



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Sabrina Mayara Cezario

**Fatores Genéticos Relacionados a Lipídios,
Angiogênese e Inflamação na Degeneração
Macular Relacionada à Idade**

São José do Rio Preto
2015

**Fatores Genéticos Relacionados a Lipídios,
Angiogênese e Inflamação na Degeneração
Macular Relacionada à Idade**

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de São José do Rio Preto para
obtenção do Título de Mestre no Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Eixo
Temático: Medicina e Ciências Correlatas.**

Orientador: Prof. Dr. Rubens Camargo Siqueira

**São José do Rio Preto
2015**

Cezario, Sabrina Mayara
Fatores Genéticos Relacionados a Lipídios, Angiogênese e Inflamação na
Degeneração Macular Relacionada à Idade
Sabrina Mayara Cezario
São José do Rio Preto, 2015
166 p.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto –
FAMERP
Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientadora: Prof. Dr. Rubens Camargo Siqueira

1. Degeneração Macular; 2. Polimorfismo Genético; 3. Reação em Cadeia da
Polimerase; 4. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real; 5. Ensaio de
Imunoadsorção Enzimática.

Sabrina Mayara Cezario

**Fatores Genéticos Relacionados a Lipídios,
Angiogênese e Inflamação na Degeneração
Macular Relacionada à Idade**

BANCA EXAMINADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Rubens Camargo Siqueira

2º Examinador: _____

3º Examinador: _____

Suplentes: _____

São José do Rio Preto, 20/05/2015.

SUMÁRIO

Dedicatória.....	i
Agradecimentos Especiais.....	ii
Agradecimentos.....	iv
Epígrafe.....	v
Lista de Figuras	vi
Lista de Tabelas e Quadros.....	xiv
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	xix
Resumo.....	xxii
Abstract.....	xxiv
1. Introdução.....	01
1.1 Aspectos Epidemiológicos e Clínicos da Degeneração Macular Relacionada à Idade	01
1.2 Fatores de Risco para Degeneração Macular Relacionada à Idade.....	10
1.2.1 Fatores Genéticos Associados à Degeneração Macular Relacionada à Idade.....	13
1.3 Objetivo Geral.....	20
2. Casuística e Métodos.....	21
2.1 Casuística.....	21
2.2 Métodos.....	24
2.2.1 Extração de DNA.....	24
2.2.2 Análise Genotípica.....	25
2.2.3 Extração de RNA.....	33
2.2.4 Perfil Lipídico.....	35
2.2.5 Níveis Séricos por ELISA.....	35
2.2.6 Hábitos de Vida e Comorbidades.....	37

2.2.7 Análise estatística.....	37
3. Resultados.....	39
3.1 Perfil da Casuística.....	39
3.2 Análise de Polimorfismos Genéticos.....	39
3.3 Relação entre Polimorfismos Genéticos, Hábitos de Vida e Comorbidades.....	48
3.4 Análise de Expressão Gênica.....	57
3.5 Dosagem Sérica.....	59
3.6 Curva Receiver Operator Characteristic.....	64
3.7 Relação entre Dosagem Sérica e Perfil Genético.....	65
3.8 Perfil Lipídico.....	67
3.9 Relação de <i>APOE</i> -rs429358/rs7412 e <i>ABCA4</i> -rs472908 com Perfil Lipídico.....	69
4. Discussão.....	72
5. Conclusões.....	86
6. Referências Bibliográficas.....	87
7. Anexos.....	120
Anexo I – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FAMERP (CEP).....	120
Anexo II – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	121
Anexo III - Questionário Específico para Antecedentes Pessoais e Histórico Médico.....	122
8. Apêndice.....	123

*DEDICATÓRIA***Dedico este trabalho**

Aos meus pais de criação Antônio e Clarice
Cadamuro, não sei o que seria da minha vida sem
vocês.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A minhas irmãs Brendally e Thaynara Cezario e minhas sobrinhas Eduarda Distassi e Alice Campos, meu amor por vocês vai além dessa vida.

Ao meu noivo Jefferson Gimenez, que ao longo desses anos esteve sempre ao meu lado, me apoiando e incentivando. Obrigada por tudo, te amo.

A minha querida amiga /irmã Maria Clara Calastri, esse título é nosso! Obrigada por tudo, pelo companheirismo e amizade. Tenho certeza que em breve estaremos comemorando o seu! Amo você.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rubens Camargo Siqueira, pelo incentivo, apoio e credibilidade. Agradeço por acreditar no meu trabalho e contribuir para meu desenvolvimento científico. Muito obrigada pela oportunidade.

A Profa. Dra. Dorotéia Rossi Silva Souza, não existem palavras para expressar tamanha admiração, carinho e amor que tenho por você. Sempre incentivadora, de tão bom coração. Obrigada pelos ensinamentos diários. Falta no mundo pessoas como você.

