfato 10%
TKM1	Solução tampão para extração de DNA
TKM2	Solução tampão para extração de DNA
T	Timina, <i>thymine</i>
TE	Tris EDTA
Tris	Tris(hidróximetil)aminometano
C>T	Troca de uma citosina por uma timina, <i>replacement of a cytosine for a thymine</i>
G>T	Troca de uma guanina por uma timina, <i>replacement of a guanine for a thymine</i>

- T>C** Troca de uma timina por uma citosina, *replacement of a thymine for a cytosine*
- Y** *Tyrosine*
- USA** *United Staes of America*
- UFMG** Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO DE LITERATURA	25
Artigo 1 – The role of molecular genetic factors in age-related macular degeneration	26
Abstract	26
Introduction	26
Conclusion	29
Resumo	30
References	30
3 OBJETIVOS	32
4 MÉTODOS	33
4.1 Pacientes	33
4.2 Método laboratorial	35
4.2.1 <i>Coleta do material</i>	35
4.2.2 <i>Extração do DNA</i>	36
4.2.3 <i>Reação em cadeia da polimerase em tempo real (Real-time polymerase chain reaction – RT-PCR)</i>	37
4.2.4 <i>Leitura e análise da placa de RT-PCR</i>	38
4.3 Análise estatística	39
5 RESULTADOS	41
5.1 Artigo 2 – Association analysis of <i>CFH</i> and <i>LOC387715</i> gene polymorphisms in a Brazilian cohort with age-related macular degeneration	42
Abstract	43
Introduction	44

Patients and Methods	45
Results	47
Discussion	51
References	57
5.2 Artigo 3 – Homozygosity for the +674C>T polymorphism on VEGF gene is associated with age-related macular degeneration in a Brazilian cohort	64
Abstract	64
Introduction	64
Materials and methods	65
Results	66
Discussion	67
References	67
5.3 Resultados adicionais	69
6 DISCUSSÃO	70
7 CONCLUSÕES	73
REFERÊNCIAS	74
APÊNDICES	78
Apêndice 1 – Termo de consentimento livre e esclarecido – Grupo DMRI	79
Apêndice 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido – Grupo controle	82
Apêndice 3 – Ficha de atendimento – Grupo DMRI	85
Apêndice 4 – Ficha de atendimento – Grupo controle	89
ANEXOS	91
Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)	92

Anexo 2 – Parecer do Comitê de Ética Médica Interno do Instituto da Visão	94
Anexo 3 – Parecer do Comitê de Ética do Centro Especializado em Olhos	95
Anexo 4 – Protocolo de extração de DNA	96
Anexo 5 – Protocolo de quantificação de DNA	99
Anexo 6 – Normas para publicação de artigos no periódico Ophthalmic Epidemiology	102
Anexo 7 – Confirmação da resubmissão do Artigo 2 ao periódico Ophthalmic Epidemiology	103

1 INTRODUÇÃO

A degeneração macular relacionada à idade (DMRI) é uma alteração coriorretiniana progressiva que acomete principalmente a região macular, causando importante baixa de acuidade visual e perda acentuada do campo visual central (BRESSIER et al., 2006; NEHEMY, 2006; SEDDON; CHEN, 2006).

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 (IBGE, 2010). Segundo a Organização Mundial de Saúde, a DMRI é a principal causa de cegueira em países desenvolvidos e a terceira causa no restante do mundo, sendo responsável por 5% dos casos de cegueira no Brasil (RESNIKOFF et al., 2002).

A DMRI pode ser classificada em dois tipos: seca ou atrófica e úmida ou exsudativa. A forma seca corresponde a aproximadamente 85% dos casos e é caracterizada pela presença de drusas (depósitos amarelados sub-retinianos) e/ou irregularidades (hiper ou hipopigmentação) do epitélio pigmentado da retina (EPR). Ocorre uma lesão coriorretiniana progressiva com atrofia secundária dos fotorreceptores (atrofia geográfica) e gradativa perda da visão e do campo visual central (BRESSIER et al., 2006; NEHEMY, 2006; SEDDON; CHEN, 2006). A DMRI exsudativa é uma forma avançada da doença. Acomete 15% dos pacientes e é caracterizada pelo aparecimento de uma membrana neovascular sub-retiniana (MNVSR) (SEDDON; CHEN, 2006). Extravasamento de soro e/ou sangue surgem

no local em decorrência de alterações estruturais da própria membrana e dos tecidos adjacentes a ela, ocasionando perda irreversível dos fotorreceptores e consequente baixa acuidade visual (BRESSIER et al., 2006; NEHEMY, 2006; SEDDON; CHEN, 2006).

Várias teorias foram descritas para explicar o mecanismo fisiopatogênico da DMRI, incluindo: peroxidação lipídica, processos inflamatórios e alteração no sistema imune (HADDAD et al., 2006; SEDDON; CHEN, 2006). Estudos epidemiológicos têm sido realizados com o intuito de identificar os fatores de risco relacionados à doença (CLEMONS et al., 2005; DeANGELIS et al., 2007). O tabagismo e a obesidade são os principais fatores demonstrados (DeANGELIS et al., 2007; SCHAUMBERG et al., 2007), assim como indivíduos de cor branca (VANDERBEEK et al., 2011), idade avançada (SEDDON; CHEN, 2006) e fatores dietéticos (AGE-RELATED EYE DISEASE STUDY RESEARCH GROUP, 2000). Além de fatores ambientais, existe forte evidência de que alterações genéticas desempenham importante papel no desenvolvimento da DMRI. Estudos apontam vários genes, principalmente dos cromossomos 1q e 10q, associados à doença (HADDAD et al., 2006; LI et al., 2006; SCHAUMBERG et al., 2007). A grande maioria dos trabalhos demonstra que indivíduos portadores de polimorfismos nos genes fator de complemento H (*CFH*) e *LOC387715/ARMS2* possuem risco aumentado de apresentar DMRI (DeANGELIS et al., 2007; MALLER et al., 2006; SCHAUMBERG et al., 2007), especialmente quando essas alterações estão associadas a tabagismo e/ou obesidade (SCHAUMBERG et al., 2007).

Outros polimorfismos genéticos têm sido associados à DMRI, como nos genes: fator de crescimento do endotélio vascular (*VEGF*) (CHURCHIL et al., 2006; JANIK-PAPIS et al., 2009; YU et al., 2011), gene da lipase hepática (SEDDON;

REYNOLDS; ROSNER, 2010), fator de complemento B (*FCB*) (SPENCER et al., 2007), componente do complemento 2 (*C2*) (GOLD et al., 2006) e *CX3CR1* (TUO et al., 2004). Em alguns desses genes, como o da lipase hepática (SEDDON; REYNOLDS; ROSNER, 2010), os polimorfismos são protetores, conferindo menor risco de desenvolver a doença.

Nesta pesquisa, objetivou-se investigar a associação entre a DMRI e os polimorfismos nos genes *CFH* e *LOC387715/ARMS2*, pela relevância epidemiológica destes genes em outras populações, conforme sugerido pela literatura. Também se decidiu pela avaliação da eventual associação de polimorfismo genético do *VEGF*, em decorrência da importância clínica e terapêutica da proteína codificada por este gene, fato ainda controverso na literatura.

Esta tese é apresentada no formato de artigos científicos que se originaram desta pesquisa. Inicialmente, procurou-se fazer uma ampla revisão da literatura, com a finalidade de identificar criticamente os polimorfismos genéticos com maior potencial de associação com a DMRI. O produto dessa análise resultou no artigo de revisão de literatura, intitulado *The role of molecular genetic factors in age-related macular degeneration*, publicado no periódico *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*. Os resultados da pesquisa e as partes essenciais da metodologia empregada são apresentados em outros dois artigos, intitulados *Association analysis of CFH and LOC387715 gene polymorphisms in a Brazilian cohort with age-related macular degeneration*, resubmetido para publicação no periódico *Ophthalmic Epidemiology*, e *Homozygosity for the +674C>T polymorphism on VEGF gene is associated with age-related macular degeneration in a Brazilian cohort*, publicado no periódico *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. Visando uma melhor explanação da metodologia, que naturalmente não caberia em um único artigo

científico, decidiu-se incluir nesta tese uma seção de “Métodos”, em que ela é mais bem detalhada. Incluiu-se, finalmente, uma seção de “Discussão”, com a finalidade de encadear os diferentes aspectos da pesquisa, bem como a sua conclusão e possíveis desdobramentos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Como mencionado anteriormente, a revisão de literatura é apresentada por meio da transcrição do Artigo 1, intitulado *The role of molecular genetic factors in age-related macular degeneration*, publicado no periódico Arquivos Brasileiros de Oftalmologia.

The role of molecular genetic factors in age-related macular degeneration

A importância dos fatores genéticos na degeneração macular relacionada à idade

Luciana Negrão Frota de Almeida¹
 Rachel Melilo Carolino²
 Diogo Cazelli Sperandio³
 Márcio Bittar Nehemy⁴
 De Marco LA⁵

ABSTRACT

Age-related macular degeneration (AMD) is the most frequent cause of irreversible blindness in the elderly in developed countries. Although the etiology of AMD remains largely unknown, numerous studies have suggested that both genes and environmental risk factors significantly influence the risk of developing AMD. Recently, single nucleotide polymorphisms, DNA sequence variations found within the complement factor H (*CFH*) gene, have been found to be strongly associated with the development of AMD. Several other genes have had at least one positive association finding and deserve further exploration. The purpose of this review is to provide an extensive report of the current data of AMD genetics and the contribution of this knowledge helps to the better understanding of its pathophysiology.

Keywords: Macular degeneration/etiology; Age effect; Complement factor H/genetics; Base sequence; Polymorphism, single nucleotide; Inflammation

INTRODUCTION

Age-related macular degeneration (AMD) is a complex degenerative disorder that primarily affects the elderly⁽¹⁾. Disease susceptibility is influenced by multiple genetic and environmental factors⁽¹⁻²⁾. Despite of success in identifying some genetic basis of sub-groups of AMD, investigators continue to struggle to identify other genes that predispose to, or cause the majority of this disorder⁽³⁻²⁵⁾.

Genetically, the condition is somewhat difficult to study because of its clinical variability and late onset, and also because AMD is a complex genetic disorder. In contrast to a classic Mendelian disease, in which one copy of an altered gene (autosomal dominant inheritance) or two copies of altered genes (autosomal recessive inheritance) are necessary and sufficient to cause a disease phenotype, in complex genetic or polygenic disorders, there can be genetic heterogeneity and variants interactions from multiple genes. In addition, genetic variants may interact with behavioral and environmental factors that contribute to enhance the disease risk, challenging the classic concept of causality that has dominated genetic research of rare disorders.

However, recent studies have identified a number of chromosomal regions harboring potential AMD genes using massive genome screening and complex statistical analysis⁽³⁻⁵⁾. Candidate genes are selected based on either known characteristics of a gene (e.g., mutation predisposing to a trait) or physiologic association (e.g., genes' role in modulation of complement activation). Once a gene is selected, it is amplified and then analyzed for the presence of polymorphisms (variants of the gene). The candidate gene is then compared with genes of a population of affected patients and controls to see if a true association exists.

Trabalho realizado no Hospital São Geraldo e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Medicina Molecular, Laboratório de Genética Molecular, Faculdade de Medicina - UFMG - Belo Horizonte (MG) - Brazil.

¹ Pós-graduanda (Doutorado) em Cirurgia e Oftalmologia da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG - Belo Horizonte (MG) - Brazil.

² Acadêmica, Aluna de Iniciação Científica do Laboratório de Farmacologia Bioquímica e Molecular da UFMG - Belo Horizonte (MG) - Brazil.

³ Residente em Oftalmologia do Hospital São Geraldo da UFMG - Belo Horizonte (MG) - Brazil.

⁴ Professor Adjunto e Chefe do Serviço de Retina e Vitreo do Hospital São Geraldo da UFMG - Belo Horizonte (MG) - Brazil.

⁵ Professor Titular e Coordenador do Programa de Pós-graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular da UFMG - Belo Horizonte (MG) - Brazil.

Address for correspondence: Luciana Almeida. Av. Conselheiro Furtado, 2.818 - Belém (PA)
 CEP 66063-060

E-mail: luciananf Almeida@gmail.com

Recebido para publicação em 18.02.2008

Última versão recebida em 02.02.2009

Aprovação em 03.03.2009

The purpose of this review is to provide a report of the current data of AMD genetics and the contribution of this knowledge helps to understand better its pathophysiology.

Genetic overview

Before discussing the recent discoveries regarding the genes that have been associated with AMD, it is important to consider some genetic definitions and nomenclature that are not too familiar for many ophthalmologists but are extremely important to enhance the understanding of this issue.

Deoxyribonucleic acid (DNA) is a long polymer of simple units called nucleotides made of sugars and phosphate groups joined by ester bonds. Attached to each sugar is one of four types of molecules called bases - A (adenine), C (cytosine), G (guanine), and T (thymidine). It is the sequence of these four bases along the polymer that encodes information. Sequence variation could lead to a *mutation*, which means "change" in some disciplines and "disease-causing change" in others; or *polymorphism*, which means "non-disease-causing change" or "change found at a frequency of 1% or higher in the population"⁽²⁶⁾.

A polymorphism can be found at the encoding gene sequence called *exons*, or at the non-coding region known as *introns* and could occur as substitutions, deletions, duplications or insertions of a base pair⁽²⁶⁻²⁷⁾. The most common sequence variation related to AMD is the substitution of one base pair at codon 1277 of *CFH* gene⁽⁹⁻¹⁴⁾. This type of molecular alteration is known as *single nucleotide polymorphism* (SNP), and is designated by a ">" character, e.g., 1277T > C or T1277C denoting that at nucleotide 1277 an T is changed to a C^(9-14,26). Being a non-synonymous SNP (produces a different polypeptide sequence) the change can also be designated as Y402H denoting that amino acid 402 Tyrosine (Y) is changed to a Histidine (H)^(9-14,26). All SNPs are cataloged in a public SNP database with a specific identification, for example T1277C at rs1061170⁽⁹⁻¹⁴⁾.

The polymorphism can occur in a *splice junction site*, the DNA region that marks the boundaries between introns and exons. Sequence variation at this site can result in exon skipping or alteration of *splicing* (the removal of introns from heteronuclear RNA and joining of exons to form the mature messenger RNA)⁽²⁷⁾. Occasionally polymorphisms can happen close to each other, organized as a block that are transmitted together in *haplotypes* (the combination of linked alleles for a given region of DNA on a single chromosome)⁽²⁷⁾.

Molecular genetics of AMD

Over the past decade, researchers have begun to focus their attention on determining the genetic components of AMD (Table 1). Identification of underlying genes has been difficult, with both genomic screen (positional) and candidate gene (functional) approaches being used. Although numerous regions of interest have been identified by these genome screens, only two regions, located on chromosomes 1 and 10, have been consistently identified by the majority of studies⁽⁴⁻¹⁷⁾.

CFH (complement factor H) gene

The first dramatic success of association studies for ARM was the discovery of a variant in the complement factor H (CFH) gene located in the regulation of complement (RCA) locus in chromosome 1q31.3^(4,5-9). This gene encodes the CFH protein which is a major inhibitor of the complement system. It directly inhibits both classical and alternate complement pathways, therefore the absence of factor H or its low activity can lead to unchecked complement activation, serving as the inflammatory stimulus for drusen formation⁽²⁾. Furthermore, environmental risk factors associated with AMD, such as smoking, are also known to decrease CFH levels in serum⁽²⁾.

Recent reports have shown that a common polymorphism in exon 9 of the *CFH* gene (T1277C at rs1061170, or Y402H, a tyrosine to histidine change at position 402) is associated with macular soft drusen as well as an increased risk of advanced AMD, including geographic atrophy and neovascular AMD⁽⁹⁻¹³⁾. These findings suggest that the C allele, or disease allele, contributes to almost half of all AMD cases (50 - 57.3%). The odds ratios for development of AMD in patients with the Y402H SNP ranged from 2.45 to 7.4⁽⁴⁻⁹⁾ with higher risks seen in homozygous CC subjects⁽¹³⁾.

Interactions with modifiable risk factors and this specific *CFH* polymorphism were investigated^(5,8,14). The authors concluded that obesity and cigarette smoking multiplied the risks associated with these variants. It's estimated that there is a 4-fold increased risk among participants homozygous for *CFH* Y402H who are not obese compared with nonobese heterozygous subjects, whereas the risk is 12-fold higher among homozygous subjects who were also obese⁽⁹⁾. Smokers of 10 pack-years or more who also have the CC genotype have approximately a 144-fold increase in disease risk compared with individuals who smoke fewer than 10 pack-years and have the CT or TT genotype⁽⁵⁾. Although it was demonstrated that these two risk factors are independent of each other, they may work through similar mechanisms to increase the risk of neovascular AMD⁽¹⁴⁾. These studies suggested that each of these factors may independently increase risk of neovascular AMD through similar mechanisms thus providing the possibility that one could potentially lessen a significant component of AMD risk by behavioral modifications^(5,8,14).

In addition to Y402H, two other coding-region non-synonymous SNPs (I62V in exon 2 and D936E in exon 19) have also been described⁽¹⁰⁾. These SNPs, as the Y402H, might affect the protein function through variability in expression levels, binding efficiencies, and/or other properties⁽¹⁰⁾.

Several additional intronic SNPs were also related to AMD. A common variant in intron 2 splice acceptor site, IVS2-18insTT, was detected⁽¹⁰⁾. Moreover, a recent publication demonstrated a previously unreported intronic SNP (rs1410996) that unexpectedly showed strong association with AMD⁽⁹⁾.

Some authors suggested that no single polymorphism could account for the contribution of the *CFH* locus to disease susceptibility. Instead, multiple polymorphisms defined a set of four common haplotypes (of which two were associated with

Table 1. A summary of associations between AMD and genetic variants

Gene	SNP / polymorphism / allele	Odds ratio	References
<i>CFH</i>	rs1061170 / T1277C	2.45 to 7.4	2, 4, 5-11, 13, 14
<i>LOC387715</i>	rs10490924 / A69S	2.5 to 7.3	7, 8, 15-17
<i>CFB / C2</i>	L9H / E318D	protective	18, 19
<i>VEGF</i>	rs1413711 / +674 CC	-	20-23
<i>APOE</i>	ε 4 / ε 2	0.60 (protective) / 1.33	24, 25, 28-31
<i>CX3CR1</i>	V249I and T280M	-	32-36

disease susceptibility and two seemed to be protective) and multiple rare haplotypes (associated with increased susceptibility in aggregate) and that noncoding *CFH* variants may play a role in disease susceptibility⁽⁴⁾. It has also been suggested that not only two, but four haplotypes of the *CFH* gene are protective (H2, H3, H4, and H5) with the homozygous H2/H2 individual having the greatest protective effect (odds ratio, 0.27; 95% confidence interval, 0.1-0.74). Haplotype analysis shows that the most frequent at-risk haplotype is present in half of individuals with AMD, compared with 29% of controls⁽¹⁰⁾.