A minha companheira e amada equipe de trabalho do NPBIM: Denise Poltronieri, Days Andrade, Tayanne Carmo, Rafael Fernandes, Sâmia Frahia, Maria Clara Calastri, Victor Nogueira, Gracieli Tenani, Vanessa Barbosa, Milton Barbosa, Michele Gregório, Marcela Pinhel, Simone Lima, Fernanda Gonçalves, Daniel Osti, Sara Oliveira, Camila Oliveira, Elisa Takinaga, Beatriz Brait, Angélica Lopes, Isabela Facincani, Joyce Martins. Minha segunda família, a alegria dos meus dias. Obrigada por tudo. Amo vocês.

A equipe LITEX, Camila Mazeti, Heloisa Caldas, Camila Ravazi, Natalia Fiorilli, Greiciani Florim, Cinthia Dias, Priscila e Carla Graça, por toda amizade e carinho que sempre recebi desde o início, vocês são muito importantes pra mim.

A todos os pesquisadores e funcionários do bloco U6 da FAMERP, que sempre foram solícitos em questão de ajuda. Obrigada por tudo!

A Dra. Carina Costa Cotrim e Dr. Rodrigo Jorge, pela parceria e ajuda nessa pesquisa. Obrigada por tudo.

A todas as funcionárias do Centro de Pesquisa Rubens Camargo Siqueira, por toda ajuda, dedicação e momentos de descontração nesses dois anos.

A meu afilhado Bruno, meu pequeno que tanto amo.

A minha família Cadamuro, que me acolheu e me deu tanto amor.

Aos meus sogros Mimar e Diogo Gimenez, por todo carinho. Amo vocês.

A Marcela Pinhel, minha eterna gratidão, carinho e amor. Obrigada por tudo.

A Antonio Luiz Cadamuro (*in memoriam*), amo você.

Ao Prof. Dr. Moacir Fernandes de Godoy pela sua disposição em suas explicações sobre os testes estatísticos e análise dos meus dados, pelo conhecimento sempre fornecido com carinho. Obrigada por tudo.

Ao Prof. Dr. Sidney Pinheiro Júnior pelo carinho que sempre teve comigo desde o início no laboratório.

A Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP e Hospital de Base - HB e seus dirigentes, pela cooperação e apoio.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da FAMERP, pela oportunidade oferecida, atenção, eficiência e por todo o suporte necessário.

Aos funcionários da Pós-Graduação – FAMERP, José Antônio Silistino, Fabiana Cristina Godoy, Luiz Henrique e Bruno Augusto Oliveira pela colaboração e carinho.

Aos funcionários, enfermeiras e residentes do Departamento de Oftalmologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP pelo auxílio na coleta de amostras biológicas dos pacientes. Muito obrigada.

Aos pacientes, familiares e cuidadores que contribuíram para a realização deste trabalho. Obrigada por entenderem a importância deste estudo e colaborarem com a nossa pesquisa.

Ao Santo Expedito, meu santo protetor, de quem sou devota, e que sempre me manteve firme na fé e na vida.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento da pesquisa, com bolsa de mestrado processo nº (2012/15041-1) e auxílio à pesquisa regular.

Agradeço a todas as pessoas que estiveram ao meu lado durante meu mestrado na FAMERP, àqueles que a mim dedicaram seu tempo, amizade e ajuda, pelos conselhos que me engrandeceram, pelo carinho e apoio que me ajudaram a crescer e a entender melhor o mundo da ciência. Muito Obrigada a todos que de alguma forma vivenciaram comigo minha vida acadêmica.

EPÍGRAFE

“Feche os olhos por dois minutos. Você verá como o tempo demora passar. Multiplique isso pelo resto de sua vida. Isto é cegueira. Doe seus olhos”.

(Autor desconhecido)

“A vida pode ser de fato, escuridão se não houver vontade, mas a vontade é cega se não houver sabedoria, a sabedoria é vã se não houver trabalho e o trabalho é vazio se não houver amor”.

(Khalil Gibran)

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Diagrama ilustrando a estrutura do olho humano e da retina. (A) Próximo ao centro do olho há uma área oval de 1,5 mm de diâmetro na retina, denominada mácula. (B) As estruturas afetadas na degeneração macular relacionada à idade estão na parte posterior da retina e incluem membrana de Bruch (MB), epitélio pigmentado da retina (EPR) e, secundariamente, fotorreceptores, além de vasos sanguíneos da coróide.⁽²⁶⁾ 04
- Figura 2. Imagem de retinografia colorida mostrando pontos brancos amarelados (seta), correspondentes à drusas em paciente com degeneração macular relacionada à idade na forma seca 06
- Figura 3. Imagem de fundo de olho mostrando grande cicatriz disciforme (seta) cobrindo a região macular em paciente com degeneração macular relacionada à idade na forma seca..... 07