Most of the AMD-associated *CFH* SNPs lie within important functional domains of the encoded protein. These domains contain binding sites for C3b, heparin, sialic acid, and C-reactive protein. Thus, these SNPs might affect *CFH* function through variability in expression levels, binding efficiencies, and/or other properties. For example, the exon 2 I62V variant is located in specific domain, which includes a C3b binding site, and the exon 9Y402H variant lies within a domain which binds heparin. It remains to be established how alterations in these regions might impact the function of the *CFH* protein. However, the absence of factor H or low activity can lead to unchecked complement activation, serving as the inflammatory stimulus for drusen formation⁽¹⁰⁾.

CFH has closely related genes *CFHR3*, *CFHR1*, *CFHR4*, *CFHR2* and *CFHR5*, which are arranged in tandem on chromosome 1q23. Deletions of *CFHR1* and *CFHR3* have been associated with decreased risk for AMD, possibly because the products of both genes, when present in the circulation have the potential to compete with *CFH* for C3 binding⁽¹¹⁾.

LOC387715 gene

A second putative AMD susceptibility gene, located on chromosome 10q26, *LOC387715* (T allele at rs10490924, or A69S), has recently been identified⁽⁷⁻⁸⁾. Its function is unknown, although at least one gene in close proximity to *LOC387715*, *PLEKHA1*, is known to be involved in cellular immunity. Some authors reported an odds ratio of 5 and a population attributable risk of 57% for the *PLEKHA1/LOC387715* locus⁽¹⁵⁻¹⁶⁾.

The risk allele for *LOC387715* confers an OR of 2.5 (95% CI, 2.2- 2.9) and 7.3 (95% CI, 5.7-9.4) for the heterozygous and homozygous states, respectively⁽¹³⁾. Some studies suggest that individuals with AMD possessing one or more risk alleles at *LOC387715* are more likely to develop neovascular AMD compared with those with AMD who lack this variant⁽⁷⁾. In

addition, smokers with this variant have a 22-fold higher risk for advanced AMD, especially the neovascular form, compared with nonsmokers with this variant^(8,17).

For patients homozygous for both risk variants, Y406H SNP and A69S SNP, the odds ratio for development of AMD was 57.58 (95% CI, 37.24-89), and they might be at greater risk for earlier onset of neovascular AMD.⁷ When smoking is introduced into the equation, it is estimated that *CFH*, *LOC387715*, and smoking explain 61% of the attributable risk for AMD⁽¹⁷⁾. Controlling for each of the other two variables, the approximate population-adjusted risk for AMD and smoking is 20%, for AMD and A69S is 36%, and for Y402H is 43%⁽¹⁷⁾.

Interestingly, a study aimed to determine whether modifiable risk factors act synergistically with *LOC387715* to alter the risk of AMD suggested that regular acetyl salicylic acid use may reduce the risk conferred by homozygosity for *LOC387715* A69S, and concluded that this variant appear to act synergistically with modifiable risk factors⁽⁸⁾.

Complement factor B (CFB) and complement component 2 (C2) genes

Complement factor B (CFB) aids initiation of the alternative complement cascade, and complement component 2 (C2) activates the classical component pathway. CC2 is paralogous to CFB and resides adjacent to *CFB* on chromosome 6⁽¹⁸⁾. In addition, they are expressed in the neural retina, retinal pigment epithelium (RPE) and choroid⁽¹⁹⁾. The *CFB* R32Q SNP and the haplotype containing the *C2* E318D/*CFB* L9H pair were significantly protective for AMD⁽¹⁸⁻¹⁹⁾. After adjusting for age, Y402H, A69S and smoking, the effect of *CFB* R32Q remained quite strong⁽¹⁹⁾ extending and refining the role of the alternative complement pathway in the pathophysiology of AMD and further strengthening the proposed model that inflammation has an important role in this ocular disease.

VEGF (vascular endothelial growth factor) gene

The vascular endothelial growth factor (*VEGF*) gene encodes the VEGF protein, a major player in the control of angiogenesis^(1,20-22). VEGF-A contains nine exons and is alternatively spliced to produce isoforms of differing lengths, 189, 165 and 121 amino acids. The most predominant isoform in the eye is the VEGF 165 which is further spliced into an 'a' or 'b' isoforms, the difference being the presence at the C-terminus of either exon 8 or exon 9, respectively. VEGF 165a has potent angiogenic

properties, whereas VEGF165b has anti-angiogenic properties⁽²⁰⁾. What controls splicing is still largely unknown but the balance between these two isoforms is vital in maintaining vascular homeostasis.

Increased levels of VEGF in surgically removed neovascular membranes from eyes with neovascular AMD have been demonstrated⁽²³⁾. And it has been suggested that the presence of polymorphic sequences within the promoter or 5'-untranslated region of the *VEGF* gene can influence levels of VEGF protein expression⁽²¹⁾. Churchill et al.⁽²⁰⁾ showed that a specific haplotype in this region is significantly associated with AMD (OR=18.24, 95% CI 2.25-148.25, corrected P=0.0074).

Some studies found that the CC genotype at +674 was significantly associated with the AMD group, whereas the presence of the T allele was significantly associated with the control group^(20,21). These data support the hypothesis that the +674 CC genotype is a potential risk factor for AMD, and that carriage of the T allele is potentially protective^(20,21).

In summary, the molecular studies associated with the functional role in vascular growth and regeneration^(20,23), strongly implicates the *VEGF* gene in the etiology of neovascular AMD.

APOE (apolipoprotein E) gene

Apolipoprotein E (APOE) is a protein that plays a central part in plasma metabolism of lipids, in central nervous system lipid homeostasis⁽²⁴⁾ and in response to neuronal injury⁽²⁵⁾. It has been shown to be expressed in the RPE layer in mouse embryos, suggesting a role of this protein in retinal diseases⁽²⁸⁾. Three common alleles, $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ and $\epsilon 4$ encode the three protein isoforms E2, E3 and E4, respectively. Although some authors showed no association with AMD⁽²⁹⁾ some studies reported a reduction in the frequency of the $\epsilon 4$ allele in patients with AMD, including geographic atrophy and neovascular form⁽³⁰⁾, compared to controls, suggesting its protective effect^(5,23,31). In addition, $\epsilon 2$ allele frequency was increased in AMD patients compared to controls, suggesting a modest increase in disease risk with this allele⁽³¹⁾.

APOE4 lacks cysteine residues at position 112 and 158, which prevents the formation of disulfide bridges with APOAII or other peptide components⁽²⁴⁾. Therefore, the inability of APOE4 to form dimers compared with APOE2 and APOE3, would favour easier transport of lipids through Bruch membrane because of a smaller size of lipid particles, allowing a better elimination and preventing of drusen formation^(24,25).

CX3CR1 gene

Chemokines are small proteins that induce directed chemotaxis in nearby responsive immune cells⁽³²⁾. CX3C chemokine receptor 1 (*CX3CR1*) is expressed in microglial cells (MCs), the resident macrophages in the central neural system (CNS), and in the photoreceptor retinal layer⁽³³⁻³⁴⁾. This receptor mediates migration and adhesion of these cells in response to CX3C chemokine ligand 1 (*CX3CL1*)⁽³²⁾. It has been demonstrated that all retinal MCs express CX3C chemokine receptor 1 (*CX3CR1*)⁽³²⁾ and that two polymorphisms in the *CX3CR1*

gene, V249I and T280M, which are associated with impaired subretinal cell migration, increase the risk of AMD^(32,34).

Microglial cells participate in AMD development and progression by controlling retinal MC redistribution⁽³²⁾ and increasing macrophage recruitment, which has previously been shown to contribute in drusen genesis and CNV development⁽³⁴⁾. However, in animal models it has been demonstrated that decreased macrophage recruitment increases choroidal neovascularization⁽³⁵⁾. These findings suggest that macrophage recruitment into the subretinal space is necessary to remove extracellular deposits and prevent the formation of drusen. These two controversy concepts could be explained by the fact that macrophages can have many different and even opposite functions depending on their activation state⁽³⁵⁾.

Decreased expression of CX3CR1 results in macrophages with a proinflammatory phenotype compared with macrophages with high levels of CX3CR1, which have an antiinflammatory phenotype⁽³⁶⁾. It is rational to consider that the accumulation in the subretinal space of resident microglia with reduced CX3CR1 function might therefore contribute to inflammation, leading to the recruitment of other inflammatory cells, which sequentially stimulate choroidal neovascularization and AMD.

ABCR gene

The presence of phenotypic similarities between Stargardt disease and AMD lead to multiple association studies between the gene responsible for the majority of cases of Stargardt disease, the *ABCR* gene and AMD. Some of these studies have indicated an association of AMD with certain non-synonymous SNP in *ABCR* gene, notably D2177N and G1961E⁽³⁷⁾. However, this association has not been confirmed by other investigators⁽³⁸⁾. To date, the *ABCR* variants do not seem to make a major contribution to AMD susceptibility.

Other genes

Studies that examined genes related to retinal dystrophy, such as *ELOVL4* (Stargardt disease)⁽⁵⁾, bestrophin (Best disease)^(3,37), failed to firmly establish an association with AMD. In addition, some studies have suggested a role of *VLDLR*⁽³⁾, *LRP6*⁽³⁾ and *HEMICENTIN-1*⁽³⁹⁾ genes in AMD pathophysiology. However, further studies are needed to ascertain their impact on disease susceptibility⁽⁴⁰⁾.

CONCLUSION

Analysis of genetic susceptibility and potential interactions between variants and environmental factors (such as smoking and nutrition) seem to be essential to elucidate mechanisms of disease pathology. Association studies have provided valuable insights to demonstrate genetic differences that influence susceptibility to AMD.

A better understanding of the essential molecular mechanisms of diseases will allow us to define the relationship between the different AMD phenotypes expressed in patients.

In turn, this will guide us to more accurate definitions and classification systems for AMD, leading to the development of new and effective therapies that are specific for each subtype of AMD. In addition, new preventive treatments will likely be developed using current information about the pathogenesis of the disease.

RESUMO

A degeneração macular relacionada à idade (DMRI) é a causa mais frequente de cegueira irreversível em idosos em países desenvolvidos. Apesar da etiologia da DMRI ainda permanecer desconhecida, numerosos estudos tem sugerido que tanto fatores genéticos quanto ambientais influenciam significativamente no risco do desenvolvimento da doença. Recentemente, polimorfismos de base única, variações na sequência de DNA encontradas no gene fator H do complemento (CFH), tem sido fortemente associado com o desenvolvimento da DMRI. Muitos outros genes tiveram ao menos um resultado positivo para esta associação e merecem estudos posteriores. O objetivo dessa revisão é proporcionar descrição atual dos dados publicados.

Descritores: Degeneração macular/etiologia; Fator idade; Fator do complemento H/genética; Sequência de bases; Polimorfismo de um único nucleotídeo; Inflamação

REFERENCES

- Seddon JM, Chen CA. Epidemiology of age-related macular degeneration. In: Ryan SJ, editor. *Retina*. 4th ed. St. Louis: Mosby; 2006. p.1017-25.
- 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.
- 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.
- Li M, Atmaca-Sonmez P, Othman M, Branham KE, Khanna R, Wade MS, et al. CFH haplotypes without the Y402H coding variant show strong association with susceptibility to age-related macular degeneration. *Nat Genet*. 2006;38(9): 1049-54.
- DeAngelis MM, Ji F, Kim IK, Adams S, Capone A Jr, Ott J, et al. Cigarette smoking, CFH, APOE, ELOVL4, and risk of neovascular age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol*. 2007;125(1):49-54.
- 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.
- 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.
- 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.
- Maller J, George S, Purcell S, Fagerness J, Altshuler D, Daly MJ, Seddon JM. Common variation in three genes, including a noncoding variant in CFH, strongly influences risk of age-related macular degeneration. *Nat Genet*. 2006;38(9): 1055-9.
- Hageman GS, Anderson DH, Johnson LV, Hancox LS, Taiber AJ, Hardisty LI, et al. A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(20):7227-32. Comment in: *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(20):7053-4.
- Hughes AE, Orr N, Esfandiary H, Diaz-Torres M, Goodship T, Chakravarthy U. A common CFH haplotype, with deletion of CFHR1 and CFHR3, is associated with lower risk of age-related macular degeneration. *Nat Genet*. 2006; 38(10):1173-7. Erratum in: *Nat Genet*. 2007;39(4):567.
- 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.
- 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 Hum Genet*. 2005;77(1):149-53.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Spencer KL, Hauser MA, Olson LM, Schmidt S, Scott WK, Gallins P, et al. Protective effect of complement factor B and complement component 2 variants in age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet*. 2007;16(16):1986-92.
- Gold B, Merriam JE, Zernant J, Hancox LS, Taiber AJ, Gehrs K, Cramer K, Neel J, Bergeron J, Barile GR, Smith RT; AMD Genetics Clinical Study Group, Hageman GS, Dean M, Allikmets R. Variation in factor B (BF) and complement component 2 (C2) genes is associated with age-related macular degeneration. *Nat Genet*. 2006;38(4):458-62.
- 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.
- 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.
- Eyeteck Study Group. Anti-vascular endothelial growth factor therapy for subfoveal choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration: phase II study results. *Ophthalmology*. 2003;110(5):979-86. Comment on: *Ophthalmology*. 2003;110(5):879-81.
- Reddy VM, Zamora RL, Kaplan HJ. Distribution of growth factors in subfoveal neovascular membranes in age-related macular degeneration and presumed ocular histoplasmosis syndrome. *Am J Ophthalmol*. 1995;120(3):291-301.
- Souied EH, Benlian P, Amouyel P, Feingold J, Lagarde JP, Munnich A, et al. The epsilon4 allele of the apolipoprotein E gene as a potential protective factor for exudative age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol*. 1998; 125(3):353-9.
- Swaroop A, Branham KE, Chen W, Abecasis G. Genetic susceptibility to age-related macular degeneration: a paradigm for dissecting complex disease traits. *Hum Mol Genet*. 2007;16 Spec No. 2:R174-82.
- den Dunnen JT, Antonarakis SE. Nomenclature for the description of human sequence variations. *Hum Genet*. 2001;109(1):121-4.
- Wiggs JL, Nemesure B. Glossary of genetic terms. *Arch Ophthalmol*. 2007; 125:E1-E7.
- Lorent K, Overbergh L, Moechars D, De Strooper B, Van Leuven F, Van den Berghe H. Expression in mouse embryos and in adult mouse brain of three members of the amyloid precursor protein family, of the alpha-2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein and of its ligands apolipoprotein E, lipoprotein lipase, alpha-2-macroglobulin and the 40,000 molecular weight receptor-associated protein. *Neuroscience*. 1995;65(4):1009-25.
- Conley YP, Thalamuthu A, Jakobsdottir J, Weeks DE, Mah T, Ferrell RE, Gorin MB. Candidate gene analysis suggests a role for fatty acid biosynthesis and regulation of the complement system in the etiology of age-related maculopathy. *Hum Mol Genet*. 2005;14(14):1991-2002.
- Baird PN, Guida E, Chu DT, Vu HT, Guymer RH. The epsilon2 and epsilon4 alleles of the apolipoprotein gene are associated with age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45(5):1311-5.
- Klaver CC, Kliffen M, van Duijn CM, Hofman A, Cruts M, Grobbee DE, et

572 *The role of molecular genetic factors in age-related macular degeneration*

- al. Genetic association of apolipoprotein E with age-related macular degeneration. *Am J Hum Genet.* 1998;63(1):200-6. Erratum in: *Am J Hum Genet.* 1998;63(4):1252.
32. Combadière C, Feumi C, Raoul W, Keller N, Rodéro M, Pézard A, et al. CX3CR1-dependent subretinal microglia cell accumulation is associated with cardinal features of age-related macular degeneration. *J Clin Invest.* 2007;117(10):2920-8. Comment in: *J Clin Invest.* 2007;117(10):2758-62.
33. Cardona AE, Pioro EP, Sasse ME, Kostenko V, Cardona SM, Dijkstra IM, et al. Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nat Neurosci.* 2006;9(7):917-24. Comment in: *Nat Neurosci.* 2006;9(7):859-61.
34. Tuo J, Smith BC, Bojanowski CM, Meleth AD, Gery I, Csaky KG, et al. The involvement of sequence variation and expression of CX3CR1 in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *FASEB J.* 2004;18(11):1297-9.
35. Ambati J, Anand A, Fernandez S, Sakurai E, Lynn BC, Kuziel WA, et al. An animal model of age-related macular degeneration in senescent Ccl-2- or Ccr-2-deficient mice. *Nat Med.* 2003;9(11):1390-7. Comment in: *Nat Med.* 2003;9(11):1350-1. *Nat Med.* 2004;10(7):663; author reply 663.
36. Arnold L, Henry A, Poron F, Baba-Amer Y, van Rooijen N, Plonquet A, et al. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into anti-inflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med.* 2007;204(5):1057-69.
37. Allikmets R, Shroyer NF, Singh N, Seddon JM, Lewis RA, Bernstein PS, et al. Mutation of the Stargardt disease gene (ABCR) in age-related macular degeneration. *Science.* 1999;277(5333):1805-7. Comment in: *Science.* 1997;277(5333):1765-6. *Science.* 1998;279(5354):1107.
38. Stone EM, Webster AR, Vandenberg K, Streb LM, Hockey RR, Lotery AJ, Sheffield VC. Allelic variation in ABCR associated with Stargardt disease but not age-related macular degeneration. *Nat Genet.* 1998;20(4):328-9.
39. Schultz DW, Klein ML, Humpert AJ, Luzier CW, Persun V, Schain M, et al. Analysis of the ARMD1 locus: evidence that a mutation in HEMICENTIN-1 is associated with age-related macular degeneration in a large family. *Hum Mol Genet.* 2003;12(24):3315-23.
40. Farah ME, Oshima A, Costa RA, Sallum JF. Degeneração macular relacionada à idade: modalidades terapêuticas. *Arq Bras Oftalmol.* 2001;64(6):583-8.