LISTA DE FIGURAS

- Figura 4. Fluxograma ilustrando a distribuição dos grupos estudados, incluindo pacientes com degeneração macular relacionada à idade (DMRI) na forma seca e exsudativa e indivíduos sem a doença (grupo controle), e as respectivas análises realizadas. N=número de indivíduos; DNA= Ácido desoxirribonucleico; RNA= ácido ribonucleico; APOE= apolipoproteína E; ABCA4 e ABCR= ATP-triphosphate binding cassette transporte sub-family A-member 4; CFH = complemento do fator h; VEGF= fator de crescimento endotelial vascular..... 23
- Figura 5. Fotografia de gel de agarose 5% submetido a eletroforese para análise dos genótipos de *APOE*-rs429358/rs7412. Notam-se genótipos *APOE**2/3 na coluna 1, 2, 3 e 4, *APOE**2/4 na coluna 5. A coluna 6 apresenta uma amostra de DNA padrão (Ladder 10pb) (A). Padrão de bandas (perfil eletroforético) para o polimorfismo *APOE*- rs429358/rs7412; pb= pares de bases (B).... 28

LISTA DE FIGURAS

- Figura 6. Fotografia de gel de agarose 2% submetido a eletroforese para análise dos genótipos de *ABCA4*-rs472908. Notam-se genótipos *A/G* na coluna 1, 4, 6, 7, *A/A* na coluna 8, 9 e *G/G* na coluna 2, 3, 5. A coluna 10 apresenta uma amostra de DNA padrão (Ladder 10pb) (A). Padrão de bandas (perfil eletroforético) para o polimorfismo *ABCA4*-rs472908; pb= pares de bases (B)..... 29
- Figura 7. Fotografia de gel de agarose 2,0% submetido a eletroforese para análise dos genótipos de *CFH*- rs1061170. Notam-se genótipos *T/T* nas colunas 1, 3, 4 e *C/C* na coluna 2. A coluna 5 apresenta uma amostra de DNA padrão (Ladder 10pb) pb = pares de bases (A). Padrão de bandas (perfil eletroforético) para o polimorfismo *CFH*- rs1061170; pb= pares de bases (B)..... 30

LISTA DE FIGURAS

- Figura 8. Fotografia de gel de agarose 2,5 % submetido a eletroforese para análise dos genótipos de *VEGF*-rs3025039. Notam-se genótipos *C/C* nas colunas 1, 3, 4, 5, 7, 8 e *T/C* na coluna 2, 6, 9. A coluna 10 apresenta uma amostra de DNA padrão (Ladder 100pb – Fermentas) (A). Figura 8b. Padrão de bandas (perfil eletroforético) para o polimorfismo *VEGF*- rs3025039; pb= pares de bases (B)..... 31
- Figura 9. Fotografia de gel de agarose 2,5 % submetido a eletroforese para análise dos genótipos de *VEGF*-rs1570360. Notam-se genótipos *G/G* nas colunas 1, 2, 6, 7 e 10, *A/G* nas colunas 3, 4, 8 e 9 e *A/A* na coluna 5. A coluna 11 apresenta uma amostra de DNA padrão (Ladder 100pb – Fermentas) (A). Padrão de bandas (perfil eletroforético) para o polimorfismo *VEGF*-rs1570360; pb= pares de bases (B)..... 32

LISTA DE FIGURAS

- Figura 10. Fotografia da placa de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay-R&D Systems) com adição de amostras de soro e padrões em cada poço específico antes da adição do substrato tetrametilbenzidina..... 36
- Figura 11. Fotografia da placa de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay-R&D Systems) com adição de amostras de soro e padrões em cada poço específico depois da adição do substrato tetrametilbenzidina..... 36
- Figura 12. Valores de mediana, mínimo e máximo das dosagens séricas de proteínas (ng/mL/pg/mL) distribuídos de acordo com seus respectivos genótipos referentes aos polimorfismos *APOE*-rs429358/rs7412, *ABCA4*-rs472908, *CFH*-rs1061170, *VEGF*-rs3025039 e *VEGF*-rs1570360 em pacientes com degeneração macular relacionada à idade nas formas exsudativa (G1) e seca (G2), e indivíduos sem a doença (G3)..... 58

LISTA DE FIGURAS

Figura 13. Representação esquemática por “box-plot” de valores de medianas e quartis dos níveis séricos de apolipoproteína E (apo E) em pacientes com degeneração macular relacionada à idade nas formas exsudativa (G1) e seca (G2), e indivíduos sem a doença (G3). *outlier; G1: Q1=222,9ng/mL; Q3=306,8ng/mL; IQR=83,9ng/mL-2:Q1=174,7ng/mL; Q3=236,6ng/mL; IQR= 61,9ng/mL-G3: Q1=200,4ng/mL; Q3=292,1ng/mL; IQR=92,1ng/mL. Teste Mann-Whitney: G1xG2: P<0,0001; G2xG3: P=0,0002; G1xG3: P=0,035..... 60