3 OBJETIVOS

Esta tese teve como objetivo geral analisar, em uma amostra da população brasileira, a associação da DMRI com polimorfismos genéticos e avaliar possíveis correlações entre genótipo e fenótipo.

Para isso, delimitaram-se quatro objetivos específicos:

1. Investigar a associação entre a DMRI e o polimorfismo nos genes *CFH* (1227T>C -rs1061170) e *LOC387715/ARMS2* (205G>T - rs10490924);
2. Investigar a associação entre a DMRI e o polimorfismo no gene *VEGF* (+674C>T - rs1413711);
3. Analisar o efeito aditivo dos polimorfismos dos três genes estudados e a DMRI;
4. Analisar a eventual correlação entre os subtipos de DMRI – seca ou exsudativa – e os polimorfismos nos três genes estudados.

4 MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), de acordo com o Parecer nº ETIC 395/07, de 9 de novembro de 2007 (Anexo 1), pelo Comitê de Ética Médica Interno do Instituto da Visão, em 22 de outubro de 2007 (Anexo 2), e pelo Comitê de Ética do Centro Especializado em Olhos (Anexo 3).

4.1 Pacientes

O presente estudo envolveu 163 indivíduos portadores de DMRI seca e exsudativa, grupo DMRI, atendidos no Instituto da Visão, no período de 2008 a 2011, e 140 pacientes, grupo controle, atendidos no departamento de oftalmologia da UFMG e no Centro Especializado em Olhos, no mesmo período. Todos os participantes foram informados verbalmente e por escrito sobre a natureza e a finalidade do estudo e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido segundo a declaração de Helsinki (Apêndices 1 e 2).

Todos os sujeitos foram submetidos a um questionário criterioso sobre seus antecedentes pessoais e familiares, tanto sistêmicos como oftalmológicos, incluindo história atual ou pregressa de tabagismo, à mensuração de altura e de peso e a exame oftalmológico completo (Apêndices 3 e 4). Os sujeitos do grupo DMRI foram também submetidos à angiofluoresceinografia e à tomografia de coerência óptica.

Os portadores de DMRI tiveram ambos os olhos classificados de acordo com o sistema de estadiamento clínico da maculopatia relacionada à idade (CARMS), descrito e validado por Seddon, Sharma e Adelman (2006) (Tabela 1).

Tabela 1. Sistema de estadiamento clínico da maculopatia relacionada à idade.

Grau de maculopatia	Características clínicas
1	Ausência de drusas ou < 10 drusas pequenas na ausência de irregularidades no EPR
2	Aproximadamente ≥ 10 drusas pequenas, ou < 15 drusas intermediárias, ou presença de irregularidades no EPR associadas à DMRI a. Drusas b. Irregularidades no EPR (hiperpigmentação e hipopigmentação) c. Tanto drusas como irregularidades no EPR
3	Aproximadamente ≥ 15 drusas intermediárias ou qualquer drusa grande a. Ausência de descolamento drusenoide do EPR b. Presença de descolamento drusenoide do EPR
4	Atrofia geográfica com envolvimento do centro macular, ou atrofia geográfica não central com pelo menos 350 μm
5	DMRI exsudativa, incluindo descolamento não drusenoide do EPR, descolamento seroso ou hemorrágico da retina, MNVSR com hemorragias ou fibroses sub-retinais ou sub-EPR, ou cicatrizes consistentes com tratamento de DMRI a. Descolamento seroso do EPR, em ausência de MNVRS b. MNVSR ou cicatriz disciforme

EPR: epitélio pigmentado da retina; DMRI: degeneração macular relacionada à idade; MNVSR: membrana neovascular sub-retiniana.

Drusas pequenas: < 63 μm ; drusas intermediárias: $\geq 63 \mu\text{m}$ e < 125 μm ; drusas grandes: $\geq 125 \mu\text{m}$; descolamento drusenoide do EPR: drusas moles confluentes $\geq 500 \mu\text{m}$.

Fonte: Seddon, Sharma e Adelman (2006, p. 261, tradução nossa).

Foram incluídos na pesquisa, no grupo DMRI, apenas indivíduos que apresentavam, no olho mais acometido pela doença, estágios 3, 4 ou 5. Para efeitos deste trabalho, considerou-se que os pacientes com grau 3 apresentavam DMRI precoce e os pacientes com graus 4 ou 5 no olho mais acometido apresentavam DMRI avançada.

Foram incluídos no grupo controle, apenas indivíduos que não apresentavam sinais de DMRI em qualquer um dos olhos.

Foram excluídos os indivíduos com histórico de diabetes, câncer, doenças reumatológicas ou alguma evidência de doença macular, como miopia degenerativa, estrias angioides, descolamento de retina, retinopatias isquêmicas, inflamatórias ou infecciosas.

4.2 Método laboratorial

O estudo laboratorial foi mascarado, ou seja, cada material coletado recebeu um código sequencial para evitar que o pesquisador tivesse acesso à identificação de participantes de ambos os grupos.

4.2.1 Coleta do material

Amostras de sangue (10 mL) foram obtidas por punção venosa previamente ao exame angiofluoresceinográfico nos pacientes do grupo DMRI e após o exame oftalmológico dos participantes do grupo controle. O material foi imediatamente

armazenado em tubo estéril contendo ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) e mantido em temperatura ambiente.

4.2.2 Extração do DNA

A extração do DNA das amostras de sangue foi realizada empregando-se o método de Lahiri e Nurnberger Junior (1991), modificado por Cavalli e outros (1996) e Salazar e outros (1998), como segue: transferiu-se a amostra para um tubo tipo falcon; adicionou-se volume de solução tampão correspondente ao volume de sangue e 300 μL de Triton X-100. Centrifugou-se por 15 min a 4°C (1000 x g); em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o pellet foi mantido e irrigado com o mesmo volume de solução tampão utilizado anteriormente. Esse produto foi centrifugado por 10 min a 4°C (800 x g); o sobrenadante foi novamente desprezado e o pellet ressuspensado em 1600 μL de solução tampão e 100 μL de sódio dodecil sulfato 10% (SDS), usado para dissolução (lise) de leucócitos. Agitou-se vigorosamente o tubo e, utilizando o vortexador, fragmentou-se o pellet. O tubo foi incubado a 55°C em banho-maria por 10–20 min. Adicionaram-se 900 μL de NaCl e centrifugou-se o tubo por 15 min a 4°C (11000 x g). O sobrenadante foi transferido para um tubo tipo falcon contendo 5 mL de etanol absoluto para a coleta do DNA com a pipeta Pasteur, que foi posteriormente imergido em outro tubo tipo falcon com 300 μL de etanol 70%. Retirou-se a pipeta contendo o DNA e este foi ressuspensado em 500 μL de tris(hidróximetil)aminometano (Tris) EDTA (TE) e incubado durante dois dias a 55°C. A amostra de DNA foi, então, armazenada a 4°C. As amostras foram quantificadas por meio de espectrofotometria e, posteriormente, diluídas para uma concentração de 50 ng μL^{-1} .

4.2.3 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (Real-time polymerase chain reaction – RT-PCR)

A genotipagem foi realizada utilizando insumos *TaqMan*® *SNP Genotyping Assays* da Applied Biosystems (Foster City, CA, Estados Unidos).

As sondas utilizadas, exclusivas para cada polimorfismo – *rs1061170 (CFH)*, *rs10490924 (LOC387715)* e *rs1413711 (VEGF)*, foram encomendadas e construídas pela Applied Biosystems. 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 RT-PCR.

O protocolo empregado para a realização da RT-PCR foi o sugerido pelas instruções de uso do *TaqMan*® *Genotyping Master Mix*, como segue: 3,5 µL do tampão, 0,1 µL da sonda, 3,4 µL de água deionizada e 1,0 µL de DNA (50 ng µL⁻¹), formando um volume total de 8 µL.

O produto assim obtido foi, então, colocado no aparelho de RT-PCR, que consiste em um termociclador com leitor de fluorescência, para a realização da RT-PCR, leitura e análise dos polimorfismos utilizando o programa de discriminação alélica (*Stratagene Mx3005 – MxPro qPCR Software*, 2007). As condições para a realização da RT-PCR foram: um ciclo de 10 min a 95°C (para ativação enzimática), 50 ciclos de 15 s a 95°C (para desnaturação) e 60 s a 60°C (para hibridização ou anelamento e extensão).

Os polimorfismos foram escolhidos utilizando a base de dados do *Hapmap* (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para controle de qualidade de cada placa RT-

PCR, uma das amostras não continha DNA (amostra padrão) e 10% das amostras testadas foram retestadas na mesma placa.

4.2.4 Leitura e análise da placa de RT-PCR

Na análise, cada amostra é representada por um ponto em um gráfico com eixos de fluorescência, do seguinte modo: a amostra de um indivíduo homocigoto fica disposta perto dos eixos, enquanto a amostra de um indivíduo heterocigoto fica disposta entre os dois eixos, porquanto os dois fluoróforos estão presentes e a fluorescência é intermediária. Para o presente estudo, a leitura foi realizada por intermédio da determinação manual das amostras discriminadas no gráfico pela proximidade ao eixo de fluorescência, de acordo com a fluorescência de cada amostra (Figura 1). Quando não houve contaminação da placa, a amostra padrão (sem DNA) não apresentou fluorescência. As amostras com fluorescências duvidosas foram excluídas da análise. Os fluoróforos (6-carboxifluoresceína – FAM e hexacloro-6-carboxifluoresceína – HEX) de cada sonda indicam a presença de um alelo específico de cada polimorfismo predeterminado pelo fabricante, como segue:

a. Polimorfismo: *rs1061170 (CFH)*

FAM: Alelo T (alelo ancestral)

HEX: Alelo C (alelo de risco)

b. Polimorfismo: *rs10490924 (LOC387715)*

FAM: Alelo T (alelo de risco)

HEX: Alelo G (alelo ancestral)

c. Polimorfismo: *rs1413711* (*VEGF*)

FAM: Alelo C (alelo ancestral)

HEX: Alelo T (alelo de risco)

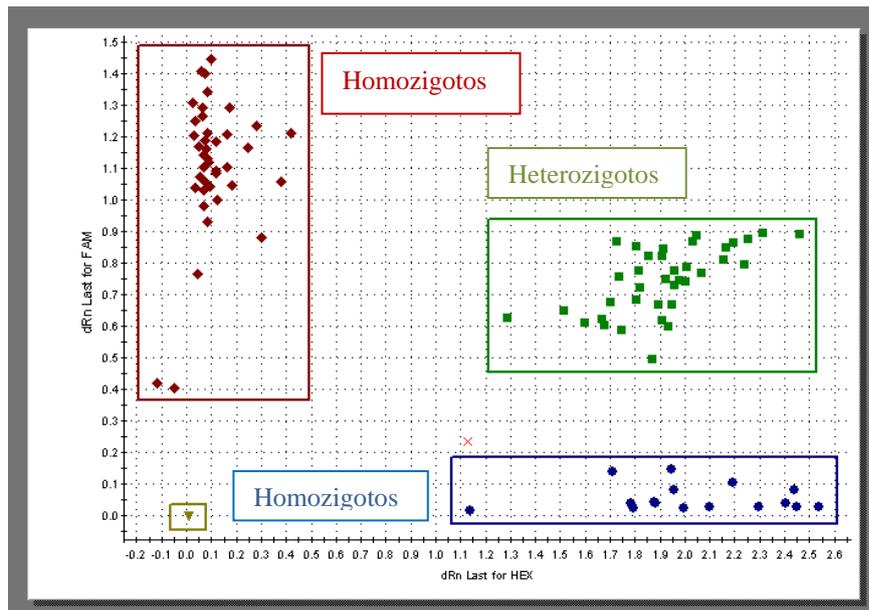


Figura 1. Resultado da leitura da RT-PCR com as amostras já selecionadas manualmente.

4.3 Análise estatística

As informações coletadas foram digitadas em um banco de dados desenvolvido no *Exce*®. Os resultados descritivos foram obtidos utilizando frequências e porcentagens para as características das diversas variáveis categóricas. Para as variáveis quantitativas, foram obtidas medidas de tendência central (média e mediana) e medidas de dispersão (desvio padrão – DP).

Na análise dos grupos isoladamente e na comparação entre os grupos, as covariáveis quantitativas foram avaliadas com o uso do teste t de Student. As

comparações das variáveis categóricas entre os grupos foram realizadas a partir de tabelas de contingência, sendo aplicado a elas o teste Qui-quadrado com correção de Yates para comparação de proporções quando apresentavam apenas duas categorias em cada variável. Na vigência de mais de duas categorias, foi utilizado o teste Qui-quadrado de Pearson. Na presença de pelo menos uma frequência esperada menor do que cinco, foi utilizado o teste exato de Fisher.

Em uma população ideal, tanto as frequências alélicas como as genotípicas serão constantes entre gerações, na ausência de migração, mutação e seleção natural. Trata-se de um equilíbrio alélico e genotípico, princípio conhecido como lei de Hardy-Weinberg (NUSSBAUM; McINNES; WILLARD, 2002).

Com o objetivo de testar se as amostras estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg, foi aplicado o teste Qui-quadrado, de modo a comparar as frequências genotípicas observadas, as quais foram encontradas na pesquisa, com as frequências esperadas, obtidas por meio deste princípio. A aplicação do teste Qui-quadrado foi feita em três etapas: a. considerando todos os indivíduos do estudo; b. considerando apenas o grupo DMRI; c. considerando apenas o grupo controle.

Foi realizada a análise de regressão logística multivariada, que tem por objetivo avaliar o efeito aditivo dos genes como fatores de risco para DMRI. A adequação do modelo foi feita por meio do teste de Hosmer-Lemeshow. Como critério de inclusão na regressão multivariada, foi utilizado valor alfa inferior a 0,25 na análise univariada. Como os três genes e seus respectivos polimorfismos faziam jus a esse critério, foram inseridos no processo de seleção de covariáveis.

Foi considerada significância estatística se $p < 0,05$; o *odds ratio* (OR) e o intervalo de confiança 95% (IC 95%) foram calculados para cada análise.

5 RESULTADOS

Conforme previamente mencionado, os resultados obtidos são aqui apresentados por meio de dois artigos científicos resultantes da pesquisa.

Como a literatura apresenta forte evidência de que os genes *CFH* e *LOC387715* estejam associados à DMRI, o Artigo 2 incluiu o estudo conjunto destes dois genes em uma população brasileira. No entanto, a literatura mostra resultados controversos com relação ao gene *VEGF*, razão pela qual este mereceu um estudo em separado, que resultou no Artigo 3.

5.1 Artigo 2 – resubmetido para publicação na revista *Ophthalmic Epidemiology*

**ASSOCIATION ANALYSIS OF *CFH* AND *LOC387715* GENE POLYMORPHISMS
IN A BRAZILIAN COHORT WITH AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION**

ALMEIDA, LUCIANA N. MD;* MELILO-CAROLINO, RACHEL BSc;§ VELOSO,
CARLOS E. MD*; PEREIRA, PATRÍCIA A. BSc;§ BASTOS-RODRIGUES, LUCIANA
PhD;§ SARUBI, HELENA MD;§ MIRANDA, DEBORA M. MD PhD;# DE MARCO,
LUIZ, MD PhD;§ NEHEMY, MARCIO B. MD PhD*

From the Departments of *Ophtalmology, §Surgery and #Pediatrics, Faculdade de
Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

The authors have no financial or competing interests to declare.

This work was partially funded by FAPEMIG and INCT/CNPq, Brazil.

To whom all correspondence and reprint requests should be addressed:

Luciana N. Almeida, MD,

Department of Ophthalmology, Faculdade de Medicina,

Av. Alfredo Balena 190, 30130-100 Belo Horizonte, MG, Brazil

E-mail: luciananfalmeida@gmail.com

Running head: *CFH* and *LOC387715* association with AMD in Brazil

Abstract

PURPOSE: To investigate the association between the *CFH* and *LOC387715* gene polymorphisms and age-related macular degeneration (AMD) in a Brazilian cohort.

METHODS: We examined 163 individuals with AMD and 140 controls recruited at the Department of Ophthalmology of the Universidade Federal de Minas Gerais, at the Instituto da Visão, and at the Centro Especializado em Olhos, in Brazil, between 2007 and 2011. Genotyping for *CFH* rs1061170 and *LOC387715* rs10490924 single nucleotide polymorphisms (SNPs) was performed. The odds ratio (OR) for all the studied genotypes (heterozygous and homozygous) of both genes were calculated compared to homozygous ancestral allele.

RESULTS: Homozygosity for *CFH* and *LOC387715* at-risk allele was 33.3% and 23.6%, respectively, for AMD individuals, and 10.1% and 7.2%, respectively, for controls ($p < 0.001$). OR was 7.8 (95% confidence interval – 95% CI: 4.1-15.4, $p < 0.001$) for *CFH* wild-genotype (CC) and 5.6 (95% CI: 2.7-11.7, $p < 0.001$) for *LOC387715* (TT). Subjects homozygous for both polymorphisms had a much higher risk of developing AMD (OR 33.3, 95% CI: 12.8-86.4). The proportion of ancestry in each group indicated that AMD patients had a higher European (Caucasian) component than controls.

CONCLUSION: *CFH* and *LOC387715* polymorphisms were strongly associated with AMD in this Brazilian cohort.

Keywords: AMD, *CFH*, *LOC387715*, polymorphism, CNV, Brazilian population.

Introduction

Age-related macular degeneration (AMD) is a progressive disorder that affects the central part of the retina, involving Bruch's membrane, the retinal pigment epithelium (RPE), and the photoreceptors.¹⁻³ AMD is an important cause of visual impairment in the elderly population worldwide.^{1,2} Initially, the disease is characterized by the presence of drusen with areas of hyperpigmentation or depigmentation and can progress to two types of late-stage AMD. Nonexudative AMD (dry or atrophic type) manifests as geographic atrophy with sharply demarcated areas of depigmentation caused by atrophy of the RPE and overlying photoreceptors.¹ Exudative AMD (wet or neovascular type) occurs when a choroidal neovascular membrane (CNVM) grows under the RPE or between the RPE and the neurosensory retina, leading to subretinal hemorrhage and subsequent scar tissue formation.¹

Susceptibility to AMD is a multifactorial trait involving both environmental factors, such as smoking, diet, and body mass index, and genetic risk factors.^{1,3-7} Some studies have demonstrated that a common single nucleotide polymorphism (SNP) of the complement factor H gene (*CFH*) at 1q32 (Y402H or 1277T>C – *rs1061170*) is strongly associated with both the atrophic and neovascular forms of AMD.⁴⁻¹⁵ This gene encodes the CFH protein, which is a major inhibitor of the complement system and directly inhibits both classical and alternate complement pathways. Therefore, the absence of factor H or its low activity can lead to unchecked complement activation, serving as an inflammatory stimulus for the formation of drusen.^{3,12}

Together with *CFH*, SNP on a second putative gene, *LOC387715*, also known as *ARMS2*, localized at 10q26 (A69S, 205G>T - *rs10490924*), accounts for more

than 50% of AMD susceptibility,^{8,15-21} although its function remains unknown. Two previous studies demonstrated that the gene product is a mitochondrial protein, and the A69S substitution could affect mitochondrial function, resulting in an increased vulnerability to aging-related degeneration of macular photoreceptors.^{20,21}

In the present study, we investigated the association between *CFH* and *LOC387715* genes and AMD in a Brazilian population.