LISTA DE FIGURAS

- Figura 14. Representação esquemática por “box-plot” de valores de medianas e quartis dos níveis séricos de ATP-triphosphate binding cassette transporte sub-family A-member 4 (ABCR) em pacientes com degeneração macular relacionada à idade nas formas exsudativa (G1) e seca (G2), e indivíduos sem a doença (G3). *outlier; G1: Q1=0,26ng/mL; Q3=0,36ng/mL; IQRRange: 0,10ng/mL - G2: Q1=0,22ng/mL; Q3=0,37ng/mL; IQRRange: 0,15ng/mL - G3: Q1=0,21ng/mL; Q3=0,3ng/mL; IQRRange: 0,09ng/mL. Teste Mann-Whitney: G1xG2: P=0,003; G1xG3: P<0,0001; G2xG3: P=0,632..... 61
- Figura 15. Representação esquemática por “box-plot” com valores de medianas e quartis dos níveis séricos de fator de complemento H (CFH) em pacientes com degeneração macular relacionada à idade nas formas exsudativa (G1) e seca (G2), e indivíduos sem a doença (G3). *outlier; G1: Q1=688,4ng/mL; Q3=1.745,4ng/mL; IQRRange:1.056,9ng/mL-G2: Q1=550,0ng/mL; Q3=1.206,3ng/mL; IQRRange: 656,3ng/mL - G3: Q1=341,9ng/mL; Q3=868,0ng/mL; IQRRange=526,1ng/mL. Teste de Mann-Whitney: G1xG3: P<0,001; G1xG2: P=0,0069; G2xG3: P=0,001..... 62

LISTA DE FIGURAS

Figura 16. Representação esquemática por “box-plot” com valores de medianas e quartis dos níveis séricos de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em pacientes com degeneração macular relacionada à idade nas formas exsudativa (G1) e seca (G2), e indivíduos sem a doença (G3). *outlier; G1: Q1=148,0pg/mL; Q3=459,7pg/mL; IQRRange: 311,7pg/mL - G2: Q1=124,9pg/mL; Q3=457,9g/mL; IQRRange:332,9pg/mL-G3: Q1=95,1pg/mL; Q3=412,5pg/mL; IQRRange=317,4pg/mL. Teste Kruskal Wallis: $P > 0,05$ 63

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1.	Perfil demográfico, hábitos de vida e comorbidades em pacientes com degeneração macular relacionada à idade nas formas exsudativa (G1) e seca (G2), e indivíduos sem a doença (G3).....	42
Tabela 2.	Distribuição das frequências alélicas e genotípicas para o polimorfismo <i>APOE</i> -rs429358/rs7412 em pacientes com degeneração macular relacionada à idade nas formas exsudativa (G1) e seca (G2), e indivíduos sem a doença (G3).....	43
Tabela 3.	Distribuição das frequências alélicas e genotípicas para o polimorfismo <i>ABCA4</i> -rs472908 em pacientes com degeneração macular relacionada à idade nas formas exsudativa (G1) e seca (G2), e indivíduos sem a doença (G3).....	44
Tabela 4.	Distribuição das frequências alélicas e genotípicas para o polimorfismo <i>CFH</i> -rs1061170 em pacientes com degeneração macular relacionada à idade nas formas exsudativa (G1) e seca (G2), e indivíduos sem a doença (G3).....	45
Tabela 5.	Distribuição das frequências alélicas e genotípicas para o polimorfismo <i>VEGF</i> -rs3025039 em pacientes com degeneração macular relacionada à idade nas formas exsudativa (G1) e seca (G2), e indivíduos sem a doença (G3)..	46

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 6.	Distribuição das frequências alélicas e genotípicas para o polimorfismo <i>VEGF</i> -rs1570360 em pacientes com degeneração macular relacionada à idade nas formas exsudativa (G1) e DMRI seca (G2), e indivíduos sem a doença (G3).....	47
Tabela 7.	Frequência de hábito tabagista distribuída de acordo com os genótipos dos polimorfismos <i>APOE</i> -rs429358/rs7412, <i>ABCA4</i> -rs472908, <i>CFH</i> -rs1061170, <i>VEGF</i> -rs3025039 e <i>VEGF</i> -rs1570360 em pacientes com degeneração macular relacionada à idade nas formas exsudativa (G1) e seca (G2), e indivíduos sem a doença (G3).....	49
Figura 8.	Fotografia de gel de agarose 2,5 % submetido a eletroforese para análise dos genótipos de <i>VEGF</i> -rs3025039. Notam-se genótipos <i>C/C</i> nas colunas 1, 3, 4, 5, 7, 8 e <i>T/C</i> na coluna 2, 6, 9. A coluna 10 apresenta uma amostra de DNA padrão (Ladder 100pb – Fermentas) (A). Figura 8b. Padrão de bandas (perfil eletroforético) para o polimorfismo <i>VEGF</i> -rs3025039; pb= pares de bases (B).....	51