Patients and Methods

This study was performed at the Department of Ophthalmology of the Universidade Federal de Minas Gerais, at the Instituto da Visão, and at the Centro Especializado em Olhos, Brazil. We examined 163 individuals with AMD and 140 controls between 2007 and 2011.

All subjects were informed about the nature of the study and signed a written consent in accordance with the guidelines in the Declaration of Helsinki. The study was also approved by the Ethics Committee of the three participant institutions.

Each subject underwent a complete clinical ophthalmic examination. Fluorescein angiography (FA) and optical coherence tomography (OCT) were performed in all patients in the AMD group, and indocyanine green angiography (ICG) when indicated.

Only individuals not presenting AMD symptoms and signs in either eye were included in the control group.

Participants in the AMD group had both eyes evaluated according to the clinical age-related maculopathy staging (CARMS) system²² and classified as follows: grade 1 – no drusen or < 10 small drusen without pigment abnormalities;

grade 2 – approximately ≥ 10 small drusen or < 15 intermediate drusen, or pigment abnormalities associated with ARM; 2a – drusen; 2b – RPE changes (hyperpigmentation and hypopigmentation); 2c – Both drusen and RPE changes; grade 3 – approximately ≥ 15 intermediate drusen or any large drusen; 3a – no drusenoid RPE detachment; 3b – drusenoid RPE detachment; grade 4 – geographic atrophy with involvement of the macular center, or noncentral geographic atrophy $\geq 350 \mu\text{m}$ in size; grade 5 – exudative AMD, including nondrusenoid pigment epithelial detachments, serous or hemorrhagic retinal detachments, CNVM with subretinal or sub-RPE hemorrhages or fibrosis, or scars consistent with treatment of AMD; 5a – serous RPE detachment, without CNVM; 5b – CNVM or disciform scar.

Only individuals presenting, in the most affected eye, AMD grades 3, 4, or 5 were included in the study. Grade 3 patients were considered to have early AMD, whereas patients presenting grades 4 or 5 were considered to have advanced AMD.

Individuals presenting diabetes, cancer, rheumatic diseases or any evidence of macular disease, such as degenerative myopia, angioid streaks, retina detachment, ischemic, inflammatory, or infectious retinopathies were excluded.

Genomic DNA was isolated from whole blood using the high salt method of Lahiri and Nurnberger Jr.²³ Genotyping was performed using the TaqMan® SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The probes used corresponded to the following SNPs: *rs1061170* (*CFH* gene) and *rs10490924* (*LOC387715* gene). All polymorphisms were chosen using the Hapmap database (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>). Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) genotyping used the allelic discrimination mode (Stratagene Mx3005 – MxPro qPCR Software, 2007). Genotyping was performed twice, using independent RT-PCR processes. Retypes of 10% of the whole sample were performed for quality control.

RT-PCR protocols were carried out according to the manufacturer's instructions for the TaqMan® Genotyping Master Mix (Applied Biosystems), using 3.5 µL buffer, 0.1 µL probe, 3.4 µL deionized water, and 1.0 µL DNA (50 ng µL⁻¹), to a total volume of 8 µL and under the following conditions: 1 cycle (95°C for 10 min) and 50 cycles (95°C for 15 s, 60°C for 1 min).

Because of the extensive admixture in Brazilian population, we also studied the ancestry component using molecular markers. Each individual DNA was independently genotyped for a set of 40 biallelic short insertion/deletion polymorphisms (indels). As a population clustering algorithm, we applied the Structure program version 2.3 (<http://pritch.bsd.uchicago.edu/structure.html>).

Chi-square test was used to compare patients in the AMD and control groups for possible associations between SNP genotype and phenotype. In the presence of at least one expected frequency lower than 5, the Fisher test was used. When there was only one degree of freedom in Chi-square test, the Yates correction was employed. Logistic regression for the case-control data was also used, followed by the Hosmer-Lemeshow test to certify the additive effects between the two genes, as well as to adjust other risk factors. Hardy-Weinberg equilibrium for the genotype frequencies was verified by the chi-square test. A p value of less than 0.05 was considered significant. Odds ratio (OR) and 95% confidence interval (95% CI) were calculated.

Results

A total of 303 individuals were included in the study, 163 in the AMD group (76.6 % exudative and 23.4% nonexudative); patients with unilateral CNVM were

classified as exudative. The mean age of patients in the AMD group was slightly higher than in the control group. However, excluding the subjects above 80 years old of both groups (33 in the AMD group and 14 in the control group), the difference was no longer significant, although all the other results remained significant after their exclusion. Also, no significant differences were found between groups in the distribution of gender, body mass index, or cigarette smoking habit (Table 1).

Table 1 Baseline characteristics of the study population.

Parameter	AMD	Control	<i>p</i>-value
Sample size	163	140	
Age	75.7±8.3	73.0±7.1	0.003 ¹
Age (< 80 years old)	72.9±7.0	71.1±6.0	0.12 ¹
Gender			
Male (%)	86 (52.8)	85 (60.7)	0.20 ²
Female (%)	77 (47.2)	55 (39.3)	
BMI			
Low (%)	5 (3.1)	4 (2.9)	0.90 ³
Normal (%)	71 (43.5)	56 (40.0)	
Overweight (%)	52 (31.9)	50 (35.7)	
Obese (%)	35 (21.5)	30 (21.4)	
Cigarette smoking			
Yes (%)	86 (52.8)	78 (55.7)	0.69 ²
No (%)	77 (47.2)	62 (44.3)	

AMD: group presenting age-related macular degeneration; BMI: body mass index

¹ Student's t-test. ² Chi-square test and Yates correction. ³ Fisher test.

Among patients in the AMD group, 84% were white and 16% were black or intermediate, compared with 51.4% and 48.6%, respectively, in the control group ($p < 0.001$). The proportion of European, African, and Amerindian ancestry in each group indicated that the AMD group had higher European (Caucasian) component than the control group (Figure 1).

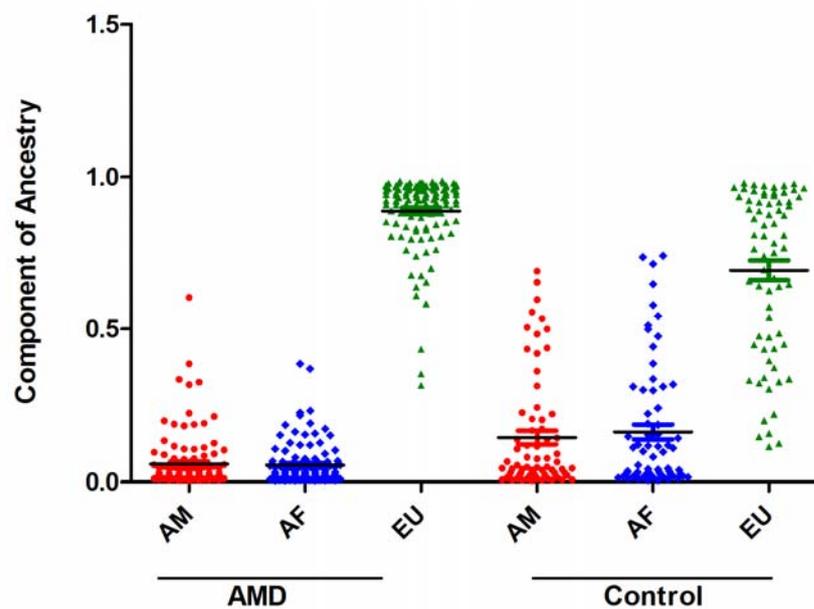


Figure 1. Slot plot of the proportion of European (EU), African (AF), and Amerindian (AM) ancestry in the group presenting age-related macular degeneration (AMD) and in the control group.

The genotype and allele frequency distribution of the *CFH* rs1061170 (“C” at-risk allele) and *LOC387715/ARMS2* rs10490924 (“T” at-risk allele) polymorphisms in the AMD and control groups are shown in Table 2.

Table 2. Genotype and allele frequency distribution in the group presenting age-related macular degeneration (AMD) and in the control group.

Parameter	Frequency distribution				<i>p-value</i>	OR	95% CI
	AMD		Control				
	(n = 163)		(n = 140)				
	n	%	n	%			
CFH							
Genotype							
CC	54	33.3	14	10.1	< 0.001 ¹	7.8	4.1-15.4
TC	74	45.7	57	41.0		2.7	1.6-4.4
TT	33	20.4	68	48.9		1	
Allele							
C	182	56.5	85	30.6	< 0.0001 ¹	2.9	2.1-4.1
T	140	43.5	193	69.4		1	
Undetermined	2		1				
LOC387715							
Genotype							
TT	38	23.5	10	7.2	< 0.001 ¹	5.6	2.7-11.7
GT	69	42.6	49	35.5		2.1	1.3-3.2
GG	54	33.3	79	57.2		1	
Allele							
T	145	45.0	69	25.0	< 0.0001 ¹	2.4	1.7-3.4
G	177	55.0	207	75.0		1	
Undetermined	2		2				

¹ Chi-square test and Yates correction.

A highly significant association was found between *CFH* CC genotype and risk of AMD, with 33.3% of patients in the AMD group and 10.1% in the control group being homozygous for this variant (OR 7.8; 95% CI: 4.1-15.4; $p < 0.001$). The prevalence of *LOC387715* homozygosity (TT) was 23.5% and 7.2%, in the AMD and control groups, respectively (OR 5.6; 95% CI: 2.7-11.7; $p < 0.001$).

Both *CFH* and *LOC387715* at-risk alleles were significantly associated with AMD subtypes (dry and wet), although only homozygous genotypes were associated with nonexudative cases in the AMD group (Tables 3 and 4).

In logistic regression models, we demonstrated additive effects of the two genes. Based on the evidence for supermultiplicative joint effects of these variants, we designed a model to calculate the probability of developing AMD for each possible combination of the Y402H and A69S genotypes. We estimated the OR from this model in 5.1 (95% CI: 2.6-10.2) among subjects who were *CFH* and *LOC387715* heterozygous, and 33.3 (95% CI: 12.8-86.4) among those who were homozygous for both at-risk alleles (Table 5).

Using logistic regression, we also assessed the risk factor for race. Controlling this factor, OR for both genes presented a discreet decrease, but remained significant, as shown in Table 6.

In both groups, the genotype frequencies of both SNPs exhibited Hardy-Weinberg equilibrium.

Discussion

The complex etiopathogenesis of AMD is not yet completely clear. In the last few years, several studies have demonstrated the association of AMD and genetic

polymorphisms, among which *CFH* and *LOC387715* are worth mentioning. Other polymorphisms, such as: complement factor B (protective),^{24,25} complement component 2 (protective),^{24,25} vascular endothelial growth factor (*VEGF*),²⁶⁻²⁸ *SERPING1*²⁹, and others have also been associated with AMD. Simultaneously, great effort has been devoted to understand how the functions of these genes might explain the physiopathology of this disease.

Table 3. Genotype frequency distribution in patients with exudative AMD in the group presenting age-related macular degeneration (AMD) and in the control group.

Parameter	Frequency distribution				<i>p</i> -value	OR	95% CI
	AMD		Control				
	(n = 125)		(n = 140)				
	n	%	n	%			
<i>CFH</i>							
Genotype							
CC	41	33.1	14	10.1	< 0.0001 ¹	7.9	3.7-17.0
TC	58	46.8	57	41.0	< 0.001 ¹	2.7	1.5-4.9
TT	25	20.2	68	48.9			
Undetermined	1		1				
<i>LOC387715</i>							
Genotype							
TT	31	24.8	10	7.2	< 0.0001 ¹	5.8	2.6-13.0
GT	52	41.6	49	35.5	< 0.05 ¹	1.9	1.1-3.4
GG	42	33.6	79	57.2			
Undetermined	0		2				

¹ Chi-square test and Yates correction.

Table 4. Genotype frequency distribution in patients with nonexudative AMD in the group presenting age-related macular degeneration (AMD) and in the control group.

Parameter	Frequency distribution				<i>p</i> -value	OR	95% CI
	AMD		Control				
	(n = 38)		(n = 140)				
	n	%	n	%			
<i>CFH</i>							
Genotype							
CC	13	35.1	14	10.1	< 0.0001 ¹	7.8	2.7-22.5
TC	16	43.2	57	41.0	0.09 ¹	2.3	0.9-5.9
TT	8	21.6	68	48.9			
Undetermined	1		1				
<i>LOC387715</i>							
Genotype							
TT	7	18.9	10	7.2	< 0.05 ¹	4.6	1.4-14.4
GT	17	45.9	49	35.5	0.07 ¹	2.2	1.0-5.1
GG	12	32.4	79	57.2			
Undetermined	1		2				

¹ Chi-square test and Yates correction.

The function of *LOC387715* in AMD is still largely unknown.¹⁵⁻¹⁹ It has been suggested that *LOC387715* confers a risk for AMD through the mitochondrial pathway.^{20,21} More recently, another study showed that the protein is mainly distributed in the cytosol, not in the mitochondrial or the cellular cytoskeleton system, although its function remains unclear.³⁰

Table 5. Joint effects of *LOC387715* and *CFH* genotypes.

<i>CFH</i>	<i>LOC387715</i>		
	GG	GT	TT
TT			
OR (95% CI)	1.0 (1.0-1.0)	1.8 (1.1-2.8)	5.0 (2.5-9.9)
N° AMD/Control	12/36	14/24	6/6
TC			
OR (95% CI)	2.9 (1.8-4.6)	5.1 (2.6-10.2)	14.2 (6.0-34.1)
N° AMD/Control	28/34	29/19	17/4
CC			
OR (95% CI)	6.7 (3.6-12.6)	12.0 (5.5-26.4)	33.3 (12.8-86.4)
N° AMD/Control	14/8	23/6	14/0

AMD: group presenting age-related macular degeneration.

Estimates of OR and 95% CI were calculated simultaneously from a conditional logistic regression model for each possible combination genotype of the two polymorphisms.

Logistic regression and Hosmer-Lemeshow test.

For the first time, a polymorphism on this gene was studied in a Brazilian population. Our results showed a strong association between 205G>T and AMD (OR 5.6; 95% CI: 2.7-11.7; $p < 0.001$). These results were similar to others found in different countries, ranging from 2.3 to 7.3.^{16,17}

Table 6. Joint effects of *LOC387715* and *CFH* genotypes controlling for race.

Race	<i>CFH</i>	<i>LOC387715</i>		
		GG	GT	TT
	TT			
	OR	1	1.4	3.9
	95% CI	(1.0-1.0)	(1.2-5.3)	(2.3-8.9)
	TC			
Non-Caucasian	OR	2.3	4.5	12.8
	95% CI	(1.5-5.6)	(2.3-9.5)	(5.3-29.1)
	CC			
	OR	5.8	10.1	30.7
	95% CI	(2.8-10.5)	(5.1-23.0)	(11.8-84.9)

Logistic regression and Hosmer-Lemeshow test.

CFH protein functions as an inflammatory pathway inhibitor.^{31,32} Low circulating levels of this protein are more prevalent in AMD patients than in controls.³² In the present study, we found that the OR for *CFH* CC genotype was 7.8 (95% CI 4.1-15.4; $p < 0.001$), similar to the results reported for different populations, with OR ranging from 2.4 to 7.4.⁴⁻⁷ However, our findings differ from the results of another Brazilian study carried out in a sample from the state of São Paulo (OR 4.63; 95% CI 2.32-9.22).³³ This disparity may be due to sampling bias, such as inclusion criteria, demographic factors, and/or limited number of patients. Brazil is a country of

continental dimension and in the present study patients originally from most states were included.

Our data also indicate that *CFH* CC and *LOC387715* TT genotypes were significantly associated with both exudative and nonexudative AMD. These findings are consistent with some previous studies.^{4-6,18} Nevertheless, there is some controversy on this subject, since some studies suggest that *LOC387715* may be more related with exudative AMD.¹⁵ In our work, the heterozygous genotypes of both genes were not related with nonexudative AMD, but this result may be due to limited number of patients in this sample.

In this study, the subjects homozygous for the risk variant at both loci presented a 33.3-fold increased risk of developing AMD with a wide 95% CI, which is consistent with previous studies.^{8,17} Similar additive effects between these two genes were demonstrated by Schaumberg et al.⁸ (OR 50.48; 95% CI: 10.77-236.57) and Rivera et al.¹⁷ (OR 57.6; 95% CI: 37.2-89.0).

Nonetheless, genetic polymorphisms do not account solely for the risk of AMD. Rather than that, multiple gene interactions as well as dietary and environmental factors in the setting of the aging process all contribute to the occurrence of AMD.

The Brazilian population is ethnically diverse and therefore studies on multifactorial diseases, involving risk factors such as race and genetic polymorphisms, are relatively complex. Taking into consideration that skin color is not a reliable criterium to determine the genomic ancestry of a Brazilian individual,³⁴⁻³⁶ we could not use it to subdivide the studied population into racial groups. Consequently, only studying indels it was possible to determine the prevalent race of each subject included in this research.

Using this analysis it was possible to detect that the European ancestry component (Caucasian) was more prevalent in the AMD group. Similar findings have been supported in other epidemiology studies.^{37,38} Vanderbeek et al.³⁷ showed that blacks, Latinos, and Asian Americans do not appear to have similar risks of developing AMD as whites.

We considered the Caucasian race as a possible risk factor for AMD. Based on this, we performed the logistic regression to control this factor and observed that OR discreetly decreased in all genotypic possibilities, although it remained significant. This fact suggests that both risk factors, racial and genetic, are independently associated with AMD in the Brazilian population.