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 9.	Frequência de hipertensão arterial sistêmica (HAS) distribuída de acordo com os genótipos dos polimorfismos <i>APOE</i> -rs429358/rs7412, <i>ABCA4</i> -rs472908, <i>CFH</i> -rs1061170, <i>VEGF</i> -rs3025039 e <i>VEGF</i> -rs1570360 em pacientes com degeneração macular relacionada à idade nas formas exsudativa (G1) e seca (G2), e indivíduos sem a doença (G3).....	53
Tabela 10.	Frequência de dislipidemia distribuída de acordo com os genótipos dos polimorfismos <i>APOE</i> -rs429358/rs7412, <i>ABCA4</i> -rs472908, <i>CFH</i> -rs1061170, <i>VEGF</i> -rs3025039 e <i>VEGF</i> -rs1570360 em pacientes com degeneração macular relacionada à idade nas formas exsudativa (G1) e seca (G2), e indivíduos sem a doença (G3).....	54
Tabela 11.	Frequência de índice de massa corporal (IMC) distribuída de acordo com os genótipos dos polimorfismos <i>APOE</i> -rs429358/rs7412, <i>ABCA4</i> -rs472908, <i>CFH</i> -rs1061170, <i>VEGF</i> -rs3025039 e <i>VEGF</i> -rs1570360 em pacientes com degeneração macular relacionada à idade nas formas exsudativa (G1) e seca (G2), e indivíduos sem a doença (G3).....	56

LISTA DE TABELAS E QUADROS

- Tabela 12. Valores de mediana, mínimo e máximo das dosagens séricas de proteínas (ng/mL/pg/mL) distribuídos de acordo com seus respectivos genótipos referentes aos polimorfismos *APOE*-rs429358/rs7412, *ABCA4*-rs472908, *CFH*-rs1061170, *VEGF*-rs3025039 e *VEGF*-rs1570360 em pacientes com degeneração macular relacionada à idade nas formas exsudativa (G1) e seca (G2), e indivíduos sem a doença (G3)..... 66
- Tabela 13. Valores de mediana, mínimo e máximo para perfil lipídico em pacientes com degeneração macular relacionada à idade nas formas exsudativa (G1) e seca (G2), e indivíduos sem a doença (G3)..... 67
- Tabela 14. Frequência de perfil lipídico alterado em pacientes com degeneração macular relacionada à idade nas formas exsudativa (G1) e seca (G2), e indivíduos sem a doença (G3)..... 68
- Tabela 15. Valores de mediana, mínimo e máximo para perfil lipídico distribuídos de acordo com os genótipos para o polimorfismo *APOE*-rs429358/rs7412 em pacientes com degeneração macular relacionada à idade nas formas exsudativa (G1) e seca (G2), e indivíduos sem a doença (G3)..... 70

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 16.	Valores de mediana, mínimo e máximo para perfil lipídico distribuído de acordo com os genótipos para o polimorfismo <i>ABCA4</i> -rs472908 em pacientes com degeneração macular relacionada à idade nas formas exsudativa (G1) e seca (G2), e indivíduos sem a doença (G3).....	71
Quadro 1.	Primers, etapas de amplificação e eletroforese dos polimorfismos <i>APOE</i> -rs429358/rs7412, <i>CFH</i> -rs1061170, <i>ABCA4</i> -rs472908 e <i>VEGF</i> -rs3025039/rs1570360.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
<	Menor
>	Maior
≤	Menor ou igual
≥	Maior ou igual
μL	Microlitro
μL	Microlitro
A	Alelo selvagem para <i>ABCA4</i>
A	Alelo mutante para <i>VEGF</i> -rs1570360
A/A	Genótipo homozigoto selvagem para <i>ABCA4</i>
A/A	Genótipo homozigoto mutante para <i>VEGF</i> -rs1570360
A/G	Genótipo heterozigoto para <i>ABCA4</i>
A/G	Genótipo heterozigoto para <i>VEGF</i> -rs1570360
ABCA	<i>ATP-triphosphate binding cassette transporte sub-family A</i>
<i>ABCA4</i>	<i>ATP-triphosphate binding cassette transporte sub-family A -member 4</i>
ABCR	proteína transmembrana
AF	Angiografia com fluoresceína
AG	Atrofia geográfica
<i>APOE</i>	Apolipoproteína E
<i>APOE*</i> _{/4}	Genótipo heterozigoto mutante para <i>APOE</i>
<i>APOE*</i> _{/4}	Genótipo heterozigoto mutante para <i>APOE</i>
<i>APOE</i> * ₂	Alelo E2 para apolipoproteína E
<i>APOE</i> * ₂	Alelo E2 para apolipoproteína E
<i>APOE</i> * ₃	Alelo E3 para apolipoproteína E
<i>APOE</i> * _{3/3}	Genótipo homozigoto selvagem para <i>APOE</i>
<i>APOE</i> * ₄	Alelo E4 para apolipoproteína E
arCRD	Distrofia de cones e bastonetes - autossômica recessiva
AREDS	Age-Related Eye Disease Study
arRP	Retinose pigmentar - autossômica recessiva
arSTGD	Doença de Stargardt – autossômica recessiva
ATP	Adenosina trifosfato
ATP	Trifosfato de adenosina
bFGF	Fator de crescimento de fibroblastos básico
C	Alelo mutante para <i>CFH</i>
C	Alelo selvagem para <i>VEGF</i> -rs3025039
C/C	Genótipo homozigoto mutante para <i>CFH</i>
C/C	Genótipo selvagem para <i>VEGF</i> -rs3025039
C/T	Genótipo heterozigoto para <i>CFH</i>
CAAE	Certificado de apresentação para apreciação ética
CC	Coriocapilar da coróide
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CFH	Complemento do fator H
CT	Colesterol total