In conclusion, the present study showed that the frequencies of risk alleles (*CFH* "C" and *LOC387715* "T") and risk genotypes were significantly higher in the AMD group in a Brazilian population.

AMD is a complex and multifactorial disease for which the precise pathophysiology is still unknown. The increased prevalence of these two polymorphisms and their strong association with AMD in different populations contributes for a better comprehension of its pathophysiology and therefore can help the investigation of new treatments.

References

1. Seddon JM, Chen CA. Epidemiology of age-related macular degeneration. In: Ryan SJ, editor. *Retina*. St. Louis: Mosby; 2006. p. 1017–1025.
2. Pascolini D, Mariotti SP, Pokharel GP, Pararajasegaram R, Etya'ale D, Négrel AD, et al. 2002 global update of available data on visual impairment: a compilation of population-based prevalence studies. *Ophthalmic Epidemiol* 2004;11(2):67–115.
3. 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):137–152.
4. Edwards AO, Ritter R III, Abel KJ, Manning A, Panhuysen C, Farrer LA. Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science* 2005;308(5720):421–424.
5. 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):419–421.
6. 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):385–389.
7. Hageman GS, Anderson DH, Johnson LV, Hancox LS, Taiber AJ, Hardisty LI, et al. A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(20):7227–7232.

8. 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.
9. Li M, Atmaca-Sonmez P, Othman M, Branham KE, Khanna R, Wade MS, et al. CFH haplotypes without the Y402H coding variant show strong association with susceptibility to age-related macular degeneration. *Nat Genet* 2006;38(9):1049–1054.
10. DeAngelis MM, Ji F, Kim IK, Adams S, Capone A Jr, Ott J, et al. Cigarette smoking, CFH, APOE, ELOVL4, and risk of neovascular age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol* 2007;125(1):49–54.
11. Seddon JM, Reynolds R, Maller J, Fagerness JA, Daly MJ, Rosner B. Prediction model for prevalence and incidence of advanced age-related macular degeneration based on genetic, demographic, and environmental variables. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50(5):2044–2053.
12. Boon CJ, Klevering BJ, Hoyng CB, Zonneveld-Vrieling MN, Nabuurs SB, Blokland E, et al. Basal laminar drusen caused by compound heterozygous variants in the CFH gene. *Am J Hum Genet* 2008;82(2):516–523.
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):1504–1507.
14. 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 Hum Genet* 2005;77(1):149–153.

15. 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):63–67.
16. 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.
17. Rivera A, Fisher SA, Fritsche LG, Keilhauer CN, Lichtner P, Meitinger T, et al. Hypothetical *LOC387715* is a second major susceptibility gene for age-related macular degeneration, contributing independently of complement factor H to disease risk. *Hum Mol Genet* 2005;14(21):3227–3236.
18. 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):852–864.
19. 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):974–979.
20. 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* 2007;104(41):16227–16232.

21. Fritsche LG, Loenhardt T, Janssen A, Fisher SA, Rivera A, Keilhauer CN, et al. Age-related macular degeneration is associated with an unstable ARMS2 (LOC387715) mRNA. *Nat Genet* 2008;40(7):892–896.
22. Seddon JM, Sharma S, Adelman RA. Evaluation of clinical age-related maculopathy staging system. *Ophthalmology* 2006;113(2):260–266.
23. Lahiri DK, Nurnberger, JI Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 1991;19(19):5444.
24. Spencer KL, Hauser MA, Olson LM, Schmidt S, Scott WK, Gallins P, et al. Protective effect of complement factor B and complement component 2 variants in age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet* 2007;16(16):1986–1992.
25. Gold B, Merriam JE, Zernant J, Hancox LS, Taiber AJ, Gehrs K, et al. Variation in factor B (BF) and complement component 2 (C2) genes is associated with age-related macular degeneration. *Nat Genet* 2006;38(4):458–462.
26. 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):2955–2961.
27. Almeida LN, Melilo-Carolino R, Veloso CE, Pereira PA, Miranda DM, De Marco LA, et al. Homozygosity for the +674C>T polymorphism on VEGF gene is associated with age-related macular degeneration in a Brazilian cohort. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* [Epub ahead of print]. DOI 10.1007/s00417-011-1807-5.
28. Yu Y, Bhangale TR, Fagerness J, Ripke S, Thorleifsson G, Tan PL, et al. Common variants near FRK/COL10A1 and VEGFA are associated with

- advanced age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet* 2011;20(18):3699–3709.
29. Lee AY, Kulkarni M, Fang AM, Edelstein S, Osborn MP, Brantley MA. The effect of genetic variants in SERPING1 on the risk of neovascular age-related macular degeneration. *Br J Ophthalmol* 2010;94(7):915–917.
30. Wang G, Spencer K, Court BL, Olson LM, Scott WK, Haines JL, et al. Localization of age-related macular degeneration–associated ARMS2 in cytosol, not mitochondria. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50(7):3084–3090.
31. Moshfeghi DM, Blumenkranz MS. Role of genetic factors and inflammation in age-related macular degeneration. *Retina* 2007;27(3):269–275.
32. Reynolds R, Hartnett ME, Atkinson JP, Giclas PC, Rosner B, Seddon JM. Plasma complement components and activation fragments: associations with age-related macular degeneration genotypes and phenotypes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50(12):5818–5827.
33. Teixeira AG, Silva AS, Lin FLH, Valletti R, Bavia L, Belfort R Jr, et al. Association of complement factor H Y402H polymorphism and age-related macular degeneration in Brazilian patients. *Acta Ophthalmol* 2010;88(5):165–169.
34. Suarez-Kurtz G, Vargens DD, Struchiner CJ, Bastos-Rodrigues L, Pena SD. Self-reported skin color, genomic ancestry and the distribution of GST polymorphisms. *Pharmacogenet Genomics* 2007;17(9):765–771.
35. Bastos-Rodrigues L, Pimenta JR, Pena SDJ. The genetic structure of human populations studied through short insertion-deletion polymorphisms. *Ann Hum Genet* 2006;70(5):658–665.

36. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SDJ. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(1):177–182.
37. Vanderbeek BL, Zacks DN, Talwar N, Nan B, Musch DC, Stein JD. Racial differences in age-related macular degeneration rates in the United States: a longitudinal analysis of a managed care network. *Am J Ophthalmol* 2011;152(2):273–282.
38. Klein R. Race/ethnicity and age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 2011;152(2):153–154.

5.2 Artigo 3 – publicado no periódico Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology

Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol
DOI 10.1007/s00417-011-1807-5

RETINAL DISORDERS

Homozygosity for the +674C>T polymorphism on *VEGF* gene is associated with age-related macular degeneration in a Brazilian cohort

Luciana N. Almeida · Rachel Melilo-Carolino · Carlos E. Veloso · Patrícia A. Pereira · Debora M. Miranda · Luiz Armando De Marco · Marcio Bittar Nehemy

Received: 1 March 2011 / Revised: 26 June 2011 / Accepted: 15 August 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract

Purpose To investigate the association between *VEGF* gene polymorphism and age-related macular degeneration (AMD) in a Brazilian cohort.

Methods We examined 160 affected individuals and 140 sex- and age-matched controls recruited at the Vision Institute and the Retina Department, São Geraldo Hospital, Minas Gerais Federal University, Brazil, between 2007 and 2011. Genotyping for the *VEGF rs1413711* single nucleotide polymorphism (SNP) (+674C>T) was performed. The incidence rate ratios and 95% confidence interval (CI) for AMD for this genotype was calculated. The odds ratio (OR) was also assessed by using logistic regression, controlling for *CFH* and *LOC387715* risk genotype.

Results We observed a prevalence of homozygosity (TT genotype) of 18.1% for *rs1413711* among AMD cases compared with 5.8% among controls ($P<0.002$). The ORs

for this polymorphism were 3.6 (95%CI 1.6–8.2) for homozygous subjects and 1.5 (95%CI 1.1–2.1, $P<0.01$) if the subject had at least one risk allele. When we studied separately exudative and dry AMD groups, this polymorphism was statistically significant for both groups. Controlling for *CFH* and *LOC387715* risk genotype the OR was 3.0 for *VEGF* homozygous, and the OR increases if the patient is homozygous for the three genes.

Conclusion The present data suggests that *VEGF* TT genotype is associated with AMD among Brazilian patients.

Keywords AMD · Genetics · *VEGF* gene · *VEGF* · Polymorphism · CNV · Brazilian population

Introduction

Age-related macular degeneration (AMD) is a degenerative disease of the retina that causes progressive impairment of central vision, and is the leading cause of irreversible vision loss in the elderly in the developed countries [1]. Etiological research suggests that AMD is a complex disease, caused by the actions and interactions of multiple genes and environmental factors [1–10].

Association studies have identified a major risk variant within the complement factor H gene (*CFH*) [5–7]. Linkage analyses have also identified a second major gene for AMD on chromosome 10q, with the strongest evidence for a coding single nucleotide polymorphism in the gene *LOC387715* [8, 9].

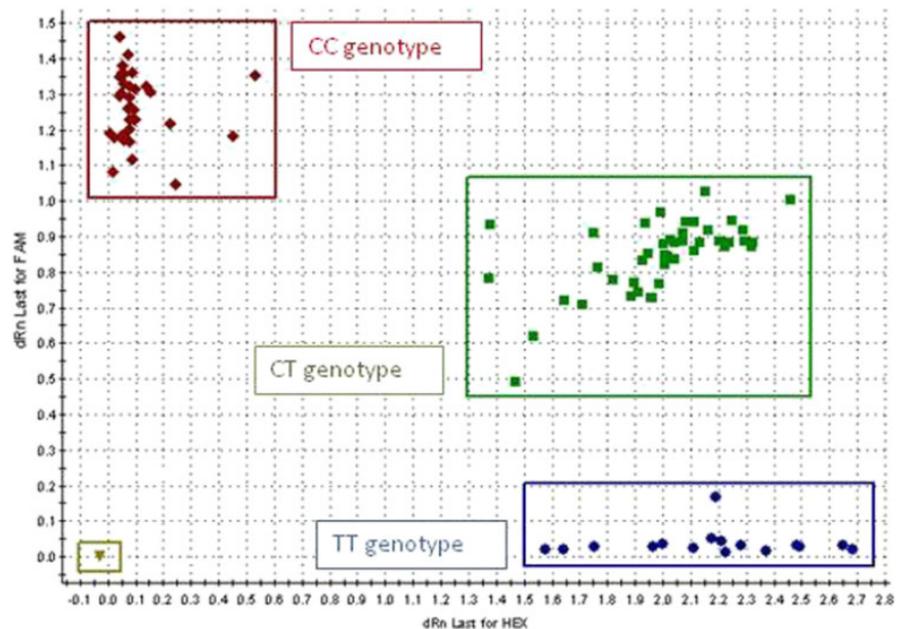
A few studies have suggested that the vascular endothelial growth factor (*VEGF*) gene could play a role in the

L. N. Almeida (✉) · C. E. Veloso · M. B. Nehemy
Department of Ophthalmology, Faculdade de Medicina,
Universidade Federal de Minas Gerais,
Av. Alfredo Balena 190,
Belo Horizonte, MG, Brasil 30130-100
e-mail: luciananfalcone@gmail.com

R. Melilo-Carolino · P. A. Pereira · L. A. De Marco
Department of Surgery, Faculdade de Medicina,
Universidade Federal de Minas Gerais,
Av. Alfredo Balena 190,
Belo Horizonte, MG, Brasil 30130-100

D. M. Miranda
Department of Pediatrics, Faculdade de Medicina,
Universidade Federal de Minas Gerais,
Av. Alfredo Balena 190,
Belo Horizonte, MG, Brasil 30130-100

Fig. 1 PCR-Realtime plot for +674C>T *VEGF* polymorphism



pathogenesis of AMD [10–12]. Other published papers showed no association [13, 14]. The *VEGF* gene encodes the VEGF protein, a major player in the control of angiogenesis. VEGF-A is alternatively spliced to produce isoforms of differing lengths—189, 165 and 121 amino acids. The major isoform in the eye is the VEGF 165, which is further spliced into an ‘a’ or ‘b’ isoforms. VEGF 165a has strong angiogenic properties, whereas VEGF165b has anti-angiogenic properties [15].

Different retinal cell types can produce VEGF, such as retinal pigmented epithelium, astrocytes, Müller cells, vascular endothelium, and ganglion cells [16]. Increased levels of VEGF in surgically removed neovascular membranes from eyes with neovascular AMD have been demonstrated [17]. This knowledge led to the development of a variety of anti-VEGF therapies that changed the approach and prognosis of the disease [18]. However, response to therapy is not identical; some patients exhibit treatment resistance, and the reasons for this are poorly understood.

Because of the important role of the VEGF in the pathogenesis and treatment of AMD we decided to investigate the association between *VEGF* gene polymorphism (+674C>T) and AMD in the Brazilian population.

Materials and methods

Subjects

We examined 160 affected individuals (age range 55–91) and 140 sex- and age-matched controls (age range 55–91)

recruited at the Vision Institute and the Department of Ophthalmology of Universidade Federal de Minas Gerais Federal, Brazil between 2008 and 2011. Each subject underwent a complete clinical ophthalmic examination, including fluorescein angiography (FA) and optical coherence tomography for AMD patients.

The clinical criteria and grades used to define AMD were based on the clinical age-related maculopathy staging (CARMS) [19] system as described previously. Patients were then classified as: no AMD: grade 1; nonexudative AMD: grades 2, 3 and 4; and exudative AMD: grade 5. Patients with >10 small drusen or <15 intermediate drusen without RPE changes were not included. Patients with positive history for diabetes,

Table 1 Genotype frequencies and alleles in AMD patients and control subjects

	Patients (160)		Controls (140)		<i>P</i>	OR	95%CI
	<i>N</i>	%	<i>N</i>	%			
VEGF							
Genotype							
TT	29	18.1	8	05.8	0.002*	3.6	1.6–8.2
CT	66	41.2	65	46.4	0.4		
CC	65	40.7	67	47.8	0.2		
Allele							
T	124	38.7	81	28.9	0.01**	1.5	1.1–2.1
C	196	61.2	199	71.1			

*Pearson’s chi-square test; ** Chi-square test and Yates correction

rheumatoid arthritis, cancer, or lupus were excluded, as were those with any evidence of macular disease other than AMD, secondary choroidal neovascularization, degenerative high myopia, retinal detachment, chorioretinal infective or inflammatory processes, angioid streaks, or any retinopathy associated with ischemia.

All subjects were informed about the nature of the study, and signed a written consent in accordance with the guidelines in The Declaration of Helsinki. The study was also approved by both Ethics Committees.

Genotyping

Genomic DNA was isolated from whole blood using the high salt method of Lahiri and Nurnberger (1991). We selected one SNP, which was genotyped using TaqMan® SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, USA). The polymorphism was chosen using the Hapmap database (www.hapmap.org). The probe used corresponds to the following SNP *rs1413711* (*VEGF* gene), which has been implicated with neovascular AMD in a Caucasian population [10, 11]. Retypes of 10% of the whole sample were performed for quality control.

The PCR-Realtime method using the allelic discrimination mode (Stratagene Mx3005 — MxPro QPCR- Software, 2007) was used for genotyping (Fig. 1). PCR protocols followed the manufacturer's instructions, as follows: 3.5 µl of mix, 0.1 µl of probe, 3.4 µl of deionized water and a 1.0 µl DNA (DNA concentration 50 ng/µl) to a total volume of 8 µl. PCR conditions were: 1 cycle (10 min at 95°C) and 50 cycles (95°C at 15 s, 60°C 1 min).

All laboratory workers were masked to case-control status.

Statistical analysis

Statistical analysis was carried out using the BioEstat and SPSS programs. Pearson χ^2 test and/or the Fisher test were used to compare patient and control groups for possible associations between SNP genotype and phenotype. Yates' correction was used when necessary. Logistic regression for the case-control data was also used. Hardy–Weinberg equilibrium for the genotype frequencies was verified by the chi-square test, together with two other genes (*CFH* and *LOC387715*). Statistical significance was assumed if $p < 0.05$. Odds ratios and 95% confidence interval were calculated.

Results

Genotype distributions for Hardy–Weinberg equilibrium in either AMD cases or control subjects were proportional and not statistically significant.

Table 2 Genotype/allele frequencies in exudative AMD patients and control subjects

	Patients (124)		Controls (140)		<i>P</i>	OR	95%CI
	<i>N</i>	%	<i>N</i>	%			
VEGF							
Genotype							
TT	21	16.9	8	05.8	0.006*	3.3	1.4-7.9
CT	52	41.9	65	46.4	0.5		
CC	51	41.2	67	47.8	0.3		
Allele							
T	94	37.9	81	28.9	0.03**	1.4	1.0-2.1
C	154	62.1	199	71.1			

*Pearson's chi-square test; ** Chi-square test and Yates correction

A total of 160 AMD patients were included in the study, of which 77.5% and 22.5% were classified as exudative and nonexudative forms respectively. The mean age of control subjects was slightly lower than that of patients with AMD. However, when excluding the extreme subjects above 80 years old of both groups (33 subjects in AMD group and 14 in control group), the statistics remained significant. There were no significant differences between groups in the distribution of sex, body mass index, or cigarette smoking habit.

There was a significant association between *VEGF* genotype and risk of AMD, with 18.1% of AMD patients and 5.8% of controls being homozygous for this variant (TT genotype) (OR 3.6, 95%CI: 1.6–8.2, $P < 0.002$). The wild-allele (T) was also more prevalent in the AMD group (38.7%) than in controls (28.9) (OR 1.5, 95% CI: 1.1–2.1) (Table 1)

In logistic regression models not adjusted for other risk factors, we demonstrated that, controlling for *CFH*

Table 3 Genotype/allele frequencies in nonexudative AMD patients and control subjects

	Patients (36)		Controls (140)		<i>P</i>	OR	95%CI
	<i>N</i>	%	<i>N</i>	%			
VEGF							
Genotype							
TT	8	22.2	8	05.8	0.006*	4.4	1.6-13.6
CT	14	38.9	65	46.4	0.5		
CC	14	38.9	67	47.8	0.4		
Allele							
T	30	41.6	81	28.9	0.05**	1.75	1.0-2.9
C	42	58.4	199	71.1			

*Pearson's chi-square test; ** Chi-square test and Yates correction

and *LOC387715* risk genotype, the OR for *rs1413711* *VEGF* homozygosity is still significant (OR 3.0, 95%CI: 1.1–8.3, $P < 0.01$), and increases if the patient has at least one risk allele of the two first genes, *CFH* and *LOC387715* (OR 22.2, 95%CI: 4.5–108.6, $P < 0.01$).