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

DMRI	Degeneração macular relacionada à idade
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos fosfatados (A, G, T e C)
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent Assay
EPR	Epitélio pigmentado da retina
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Fem.	Sexo feminino
<i>G</i>	Alelo mutante para <i>ABCA4</i>
<i>G</i>	Alelo selvagem para <i>VEGF-rs1570360</i>
<i>G/G</i>	Genótipo homozigoto mutante para <i>ABCA4</i>
<i>G/G</i>	Genótipo selvagem para <i>VEGF-rs1570360</i>
G1	Pacientes com degeneração macular relacionada seca
G2	Pacientes com degeneração macular relacionada exsudativa
G3	Indivíduos controle (sem a doença)
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HB	Hospital de base
HDLc	Fração de colesterol de lipoproteína de alta densidade
HW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
IBGE	Instituto brasileiro de geografia e estatística
IMC	Índice de massa corporal
IMC	Índice de Massa Corporal
Kg	Quilo grama
kg	Quilograma
L	Litro
LDLc	Fração de colesterol de lipoproteína de baixa densidade
Mas.	Sexo masculino
MB	Membrana de Bruch
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mmol	Milimolar
N	Número
N	Número de indivíduos
NaCl	Cloreto de sódio
NCBI	National Center for Biotechnology
ng	Nanograma
NVC	Neovascularização coroidal
°C	Graus celsius

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

OCT	Tomografia de coerência ótica
OR	<i>Odds ratio</i>
P	Probabilidade de significância
P1	<i>Primer sense</i>
P2	<i>Primer antisense</i>
pb	Pares de Base
PCR	Polimerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)
PCR/RT	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
pH	Potencial hidrogeniônico
PIGF	Fator de crescimento placentário
PIGF-1	Fator de crescimento placentário-1
PIGF-2	Fator de crescimento placentário-2
PRN	Pro re nata
RD	Retinopatia diabética
RFLP	Polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotação por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SISVAN	Protocolos do Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional
SNP	Polimorfismo de base única
<i>T</i>	Alelo selvagem para <i>CFH</i>
<i>T</i>	Alelo mutante para <i>VEGF</i> -rs3025039
<i>T/C</i>	Genótipo heterozigoto para <i>VEGF</i> -rs3025039
<i>T/T</i>	Genótipo homozigoto selvagem para <i>CFH</i>
<i>T/T</i>	Genótipo mutante para <i>VEGF</i> -rs3025039
TG	Triglicérides
V	Volts
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
VEGF-A	Fator de crescimento endothelial vascular-A
VEGF-B	Fator de crescimento endothelial vascular-B
VEGFR	Receptor de VEGF
VLDLc	Fração de colesterol de lipoproteína de muito baixa densidade
WHO	World Health Organization
X ²	Qui-quadrado
$\Delta\Delta Ct$	Delta Delta CT
μm	Micrómetro