The increased risk genotype was similar in the exudative AMD group, when compared to nonexudative AMD (data not shown). Both AMD subgroups (grades 2, 3 and 4) showed significant differences with respect to the control group concerning the TT homozygous genotype. When comparing *VEGF* wild-type-allele (T), not the genotype, the prevalence of this allele was higher only in the exudative AMD group, 37.9% ($P < 0.03$) when compared to control subjects (28.9%) (Tables 2 and 3).

Discussion

Conclusive data concerning whether *VEGF* gene polymorphism may or may not play a role for a genetic predisposition to AMD has not been fully demonstrated. Most published studies indicate the association of *VEGF* gene variability and AMD [10–12, 20–22]. However, as different SNPs were tested, with limited sample size and also a diverse ethnic origin of cases and controls, a statistically valid conclusion has not been agreed upon.

This study analyzed the association between an intronic *VEGF* polymorphism and AMD (*rs1413711*, C>T). Churchill et al. [11] showed that this SNP had a protective effect, and the disease was more associated to the CC genotype. Additionally, two other studies [20, 22] demonstrated no association between *rs1413711* and AMD. In contrast, our analysis suggested that AMD risk was increased 1.5-fold per copy of the wild (minor) T allele and 3.6-fold for T homozygous compared to homozygous carriers of the ancestral (major) C allele. Heterozygous status did not show a higher risk of developing the disease. These discrepant findings could be due to the use of different methods, variables such as age, gender or other risk effects, or mainly because of different ethnic composition of study populations.

When we separately studied the exudative and dry AMD groups, we found that both had a higher prevalence of the TT genotype. However, the small number of subjects in the dry AMD group and/or the presence of patients classified as early AMD in this group could have confounded the statistical analysis.

In our study, we found an independent relationship between *VEGF* polymorphism and *CFH* or *LOC387715* polymorphisms. The increased risk for AMD, controlling for *CFH* and *LOC387715*, was 3-fold higher for subjects homozygous for *VEGF rs1413711* (TT genotype), slightly lower than uncontrolled OR.

The SNP *rs1413711* is located in intron 1 of the *VEGF-A* gene, 1695 bp downstream from the start of exon 1. No functional data on this polymorphism have been published so far. However, some studies have shown that the stress response element binding sites in the *VEGF* gene respond to stress periods such as hypoxia [23] and kinases. Thus, a polymorphism adjacent to these sites could influence binding, splicing and VEGF production [11, 15, 24].

In conclusion, the associations demonstrated in the present analysis support a role for a genetic predisposition to AMD related to variations in the *VEGF* gene in this subset of the Brazilian population. Further studies are necessary to firmly establish the physiopathology of AMD.

Acknowledgements Supported in part by grants from CNPq, INCT in Molecular Medicine and FAPEMIG, Brazil.

Conflicts of interest The authors have no financial or competing interests to declare.

References

1. Seddon JM, Chen CA (2006) Epidemiology of age-related macular degeneration. In: Ryan SJ (ed) Retina. Elsevier, California, pp 1017–1025
2. Reynolds R, Hartnett ME, Atkinson JP, Giclas PC, Rosner B, Seddon JM (2009) Plasma complement components and activation fragments: associations with age-related macular degeneration genotypes and phenotypes. Invest Ophthalmol Vis Sci 50:5818–5827
3. Seddon JM, Reynolds R, Maller J, Fagerness JA, Daly MJ, Rosner B (2009) Prediction model for prevalence and incidence of advanced age-related macular degeneration based on genetic, demographic, and environmental variables. Invest Ophthalmol Vis Sci 50:2044–2053
4. Almeida LNE, Carolino RM, Sperandio DC, Nehemy MB, De Marco LA (2009) The role of molecular genetic factors in age-related macular degeneration. Arq Bras Oftalmol 72:567–572
5. Hecker LA, Edwards AO, Ryu E, Tosakulwong N, Baratz KH, Brown WL, Charbel Issa P, Scholl HP, Pollok-Kopp B, Schmid-Kubista KE, Bailey KR, Oppermann M (2010) Genetic control of the alternative pathway of complement in humans and age-related macular degeneration. Hum Mol Genet 19:209–215
6. Lee AY, Kulkarni M, Fang AM, Edelstein S, Osborn MP, Brantley MA (2010) The effect of genetic variants in SERPING1 on the risk of neovascular age-related macular degeneration. Br J Ophthalmol 94:915–917
7. Schaumberg DA, Hankinson SE, Guo Q, Rimm E, Hunter DJ (2007) A prospective study of 2 major age-related macular degeneration susceptibility alleles and interactions with modifiable risk factors. Arch Ophthalmol 125:55–62
8. Wang G, Spencer KL, Court BL, Olson LM, Scott WK, Haines JL, Pericak-Vance MA (2009) Localization of age-related macular degeneration-associated ARMS2 in cytosol, not mitochondria. Invest Ophthalmol Vis Sci 50:3084–3090
9. Jiang H, Qu Y, Dang G, Zhang X, Yin N, Zhang Y, Bi H, Pan X, Xu X, Zhou F, Dai H (2009) Analyses of single nucleotide polymorphism and haplotype linkage of *LOC387715* and the *HTRA1* gene in exudative age-related macular degeneration in a Chinese cohort. Retina 29:974–979

10. Haines JL, Schnetz-Boutaud N, Schmidt S, Scott WK, Agarwal A, Postel EA, Olson L, Kenealy SJ, Hauser M, Gilbert JR, Pericak-Vance MA (2006) Functional candidate genes in age-related macular degeneration: significant association with VEGF, VDRRLR, and LRP6. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47:329–335
11. Churchill AJ, Carter JG, Ramsden C, Turner SJ, Yeung A, Brencley PE, Ray DW (2006) VEGF polymorphisms are associated with neovascular age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet* 15:2955–2961
12. Janik-Papis K, Zaras M, Krzyzanowska A, Wozniak K, Blasiak J, Szaflik J, Szaflik JP (2009) Association between vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and age-related macular degeneration in a Polish population. *Exp Mol Pathol* 87:234–238
13. Richardson AJ, Islam FM, Guymer RH, Cain M, Baird PN (2007) A tag-single nucleotide polymorphisms approach to the vascular endothelial growth factor-A gene in age-related macular degeneration. *Mol Vis* 26:2148–2152
14. Boekhoorn SS, Isaacs A, Uitterlinden AG, van Duijn CM, Hofman A, de Jong PT, Vingerling JR (2008) Polymorphisms in the vascular endothelial growth factor gene and risk of age-related macular degeneration: the Rotterdam Study. *Ophthalmology* 115:1899–1903
15. Qiu Y, Hoareau-Aveilla C, Oltean S, Harper SJ, Bates DO (2009) The anti-angiogenic isoforms of VEGF in health and disease. *Biochem Soc Trans* 37:1207–1213
16. Penn JS, Madan A, Caldwell RB, Bartoli M, Caldwell RW, Hartnett ME (2008) Vascular endothelial growth factor in eye disease. *Prog Retin Eye Res* 27:331–371
17. Frank RN (1997) Growth factors in age-related macular degeneration: pathogenic and therapeutic implications. *Ophthalmic Res* 29:341–353
18. Eyetech Study Group (2003) Anti-vascular endothelial growth factor therapy for subfoveal choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration: phase II study results. *Ophthalmology* 110:979–986
19. Seddon JM, Sharma S, Adelman RA (2006) Evaluation of clinical age-related maculopathy staging system. *Ophthalmology* 113:260–266
20. Lin JM, Wan L, Tsai YY, Lin HJ, Tsai Y, Lee CC, Tsai CH, Tseng SH, Tsai FJ (2008) Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms in age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 145:1045–1051
21. Galan A, Ferlin A, Caretti L, Buson G, Sato G, Frigo AC, Foresta C (2010) Association of age-related macular degeneration with polymorphisms in vascular endothelial growth factor and its receptor. *Ophthalmology* 117:1769–1774
22. Fang AM, Lee AY, Kulkarni M, Osborn MP, Brantley MA Jr (2009) Polymorphisms in the VEGFA and VEGFR-2 genes and neovascular age-related macular degeneration. *Mol Vis* 10:2710–2719
23. Pugh CW, Ratcliffe P (2003) Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med* 9:677–684
24. Harper SJ, Bates DO (2008) VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? *Nat Rev Cancer* 8:880–887

5.3 Resultados adicionais

Avaliação do efeito aditivo dos três polimorfismos estudados: 1227T>C (*CFH*), 205G>T (*LOC387715/ARMS*) e +674C>T (*VEGF*). Na Tabela 2, apresentam-se os resultados da regressão logística multivariada dos três genes estudados.

Tabela 2. Efeito aditivo dos três polimorfismos estudados.

		<i>CFH</i>		
		<i>LOC387715</i>		
		GG	GT	TT
	TT			
	<i>Odds ratio</i>	3,1	5,5	15,3
	IC 95%	(1,4-6,8)	(2,2-13,7)	(5,3-43,9)
VEGF	Caso/controlado	3/3	2/1	1/0
TT	TC			
	<i>Odds ratio</i>	8,8	15,9	43,9
	IC 95%	(3,4-23,0)	(1,2-203,2)	(13,2-146,2)
	Caso/controlado	1/1	5/1	3/1
	CC			
	<i>Odds ratio</i>	20,7	37,1	102,6
	IC 95%	(7,5-56,9)	(12,2-112,6)	(29,6-355,3)
	Caso/controlado	3/0	8/1	2/0

Observa-se que quando o polimorfismo no gene do *VEGF* ocorre em homozigose e associado a pelo menos um alelo de risco dos genes *CFH* e *LOC387715*, OR aumenta para 15,9 (IC 95%: 1,2-203,2; $p < 0,01$), e quando os três genes estão em homozigose, OR aumenta para 102,6 (IC 95%: 29,6-355,3).

6 DISCUSSÃO

As pesquisas entre associações genéticas e DMRI iniciaram-se no final da década de 1990, mas somente há seis anos os estudos se tornaram consistentes e reprodutíveis (EDWARDS et al., 2005; HADDAD et al., 2006; HAGEMAN et al., 2005; HAINES et al., 2005; KLEIN et al., 2005).

Trabalhos publicados em 2005, demonstrando a associação da DMRI com o polimorfismo no gene *CFH*, de certa forma representam um divisor de águas na compreensão da etiopatogenia da DMRI, abrindo uma extraordinária possibilidade de investigação científica. No início deste estudo, em 2006, não havia qualquer informação quanto à eventual associação de polimorfismos genéticos com a DMRI na população brasileira. Impunha-se, assim, uma pesquisa com adequado rigor científico para viabilizar a determinação do perfil dos principais polimorfismos genéticos que pudessem estar associados à DMRI na população brasileira. Conforme previamente mencionado, os dois principais polimorfismos genéticos que apresentavam maior evidência de associação com a DMRI eram os dos genes *CFH* e *LOC387715*, razão pela qual foram selecionados para este estudo. Acrescentou-se, ainda, o estudo do gene *VEGF*, pelas evidências preliminares de sua importância e potencial efeito na fisiopatogenia dessa doença.

A discussão detalhada dos resultados desta tese está apresentada nos respectivos artigos e, por esta razão, não será aqui reprisada. Cabe, entretanto, apresentar uma discussão de cunho geral, com a finalidade de fornecer uma visão panorâmica dos principais resultados desta pesquisa.

No Artigo 2, mostrou-se que a população brasileira apresenta um grau de associação dos polimorfismos nos genes *CFH* e *LOC387715* semelhante aos resultados envolvendo amostras de diferentes países publicados na literatura (EDWARDS et al., 2005; HAGEMAN et al., 2005; HAINES et al., 2005; KLEIN et al., 2005; LI et al., 2006; SCHAUMBERG et al., 2007; SHULER JUNIOR et al., 2007).

Já no Artigo 3, mostrou-se que na população brasileira existe uma associação entre o polimorfismo do gene *VEGF* e a DMRI. Essa associação, no entanto, foi menos significativa do que a observada para os dois outros polimorfismos estudados. Em decorrência da escassez de publicações referentes a esse polimorfismo (+674C>T – *VEGF*) (CHURCHIL et al., 2006; JANIK-PAPIS et al., 2009; YU et al., 2011), o presente trabalho traz uma contribuição também significativa para a literatura, porquanto sugere que este polimorfismo possa, de fato, estar relacionado com a DMRI. Dessa maneira, justifica a condução de estudos adicionais envolvendo maior número de pacientes, que possam ser realizados com a finalidade de corroborar essa hipótese e avaliar a eventual interação desse polimorfismo com os demais polimorfismos genéticos, bem como com fatores ambientais.

O presente trabalho mostrou um efeito aditivo bastante significativo entre os polimorfismos nos genes *CFH* e *LOC387715*, conforme explicitado no Artigo 2, e a inclusão do genótipo de risco, em homozigose, do polimorfismo estudado no gene *VEGF* aumenta notavelmente esta significância.

No início deste trabalho, havia a expectativa de que o perfil genotípico poderia ter influência na manifestação fenotípica da doença. Os resultados obtidos neste estudo mostraram, assim como em outros trabalhos já publicados (EDWARDS et al., 2005; HAINES et al., 2005; KLEIN et al., 2005), que na amostra estudada não houve

diferença significativa na manifestação fenotípica da doença, atrófica ou exsudativa, com relação ao perfil genotípico em homozigose dos três genes.

Ao demonstrarmos nesta pesquisa a associação desses polimorfismos genéticos com a DMRI, surgiu, naturalmente, o instigante questionamento quanto à eventual importância do genótipo na resposta terapêutica aos tratamentos vigentes para a doença. Assim sendo, a investigação dessa hipótese suscitou outros trabalhos desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa, resultando em artigos já publicados ou em vias de publicação, cuja discussão foge aos objetivos desta tese.

Em síntese, o presente estudo traz uma contribuição para a melhor compreensão da etiopatogenia da DMRI, doença cuja prevalência aumenta com a idade e, com o aumento da expectativa de vida da população mundial, tende a se tornar cada vez mais prevalente e com grande impacto em termos de saúde pública. Esse conhecimento torna-se essencial para estabelecer medidas preventivas e tratamentos efetivos para uma das principais causas de cegueira em todo o mundo.

7 CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo permitem chegar às seguintes conclusões:

1. O polimorfismo 1227T>C do gene *CFH* e o polimorfismo 205G>T do gene *LOC387715/ARMS2* estão associados com a ocorrência da DMRI nesta amostra da população brasileira;
2. O polimorfismo +674C>T do gene *VEGF*, quando em homozigose, está associado com a ocorrência da DMRI nesta amostra da população brasileira;
3. Os polimorfismos dos três genes estudados podem atuar de forma aditiva, aumentando o risco de desenvolver a DMRI na população brasileira. O polimorfismo no gene *VEGF*, entretanto, somente apresenta esse efeito aditivo quando se encontra em homozigose;
4. Em homozigose, os polimorfismos dos três genes estudados estão associados à ocorrência de ambas as formas da DMRI, atrófica e exsudativa.

REFERÊNCIAS

- AGE-RELATED EYE DISEASE STUDY RESEARCH GROUP. Risk factors associated with age-related macular degeneration. A case-control study in the Age-related Eye Disease Study: Age-Related Eye Disease Study Report Number 3. **Ophthalmology**, Rochester, v. 107, no. 12, p. 2224–2232, 2000.
- BRESSIER, S. B.; BRESSIER, N. M.; SARCS, S. H.; SARCS, J. P. Age-related macular degeneration: noneovascular early AMD, intermediate AMD, and geographic atrophy. In: RYAN, S. J. (Ed.). **Retina**. 4. ed. St. Louis: Mosby, 2006. p. 1041–1074.
- CAVALLI, S. A.; OTTA, M. I.; HIRATA, R. D. C.; NGUYEN, N. Y.; HIRATA, M. H. Apolipoprotein E genotyping in Brazilian normocholesterolemic individuals. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 42, Supplement, p. S298, 1996.
- CHURCHIL, A. J.; CARTER, J. G.; LOVELL, H. C.; RAMSDEN, C.; TURNER, S. J.; YEUNG, A.; ESCARDO, J.; ATAN, D. VEGF polymorphisms are associated with neovascular age-related macular degeneration. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v. 15, no. 19, p. 2955–2961, 2006.
- CLEMONS, T. E.; MILTON, R. C.; KLEIN, R.; SEDDON, J. M.; FERRIS, F. L. 3rd. Risk factors for the incidence of Advanced Age-Related Macular Degeneration in the Age-related Eye Disease Study (AREDS) AREDS report n° 19. **Ophthalmology**, Rochester, v. 112, no. 4, p. 533–539, 2005.
- DeANGELIS, M. M.; JI, F.; KIM, I. K.; ADAMS, S.; CAPONE JUNIOR, A.; OTT, J.; MILLER, J. W.; DRYJA, T. P. Cigarette smoking, CFH, APOE, ELOVL4, and risk of neovascular age-related macular degeneration. **Archives of Ophthalmology**, Chicago, v. 125, no. 1, p. 49–54, 2007.
- EDWARDS, A. O.; RITTER, R. III; ABEL, K. J.; MANNING, A.; PANHUYSSEN, C.; FARRER, L. A. Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. **Science**, Washington, DC, v. 308, no. 5720, p. 421–424, 2005.
- GOLD, B.; MERRIAM, J. E.; ZERNANT, J.; HANCOX, L. S.; TAIBER, A. J.; GEHRS, K.; CRAMER, K.; NEEL, J.; BERGERON, J.; BARILE, G. R.; SMITH, R. T.; HAGEMAN, G. S.; DEAN, M.; ALLIKMETS, R. Variation in factor B (BF) and complement component 2 (C2) genes is associated with age-related macular degeneration. **Nature Genetics**, New York, v. 38, no. 4, p. 458–462, 2006.
- HADDAD, S.; CHEN, C. A.; SANTANGELO, S. L.; SEDDON, J. M. The genetics of age-related macular degeneration: a review of progress to date. **Survey of Ophthalmology**, Brookline, v. 51, no. 4, p. 316–363, 2006.
- HAGEMAN, G. S.; ANDERSON, D. H.; JOHNSON, L. V.; HANCOX, L. S.; TAIBER, A. J.; HARDISTY, L. I.; HAGEMAN, J. L.; STOCKMAN, H. A.; BORCHARDT, J. D.; GEHRS, K. M.; SMITH, R. J.; SILVESTRI, G.; RUSSELL, S. R.; KLAVER, C. C.; BARBAZETTO, I.; CHANG, S.; YANNUZZI, L. A.; BARILE, G. R.; MERRIAM, J. C.; SMITH, R. T.; OLSH, A. K.; BERGERON, J.; ZERNANT, J.; MERRIAM, J. E.; GOLD,

B.; DEAN, M.; ALLIKMETS, R. A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, DC, v. 102, no. 20, p. 7227–7232, 2005.

HAINES, J. L.; HAUSER, M. A.; SCHMIDT, S.; SCOTT, W. K.; OLSON, L. M.; GALLINS, P.; SPENCER, K. L.; KWAN, S. Y.; NOUREDDINE, M.; GILBERT, J. R.; SCHNETZ-BOUDAUD, N. Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. **Science**, Washington, DC, v. 308, no. 5720, p. 419–421, 2005.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo, 2010**. Brasília, DF, 2010. Disponível em: <http://www.censo2010.ibge.gov.br/dados_divulgados/>. Acesso em: 17 jan. 2012.

JANIK-PAPIS, K.; ZARAS, M.; KRZYZANOWSKA, A.; WOZNIAK, K.; BLASIAK, J.; SZAFLIK, J.; SZAFLIK, J. P. Association between vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and age-related macular degeneration in a Polish population. **Experimental and Molecular Pathology**, San Diego, v. 87, no. 3, p. 234–238, 2009.

KLEIN, R.; CHOU, C. F.; KLEIN, B. E.; ZHANG, X.; MEUER, S. M.; SAADDINE, J. B. Prevalence of age-related macular degeneration in the US population. **Archives of Ophthalmology**, Chicago, v. 129, no. 1, p. 75–80, 2011.

KLEIN, R. J.; ZEISS, C.; CHEW, E. Y.; TSAI, J. Y.; SACKLER, R. S.; HAYNES, C.; HENNING, A. K.; SANGIOVANNI, J. P.; MANE, S. M.; MAYNE, S. T.; BRACKEN, M. B.; FERRIS, F. L.; OTT, J.; BARNSTABLE, C.; HOH, J. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. **Science**, Washington, DC, v. 308, no. 5270, p. 385–389, 2005.

LAHIRI, D. K.; NURNBERGER JUNIOR, J. I. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 19, no. 19, p. 5444, 1991.

LI, M.; ATMACA-SONMEZ, P.; OTHMAN, M.; BRANHAM, K. E.; KHANNA, R.; WADE, M. S.; LI, Y.; LIANG, L.; ZAREPARSI, S.; SWAROOP, A.; ABECASIS, G. R. CFH haplotypes without the Y402H coding variant show strong association with susceptibility to age-related macular degeneration. **Nature Genetics**, New York, v. 38, no. 9, p. 1049–1054, 2006.

MALLER, J.; GEORGE, S.; PURCELL, S.; FAGERNESS, J.; ALTSHULER, D.; DALY, M. J.; SEDDON, J. M. Common variation in three genes, including a noncoding variant in CFH, strongly influences risk of age-related macular degeneration. **Nature Genetics**, New York, v. 38, no. 9, p. 1055–1059, 2006.

NEHEMY, M. B. Degeneração macular relacionada à idade: novas perspectivas. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v. 69, n. 6, p. 955–958, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abo/v69n6/a31v69n6.pdf>>. Acesso em: 15 jun. 2007.

NUSSBAUM, R. L.; McINNES, R. R.; WILLARD, H. F. **Genética médica**. 6. ed. Tradução Paulo Armando Motta. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

RESNIKOFF, S.; PASCOLINI, D.; ETYA´ALE, D.; KOCUR, I.; PARARAJASEGARAM, R.; POKHAREL, G. P.; MARIOTTI, S. P. Global data on visual impairment in the year. **Bulletin of the World Health Organization**, New York, v. 82, no. 11, p. 844–851, 2002.

SALAZAR, L. A.; HIRATA, M. H.; CAVALLI, A.; MACHADO, M. O.; HIRATA, R. D. Optimized procedure for DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 44, no. 8, p. 1748–1750, 1998.

SCHAUMBERG, D. A.; HANKINSON, S. E.; GUO, Q.; RIMM, E.; HUNTER, D. J. A prospective study of 2 major age-related macular degeneration susceptibility alleles and interactions with modifiable risk factors. **Archives of Ophthalmology**, Chicago, v. 125, no. 1, p. 55–62, 2007.

SEDDON, J. M.; CHEN, C. A. Epidemiology of age-related macular degeneration. In: RYAN, S. J. (Ed.). **Retina**. 4. ed. St. Louis: Mosby, 2006. p.1017–1025.

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**, v. 16, p. 2412–2424, 2010.

SEDDON, J. M.; SHARMA, S.; ADELMAN, R. A. Evaluation of the clinical age-related maculopathy staging system. **Ophthalmology**, Rochester, v. 113, no. 2, p. 260–266, 2006.

SHULER JUNIOR, R. K.; HAUSER, M. A.; CALDWELL, J.; GALLINS, P.; SCHMIDT, S.; SCOTT, W. K.; AGARWAL, A.; HAINES, J. L.; PERICAK-VANCE, M. A.; POSTEL, E. A. Neovascular age-related macular degeneration and its association with LOC387715 and complement factor H polymorphisms. **Archives of Ophthalmology**, Chicago, v. 125, no. 1, p. 63–67, 2007.

SPENCER, K. L.; HAUSER, M. A.; OLSON, L. M.; SCHMIDT, S.; SCOTT, W. K.; GALLINS, P.; AGARWAL, A.; POSTEL, E. A.; PERICAK-VANCE, M. A.; HAINES, J. L. Protective effect of complement factor B and complement component 2 variants in age-related macular degeneration. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v. 16, no. 16, p. 1986–1992, 2007.

TUO, J.; SMITH, B. C.; BOJANOWSKI, C. M.; MELETH, A. D.; GERY, I.; CSAKY, K. G.; CHEW, E. Y.; CHAN, C. C. The involvement of sequence variation and expression of CX3CR1 in the pathogenesis of age-related macular degeneration. **FASEB Journal**, Bethesda, v. 18, no. 11, p. 1297–1299, 2004.

VANDERBEEK, B. L.; ZACKS, D. N.; TALWAR, N.; NAN, B.; MUSCH, D. C.; STEIN, J. Racial differences in age-related macular degeneration rates in the United States: a longitudinal analysis of a managed care network. **American Journal of Ophthalmology**, Chicago, v. 152, no. 2, p. 273–282, 2011.

YU, Y.; BHANGALE, T. R.; FAGERNESS, J.; RIPKE, S.; THORLEIFSSON, G.; TAN, P. L.; SOUIED, E. H.; RICHARDSON, A. J.; MERRIAM, J. E.; BUITENDIJK, G. H.; REYNOLDS, R.; RAYCHAUDHURI, S.; CHIN, K. A.; SOBRIN, L.; EVANGELOU, E.; LEE, P. H.; LEE, A. Y.; LEVEZIEL, N.; ZACK, D. J.; CAMPOCHIARO, B.; CAMPOCHIARO, P.; SMITH, R. T.; BARILE, G. R.; GUYMER, R. H.; HOGG, R.; CHAKRAVARTHY, U.; ROBMAN, L. D.; GUSTAFSSON, O.; SIGURDSSON, H.; ORTMANN, W.; BEHRENS, T. W.; STEFANSSON, K.; UITTERLINDEN, A. G.; VAN DUIJN, C. M.; VINGERLING, J. R.; KLAVER, C. C.; ALLIKMETS, R.; BRANTLEY JUNIOR, M. A.; BAIRD, P. N.; KATSANIS, N.; THORSTEINSDOTTIR, U.; IOANNIDIS, J. P.; DALY, M. J.; GRAHAM, R. R.; SEDDON, J. M. Common variants near FRK/COL10A1 and VEGFA are associated with advanced age-related macular degeneration. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v. 20, no. 18, p. 3699–3709, 2011.

APÊNDICES

Apêndice 1 – Termo de consentimento livre e esclarecido – Grupo DMRI

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 Hospital São Geraldo/UFMG e/ou Instituto da Visão, onde serão coletados

dados da história clínica, de acuidade visual, tonometria de aplanção, biomicroscopia e oftalmoscopia binocular indireta. Iremos coletar também uma pequena amostra de sangue (5 mL) 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 55 anos, com DMRI (forma seca ou exsudativa) para o grupo caso e sem DMRI para o grupo controle.

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 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 NO GENE VEGF COM A DEGENERAÇÃO MACULAR RELACIONADA À IDADE ”.

Belo Horizonte, _____ de _____ de _____.

Assinatura do paciente: _____

Assinatura da testemunha: _____

Assinatura do pesquisador: _____

Apêndice 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido – Grupo controle

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – GRUPO CONTROLE

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 como colaborador participante do grupo controle, uma vez que você **não é portador da doença em questão, a DMRI**. 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 (DMRI).

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 Hospital São Geraldo / UFMG e/ou Instituto da Visão, onde serão coletados dados da história clínica, de acuidade visual, tonometria de aplanção, biomicroscopia e oftalmoscopia binocular indireta. Iremos coletar também uma pequena amostra de sangue (5 mL) através de punção venosa previamente a cirurgia de catarata, a qual você será submetido, utilizando a mesma punção que é feita de rotina para a realização deste procedimento cirúrgico. 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) para o grupo caso. Será necessário também a inclusão de pacientes sem DMRI para o grupo controle, para que se possa comparar os resultados dos exames laboratoriais e permitir a comprovação da relação entre os polimorfismos genéticos e a DMRI.

Benefícios: Não haverá benefício direto com sua participação nesta pesquisa. Entretanto 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 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 Visã 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: _____

Apêndice 3 – Ficha de atendimento – Grupo DMRI

**ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS COM A
DEGENERAÇÃO MACULAR RELACIONADA À IDADE – GRUPO
DMRI**

Identificação

Data:

Nome: _____ **Nº:** _____

Nacionalidade: _____

Telefone: _____

Data de Nascimento: _____

Idade: _____

Sexo:

- Masculino (1)
 Feminino (2)

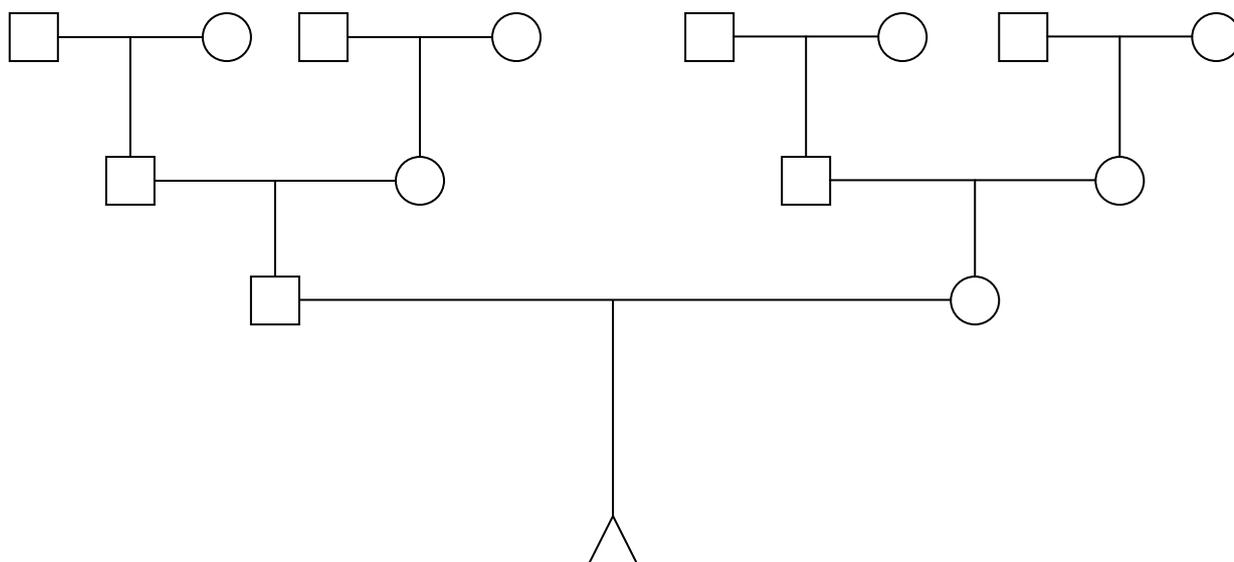
Peso: _____

Altura: _____

Raça:

- Leucodérmico (1)
 Faiodérmico (2)
 Melanodérmico (3)

Descendência:



Anamnese

HDA:

Idade do diagnóstico: _____

Sintoma: _____

APO:

APG:

- (1) Tabagismo – tempo/dose:
- (2) Etilismo
- (3) Hipertensão
- (4) Diabetes
- (5) Colesterol Total (HDL: _____/LDL: _____)
- (6) Outros:
- (7) NDN

AF:

- (1) DMRI
- (2) Outros
- (3) NDN

Exame oftalmológico

AV c/c:

BIOM:

- | OD | OE |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> S/ Alterações | <input type="checkbox"/> S/ Alterações |
| <input type="checkbox"/> Catarata: | <input type="checkbox"/> Catarata: |
| <input type="checkbox"/> Pseudofacia | <input type="checkbox"/> Pseudofacia |
| <input type="checkbox"/> DVP Parcial | <input type="checkbox"/> DVP Parcial |
| <input type="checkbox"/> DVP Total | <input type="checkbox"/> DVP Total |
| <input type="checkbox"/> DVP não avaliado | <input type="checkbox"/> DVP não avaliado |
| <input type="checkbox"/> Outros | <input type="checkbox"/> Outros |

PIO:

OD:

OE:

FO:

OD:

OE:

TABLE 1
The Clinical Age-Related Maculopathy Staging System (CARMS)

Grade of Maculopathy	Clinical Features
1	No drusen or <10 small drusen without pigment abnormalities
2	Approximately ≥ 10 small drusen or <15 intermediate drusen, or pigment abnormalities associated with ARM <ol style="list-style-type: none"> Drusen RPE changes (hyperpigmentation and hypopigmentation) Both drusen and RPE changes
3	Approximately ≥ 15 intermediate drusen or any large drusen <ol style="list-style-type: none"> No drusenoid RPED Drusenoid RPED
4	Geographic atrophy with involvement of the macular center, or noncentral geographic atrophy at least 350 μm in size
5	Exudative AMD, including nondrusenoid pigment epithelial detachments, serous or hemorrhagic retinal detachments, CNVM with subretinal or sub-RPE hemorrhages or fibrosis, or scars consistent with treatment of AMD <ol style="list-style-type: none"> Serous RPED, without CNVM CNVM or disciform scar

AMD = age-related macular degeneration; ARM = age-related maculopathy; CNVM = choroidal neovascular membrane; RPE = retinal pigment epithelium; RPED = retinal pigment epithelial detachment. Small = drusen < 63 μm in diameter located within 2 disc diameters (DDs) of the center of the macula; intermediate = drusen $\geq 63 \mu\text{m}$ but < 125 μm , located within 2 DDs of the center of the macula; large = drusen $\geq 125 \mu\text{m}$ in diameter located within 2 DDs of the center of the macula; drusenoid RPED = confluent soft drusen $\geq 500 \mu\text{m}$ in size. Reprinted from Seddon et al¹⁰⁹ with permission of *Ophthalmology*. See accompanying Fig. 1.

Exame Complementar

AFG:

- | | |
|---|---|
| OD | OE |
| <input type="checkbox"/> (1) | <input type="checkbox"/> (1) |
| <input type="checkbox"/> (2) | <input type="checkbox"/> (2) |
| <input type="checkbox"/> (3) | <input type="checkbox"/> (3) |
| <input type="checkbox"/> (4) | <input type="checkbox"/> (4) |
| <input type="checkbox"/> MNVSR predominantemente clássica (5) | <input type="checkbox"/> MNVSR predominantemente clássica (5) |
| <input type="checkbox"/> MNVSR minimamente clássica (6) | <input type="checkbox"/> MNVSR minimamente clássica (6) |
| <input type="checkbox"/> MNVSR oculta (7) | <input type="checkbox"/> MNVSR oculta (7) |
| <input type="checkbox"/> RAP (8) | <input type="checkbox"/> RAP (8) |
| <input type="checkbox"/> Polipoidal (9) | <input type="checkbox"/> Polipoidal (9) |
| <input type="checkbox"/> NDN (10) | <input type="checkbox"/> NDN (10) |

ICV:

- | | |
|--|--|
| OD | OE |
| <input type="checkbox"/> S/ Alterações (1) | <input type="checkbox"/> S/ Alterações (1) |
| <input type="checkbox"/> Hiperfluorescência em placa (>1 DP) (2) | <input type="checkbox"/> Hiperfluorescência em placa (>1 DP) (2) |
| <input type="checkbox"/> Hiperfluorescência em mancha ativa (3) | <input type="checkbox"/> Hiperfluorescência em mancha ativa (3) |
| <input type="checkbox"/> Lesões polidoidais (4) | <input type="checkbox"/> Lesões polidoidais (4) |
| <input type="checkbox"/> RAP (5) | <input type="checkbox"/> RAP (5) |
| <input type="checkbox"/> Não realizado | <input type="checkbox"/> Não realizado |

OCT:**OD**

- S/ Alterações (1)
- Atrofia EPR (2)
- Drusas (3)
- DEP seroso (4)
- DEP vascularizado (5)
- MNVSR ativa (6)
- MNVSR cicatrizada (7)
- DR seroso (8)
- Edema intrarretiniano (9)
- Não realizado

OE

- S/ Alterações (1)
- Atrofia EPR (2)
- Drusas (3)
- DEP seroso (4)
- DEP vascularizado (5)
- MNVSR ativa (6)
- MNVSR cicatrizada (7)
- DR seroso (8)
- Edema intrarretiniano (9)
- Não realizado

Exame Laboratorial

Apêndice 4 – Ficha de atendimento – Grupo controle

**ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS COM A
DEGENERAÇÃO MACULAR RELACIONADA À IDADE – GRUPO
CONTROLE**

Identificação

Data:

Nome: _____ **Nº:** _____

Nacionalidade: _____

Telefone: _____

Data de Nascimento: _____

Idade: _____

Sexo:

- Masculino (1)
 Feminino (2)