RESUMO

Introdução – Degeneração macular relacionada à idade (DMRI) é uma doença complexa. A identificação de fatores de risco poderá contribuir no seu prognóstico e tratamento. **Objetivos** – Avaliar a influência de variantes genéticas, relacionadas com o metabolismo de lipídios, angiogênese e inflamação e sua relação com perfil clínico e lipídico e hábitos de vida, além das respectivas expressões gênicas em pacientes com DMRI. **Casuística e Métodos** – Foram estudados 333 indivíduos com idade ≥ 50 anos, sendo 108 com DMRI na forma exsudativa (G1); 45 com DMRI na forma seca (G2) e 180 indivíduos sem sinais clínicos e angiográficos da doença (G3). Os polimorfismos de apolipoproteína E (*APOE*-rs429358/rs7412), *triphosphate binding cassette transporte sub-family A-member 4* (*ABCA4*-rs472908), complemento do fator H (*CFH*-rs1061170) e fator de crescimento endotelial vascular (*VEGF*-rs3025039/rs1570360) foram analisados por PCR/RFLP (*polymerase chain reaction/restriction fragments length polymorphism*), enquanto as respectivas expressões gênicas no sangue por PCR/RT (*reverse transcription-PCR*) e níveis séricos de apo E, ABCR, CFH, VEGF por ELISA (*enzyme linked immuno sorbent assay*). Dados de perfil clínico e lipídico, além de hábitos de vida, foram obtidos em prontuário médico e questionário. Admitiu-se nível de significância para $P < 0,05$. **Resultados** – Hipertensão arterial sistêmica (HAS) e tabagismo prevaleceram em pacientes com DMRI exsudativa ($P < 0,05$). Polimorfismos genéticos: *APOE*-rs429358/rs7412–*APOE**3/3 destacou-se em todos os grupos, seguido de *APOE**3/4, assim como o alelo *APOE**4 ($P > 0,05$). *ABCA4*-rs472908–O genótipo A/G foi mais frequente em G3 (68%) versus G2 (44%; $P < 0,0001$), enquanto A/A em G2 (36%) versus G1 (19%; $P = 0,043$) e G3 (14%; $P = 0,003$). O genótipo mutante (G/G) prevaleceu na combinação (G1+G2) versus G3 ($P < 0,0001$), e o alelo G em todos os

grupos ($P>0,05$). CFH-rs1061170–O homozigoto selvagem (*TT*) destacou-se em G3 (58%) versus G1 (39%, $P=0,003$); já o homozigoto mutante (*CC*) em G1 (27%) versus G3 (14%; $P=0,002$), e o alelo *T* em G3 (0,72) versus G1 (0,56; $P=0,0002$). VEGF-rs3025039–Distribuição genotípica e alélica semelhante entre os grupos ($P>0,05$), destacando-se o genótipo *CC* e alelo *C*. VEGF-rs1570360–Homozigoto mutante (*A/A*) prevaleceu em G2 (21%) versus G1 (5%; $P=0,002$) e G3 (8%; $P=0,015$), assim como o alelo selvagem (*G*) em G1 (0,75) e G3 (0,71) versus G2 (0,57; $P=0,004$; $P=0,020$, respectivamente). Expressão gênica–Valores semelhantes entre os grupos para todos os genes analisados ($P>0,05$). Níveis séricos (valores de mediana em ng/mL)–ApoE–Aumento em G1 (270,6) versus G2 (196,5; $P<0,0001$) e G3 (242,8; $P=0,035$), e G3 versus G2 ($P=0,0002$). ABCR–Níveis elevados em G1 (0,30) versus G2 (0,25; $P=0,003$) e G3 (0,25; $P<0,0001$). CFH–Aumento em G1 (1.198,9) versus G2 (859,8; $P=0,0069$), ambos com acréscimo em relação a G3 (618,3; $P<0,001$; $P=0,001$, respectivamente). VEGF–Valores semelhantes entre os grupos ($P>0,05$). Perfil lipídico–G3 mostrou valor mais elevado de HDLc (mediana=71mg/dL), comparado a G2 (60mg/dL) e G1 (45mg/dL) ($P=0,003$; $P=0,029$, respectivamente). **Conclusão** – Variantes genéticas de *ABCA4*, *VEGF* e *CFH*, além de HAS, tabagismo e nível sérico elevado de apoE, ABCR e CFH associam-se a DMRI, enquanto a expressão dos referidos genes não diferencia DMRI exsudativa e seca, em contrapartida *CFH* (homozigoto selvagem) tem caráter protetor, assim como nível sérico de HDLc.

Palavras-Chave: Degeneração Macular; Polimorfismo Genético; Reação em Cadeia da Polimerase; Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real; Ensaio de Imunoabsorção Enzimática.

ABSTRACT

Background - Age-related macular degeneration (AMD) is a complex disease. The identification of risk factors may contribute to the prognosis and treatment.