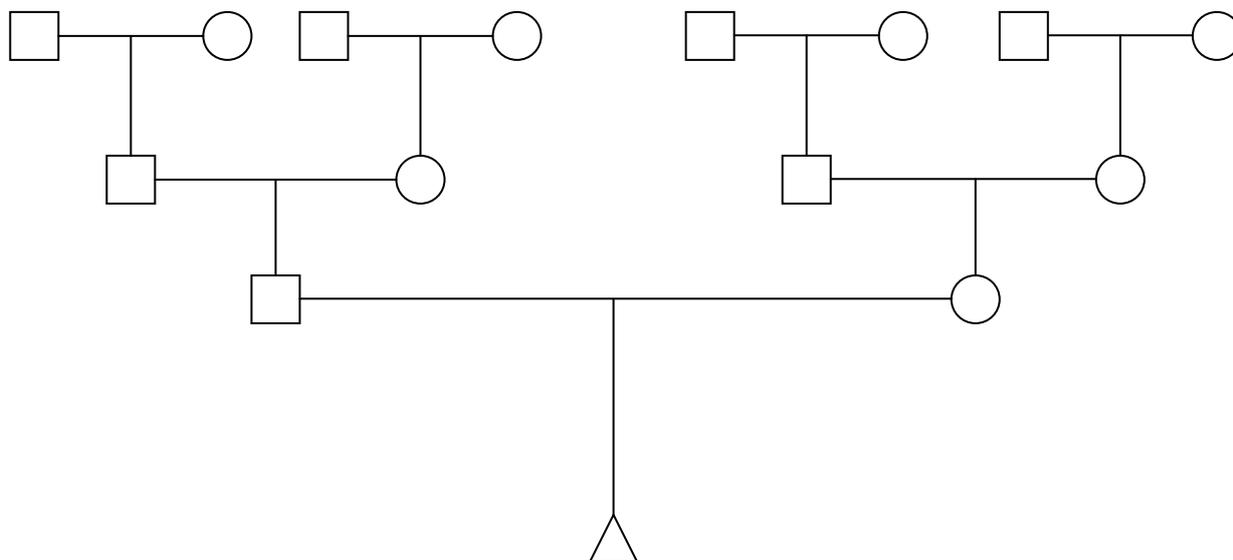
Peso: _____

Altura: _____

Raça:

- Leucodérmico (1)
 Faiodérmico (2)
 Melanodérmico (3)

Descendência:



Anamnese

HDA: _____

APO: _____

APG:

- Tabagismo – tempo/dose:
- Etilismo
- Hipertensão
- Diabetes
- Colesterol Total (HDL: _____/LDL: _____)
- Outros:
- NDN

AF:

- DMRI
- Outros
- NDN

Exame oftalmológico

AV c/c:

BIOM:

- | OD | OE |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> S/ Alterações | <input type="checkbox"/> S/ Alterações |
| <input type="checkbox"/> Catarata: | <input type="checkbox"/> Catarata: |
| <input type="checkbox"/> Pseudofacia | <input type="checkbox"/> Pseudofacia |
| <input type="checkbox"/> DVP Parcial | <input type="checkbox"/> DVP Parcial |
| <input type="checkbox"/> DVP Total | <input type="checkbox"/> DVP Total |
| <input type="checkbox"/> DVP não avaliado | <input type="checkbox"/> DVP não avaliado |
| <input type="checkbox"/> Outros | <input type="checkbox"/> Outros |

PIO:

OD:

OE:

FO:

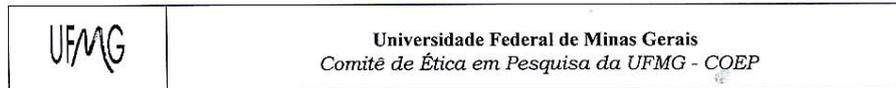
OD:

OE:

Exame Laboratorial

ANEXOS

Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)



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

Anexo 2 – Parecer do Comitê de Ética Médica Interno do 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

Belo Horizonte, 22 de Outubro 2007.

O Comitê de Ética Médica Interno do Instituto da Visão Avaliou o “*Associação de Polimorfismos Genéticos com a Degeneração Macular Relacionada à Idade Exudativa*”

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

Atenciosamente,

Dr. Márcio Bittar Nehemy
Presidente / Diretor
Instituto da Visão

Dr. Márcio Bittar Nehemy
CRM 10.526 - CPF 214.201.226-45

Anexo 3 – Parecer do Comitê de Ética do Centro Especializado em Olhos

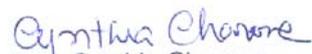


Belém, 25 de Novembro de 2008

O Comitê de Ética Médica interno do Centro Especializado em Olhos avaliou o "Associação de Polimorfismos Genéticos com a Degeneração Macular Relacionada à Idade Exudativa"

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética Médica do Centro Especializado em Olhos, o mesmo deve ser submetido ao comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais.

Atenciosamente,


Dra. Cynthia Charone
Diretora Clínica

Trav. Dom Romualdo de Seixas, 1942 . Nazaré
CEP: 66055-200 . Belém . PA . Tel: 3224-7870

Anexo 4 – Protocolo de extração de DNA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS – UFMG FACULDADE DE MEDICINA
LABORATÓRIO DE GENÉTICA MOLECULAR
POP : EXTRAÇÃO DE DNA (SANGUE TOTAL)

OBJETIVO: Realizar a extração de DNA do sangue total [método de Lahiri e Nurberger Junior (1991), modificado por Cavalli e outros (1996) e Salazar e outros (1998)].

Reagentes necessários:

- TKM1
- Triton X-100
- SDS 10%
- NaCl saturado
- Etanol absoluto
- Etanol 70%
- TE

Etapas:

1. Limpar a bancada com álcool 70%;
2. Homogeneizar delicadamente a amostra;
3. Transferir a amostra para um tubo falcon de 50 mL;
4. Adicionar um volume de TKM1 correspondente ao volume de sangue (responsável por retirar o excesso de plasma e hemácias da amostra);

Ex: 5 mL de sangue = 5 mL de TKM1

5. Adicionar Triton X-100 (efetua a lise celular);

O volume de triton vai variar de acordo ao volume de sangue:

- > 20 mL de sangue = 500 µL de Triton
- 20 mL de sangue = 400 µL de Triton
- < 20 mL de sangue = 300 µL de Triton

6. Agitar vigorosamente;
7. Centrifugue por 15 min. a 4° C (1000 x g);
8. Lentamente despreze o sobrenadante e salve o pellet;
9. Lave o pellet adicionando o mesmo volume de TKM1 do passo anterior (responsável pela retirada do Triton utilizado no passo anterior);
10. Agitar vigorosamente;
11. Centrifugar por 10 min. 4°C (800 x g);
12. Despreze o sobrenadante com cautela para evitar perdas do pellet;
13. Ressuspenda o mesmo em:

- 1600 µL de TKM2;
- 100 µL SDS 10% (lise de leucócitos);

TKM2 ≥ 20 mL de sangue = 4 mL de TKM2;
 15 mL de sangue = 2,4 mL de TKM2;
 10 mL de sangue = 1,6 mL de TKM2;

SDS (10%) ≥ 20 mL de sangue = 250 µL de SDS;
 15 mL de sangue = 150 µL de SDS;
 10 mL de sangue = 100 µL de SDS;

14. Agitar vigorosamente (fragmentar o pellet utilizando o vortex);
15. Incubar a 55°C no banho maria por 10 – 20 min;
16. Adicionar 900 µL de NaCl (6M) – nessa etapa as proteínas são precipitadas;

NaCl ≥ 20 mL de sangue = 1,5 mL de NaCl 6M;
 ≤ 15 mL de sangue = 0,8 mL de NaCl 6M;

17. Centrifugar por 15 min 4°C (1000 x g)
18. Transfira o sobrenadante para um tubo falcon de 15 mL contendo 5 mL de etanol absoluto;
19. Pesque o DNA com a pipeta Pasteur grande (vidro);
20. Retire a pipeta com DNA e a mergulhe em um tubo falcon de 15 mL com 300 µL de etanol 70%;

21. Remova a pipeta com DNA e deixe secar;
22. Ressuspenda o DNA em 500 μ L de TE;
23. Deixar incubando durante 2 dias a 55°C (banho maria);
24. Armazenar a 4°C;

Fazendo as soluções de TKM1 e TKM2:

	Estoque	TKM1 (500 mL)	TKM2 (500 mL)
Tris-HCl	1M, pH 7.6	5 mL	5 mL
KCl	1M	5 mL	5 mL
MgCl ₂	1M	5 mL	5 mL
EDTA	0,5M, pH 8.0	4 mL	4 mL
NaCl	5M	---	40 mL

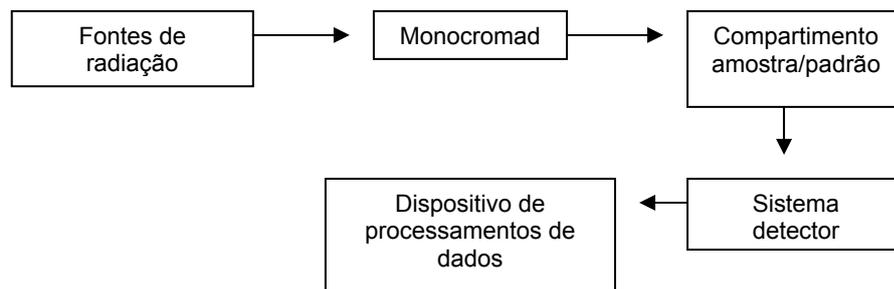
Anexo 5 – Protocolo de quantificação de DNA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS – UFMG
FACULDADE DE MEDICINA
LABORATÓRIO DE GENÉTICA MOLECULAR – DEPARTAMENTO DE SAÚDE MENTAL
POP : QUANTIFICAÇÃO DE DNA

OBJETIVO: Quantificar o DNA obtido pela extração através de espectrofotômetro;

- Espectrofotômetros são instrumentos capazes de registrar dados de absorvância ou transmitância em função do comprimento de onda;



Esquema dos principais componentes do espectrofotômetro

Preparando a solução:

- Identificar o eppendorf com o código da amostra;
- Com auxílio de uma pipeta, diluir a amostra 1:50, adicionando 98 μ L de água deionizada, com 2 μ L de amostra no eppendorf (0,5 mL) e homogeneizar;

Recipientes

São usados como recipientes cubas ou cubetas retangulares de vidro ou quartzo. As cubetas de vidro são usadas quando se trabalha na região do visível. Para a região do ultravioleta, devem-se usar as cubetas de quartzo, que são transparentes à radiação ultravioleta, pois o vidro absorve a mesma.



Cubeta convencional

Fazendo a análise:

1. Ligar o espectrofotômetro (botão Power)
2. Escolher a opção 1 (“Life Science”)
3. Escolher novamente a opção 1 (“DNA”)
4. Escolher os seguintes parâmetros:
 - Pathlength: 10 mm
 - Units: $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$
 - Dilution Factor: 50,0
 - Factor: 50,0
 - Background: ON
5. Selecionar OK!
6. Retirar a tampa do espectrofotômetro;
7. Retirar a cubeta (Submicro 50 μL) de sua caixa;
 - OBS.: Segurar a cubeta sempre na região fosca, evitando deixar resíduos (como, por exemplo, do talco da luva) na região onde o feixe de luz passa (superfície brilhante);
8. Com auxílio de uma pipeta, lavar a cubeta 2 vezes usando água deionizada;
 - Secar bem aspirando com a pipeta de 100 μL e depois com a pipeta de 10 μL ;
9. Colocar 100 μL de água deionizada na cubeta;
10. Posicionar a cubeta no equipamento de forma que o “Q” marcado em uma de suas faces fique direcionado para a seta marcada no bocal do espectrofotômetro (“Q” virado para o lado esquerdo)

11. Tampar o aparelho e pressionar o botão “OA/100%T” (zera a leitura/constitui o branco do processo);
12. Retirar novamente a tampa do espectrofotômetro, retirar o tubo e, com uma pipeta, retirar a água de dentro da cubeta;
 - Repetir o processo de secagem do item 8;
13. Colocar 100 μL da solução (amostra testada) na cubeta, posicioná-la como no item 10 e tampar o aparelho;
14. Pressionar o botão de análise (com o desenho da cubeta atravessada por uma seta);
15. Anotar a concentração ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$) e a relação A260/A280 registradas.
 - OBS: O DNA absorve luz na faixa de 260 nm. A relação 260/280 é realizada para averiguar a pureza da amostra (boa relação ~ 1,6 a 2,0). Valor menor que 1.6, provável contaminação por proteínas;
16. Destampar o aparelho e retirar a amostra da cubeta com a pipeta;
17. Lavar a cubeta 2 vezes com pipeta e água deionizada, secar bem com as pipetas (item 8);
18. Colocar 100 μL de nova solução;
19. Repetir passos 14, 15, 16, 17 e 18;
 - OBS: não esquecer de repetir item 8 (Lavar a cubeta 2 vezes com pipeta e água deionizada, secar bem com as pipetas) após cada solução;
20. Guardar a cubeta limpa em sua caixa com os lados brilhantes (local de passagem do feixe de luz) voltados para a espuma da caixa (maior proteção);
21. Desligar e tampar o espectrofotômetro;

As diluições serão realizadas posteriormente (dependendo da quantificação) para a obtenção de uma concentração final em torno de $60 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$.

Anexo 6 – Normas para publicação de artigos no periódico *Ophthalmic Epidemiology*

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Aims and Scope: *Ophthalmic Epidemiology* is dedicated to publication of original epidemiologic research into eye and vision health, with a focus in the fields of public health and prevention of blindness. The journal contains new information useful to a wide variety of specialists involved in ocular disciplines, such as ophthalmologists, epidemiologists, biostatisticians, public health officials, and governmental and other individuals concerned with ocular disease prevention and control and cost-effective health care delivery. Review articles should be discussed with the Editor in Chief prior to submission. Case series, animal research, and clinical reports are not appropriate for this journal.

Manuscripts must be submitted through the journal's Manuscript Central website, <http://mc.manuscriptcentral.com/nope>. *Ophthalmic Epidemiology* publishes original scientific articles, reviews, notes, letters, book reviews, and scientific notices on all subjects and topics related to ophthalmic epidemiology and public health: (1) Original full papers should be formatted as defined below and not exceed 4,000 words. (2) Shorter communications should not exceed 2,000 words. (3) Review articles require prior approval. (4) Letters to the editor should not exceed 500 words.

Each manuscript must be accompanied by a statement that it has not been published elsewhere and that it has not been submitted simultaneously for publication elsewhere. Authors are responsible for obtaining permission to reproduce copyrighted material from other sources and are required to sign an agreement for the transfer of copyright to the publisher. All accepted manuscripts, artwork, and photographs become the property of the publisher.

All parts of the manuscript should be typewritten, double-spaced, with margins of at least one inch on all sides. Number manuscript pages consecutively throughout the paper. Authors should also supply a shortened version of the title suitable for the running head, not exceeding 50 character spaces. Each article should be summarized in an abstract of not more than 250 words that includes Purpose (statement of the problem), Methods, Results, and Conclusions. Avoid abbreviations, diagrams, and reference to the text in the abstract. At least five key words should be given in alphabetical order after the abstract. Manuscripts should include a statement that the investigations were performed according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and that Institutional Review Board approval was obtained. If the manuscript is a clinical trial, a Consort flowchart should be included.

The text should be divided into the following sections:

ABSTRACT
INTRODUCTION
MATERIALS AND METHODS
RESULTS
DISCUSSION
ACKNOWLEDGEMENTS
REFERENCES
TABLES
FIGURES

References. Cite in the text by reference number. The references should be numbered consecutively as they occur in the text. Prepare a numbered reference list. Abstracts and articles submitted or in press are not proper references. These should be listed as personal communication. Examples:

Journal: Mohny BG, Robertson DM, Schomberg PJ. Second nonocular tumors in survivors of heritable retinoblastoma and prior radiation therapy. *Am J Ophthalmol.* 1998;126(2):269—277.

Book: Raven JC, Court JH, Raven J. *Manual for Raven's Progressive Matrices and Vocabulary Scales.* London: H.K. Lewis & Co. Ltd., 1986.

Contribution to a Book: Weinstein L, Swartz MN. Pathologic properties of invading microorganisms. In: Sodeman WA Jr, Sodeman WA, editors. *Pathologic Physiology, Mechanisms of Disease.* Philadelphia: Saunders, 1974; 457 —78.

Illustrations. Illustrations submitted (line drawings, halftones, photos, photomicrographs, etc.) should be clean originals or digital files. Digital files are recommended for highest quality reproduction and should follow these guidelines:

- 300 dpi or higher
- Sized to fit on journal page
- EPS, TIFF, or Non-layered PSD format only
- Submitted as separate files, not embedded in text files

Color illustrations will be considered for publication; however, the author will be required to bear the full cost involved in their printing and publication.

The charge for the first page with color is \$900.00. The next three pages with color are \$450.00 each. A custom quote will be provided for color art totaling more than 4 journal pages. Good-quality color prints should be provided in their final size. The publisher has the right to refuse publication of color prints deemed unacceptable.

Tables and Figures. Authors must submit a signed Copyright Transfer form before publication. This form may be found under the "Instructions and Forms" link at the top of any Manuscript Central page. Please complete this copyright form and return to the Informa Healthcare production team. Hard copies may be faxed to 212-561-6636. Scanned electronic copies can be emailed to felicia.ruocco@informausa.com.

Proofs. Page proofs are sent to the designated author using Taylor & Francis' EProof system. They must be carefully checked and returned within 48 hours of receipt.

Offprints/Reprints. The corresponding author of each article will receive one complete copy of the issue in which the article appears. Reprints of individual articles are available for order at the time authors review page proofs. A discount on reprints is available to authors who order before print publication.

Anexo 7 – Confirmação da resubmissão do Artigo 2 ao periódico Ophthalmic Epidemiology

Preview (NOPE-2012-0018)

From: ophthalmic.epi@sydney.edu.au

To: luciananfalmeida@gmail.com

CC:

Subject: Ophthalmic Epidemiology - Manuscript ID NOPE-2012-0018

Body: @@date to be populated upon sending@@

Dear Mrs. Almeida:

Your manuscript entitled "ASSOCIATION ANALYSIS OF CFH AND LOC387715 GENE POLYMORPHISMS IN A BRAZILIAN COHORT WITH AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Ophthalmic Epidemiology.

Your manuscript ID is NOPE-2012-0018.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <http://mc.manuscriptcentral.com/nope> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Centre after logging in to <http://mc.manuscriptcentral.com/nope>.

Thank you for submitting your manuscript to Ophthalmic Epidemiology.

Sincerely,

Kirsten Jakobsen
Managing Editor, Ophthalmic Epidemiology
ophthalmic.epi@sydney.edu.au

Date Sent: 30-Jan-2012