Objectives – Evaluate the influence of genetic variants related to lipid metabolism, angiogenesis and inflammation and its relation with clinical and lipid profile and

Casuistic and Methods –

We studied 333 individuals aged ≥ 50 years, 108 with AMD in exudative form (G1); 45 with AMD in dry form (G2), and 180 individuals without clinical and angiographic

signs of the disease (G3). The polymorphisms of apolipoprotein E (*APOE*-rs429358/rs7412), *triphosphate binding cassette sub -family A transport -member 4*

(*ABCA4*-rs472908), complement factor H (*CFH*-rs1061170) and vascular endothelial growth factor (*VEGF*-rs3025039/rs1570360) were analyzed by PCR/RFLP (polymerase

chain reaction/restriction fragments length polymorphism), while the respective gene expression in blood by PCR/RT (reverse transcription-PCR) and serum levels of apo E,

ABCR, CFH, VEGF by ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay). Clinical and lipid profile data in addition to lifestyle were obtained from medical records and

questionnaire. Level of significance was accepted for $P < 0.05$. **Results** – Systemic arterial hypertension (SAH) and smoking prevailed in patients with AMD exudative

form ($P < 0.05$). Genetic polymorphisms: *APOE*- rs429358/rs7412 - *APOE**3/3 was noted in all groups, followed by *APOE**3/4, as well *APOE**4 ($P > 0.05$).

ABCA4-rs472908 - Genotype A/G was more frequent in G3 (68%) versus G2 (44%; $P < 0.0001$), while A/A in G2 (36%) versus G1 (19%; $P = 0.04$) and G3 (14%; $P = 0.003$).

The mutant genotype (G/G) prevailed in combination (G1+G2) versus G3 ($P < 0.0001$), and allele G in all groups ($P > 0.05$). *CFH*-rs1061170 – The wild homozygous (*TT*) was

in evidence in G3 (58%) versus G1 (39%, $P=0.003$); as well the homozygous mutant (CC) in G1 (27 %) versus G3 (14%; $P=0.002$) and allele T in G3 (0.72) versus G1 (0.56; $P=0.0002$). VEGF-rs3025039 – Genotypic and allelic distribution were similar between groups ($P>0.05$), highlighting the CC genotype and allele C. VEGF-rs1570360 – Mutant homozygote (A/A) prevailed in G2 (21%) versus G1 (5%; $P=0.002$) and G3 (8%; $P=0.015$) as well as the wild type allele (G) G1 (0.75) and G3 (0.71) versus G2 (0.57, $P=0.004$, $P=0.020$, respectively). Gene expression – Similar values between groups for all analyzed genes ($P>0.05$). Serum levels (median values in ng/mL) – ApoE– Increased level in G1 (270.6) versus G2 (196.5; $P<0.0001$) and G3 (242.8; $P=0.035$), and G3 versus G2 ($P=0.0002$). ABCR – High levels in G1 (0.30) versus G2 (0.25; $P=0.003$) and G3 (0.25, $P<0.0001$). CFH – Increase in G1 (1198.9) versus G2 (859.8; $P=0.0069$), both higher than in G3 (618.3; $P<0.001$, $P=0.001$, respectively). VEGF – Similar values between groups ($P>0.05$). Lipid profile – G3 showed the highest level of HDLc (median=71mg /dL), compared to G2 (60mg/dL), and G1 (45mg/dL; $P=0.003$, $P=0.029$, respectively). **Conclusion** – Genetic variants of *ABCA4*, *VEGF* and *CFH*, besides SAH, smoking and increased serum levels of apo E, ABCR and CFH are associated with AMD, whereas the expression of the respective genes not differentiate AMD exudative and dry forms, in contrast *CFH* (homozygous wild-type) has a protective character, as well as serum levels of HDLc .

Keywords: Macular degeneration; Genetic polymorphism; Polymerase chain reaction; Real time polymerase chain reaction ; Enzyme linked immunosorbent assay

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Epidemiológicos e Clínicos da Degeneração Macular Relacionada à Idade

O olho humano apresenta na superfície interna uma membrana delgada, flexível e delicada, a retina.⁽¹⁾ É constituída por cones, bastonetes, redes neuronais complexas e epitélio pigmentado da retina (EPR). Essas camadas são responsáveis pela codificação da luz em sinais neuronais para a visão, através de um processo denominado fototransdução.⁽²⁾

Fotorreceptores, interligados com o EPR, são células especializadas responsáveis em iniciar essa cascata de eventos,⁽²⁾ o que é fundamental para reciclagem dos retinóides na fototransdução.⁽³⁾ As células EPR secretam uma série de fatores de crescimento e imunossupressores que auxiliam na manutenção da integridade estrutural do endotélio coriocapilar e dos fotorreceptores.⁽⁴⁾ Tendo em vista todas às características multifuncionais das células EPR, a falha de qualquer uma dessas funções pode provocar degeneração da retina, perda gradual da acuidade visual e, até mesmo, cegueira.⁽⁵⁾

O envelhecimento é um processo associado à capacidade funcional e evolutiva do ser humano, com maior vulnerabilidade do organismo no decorrer do tempo. O aumento da expectativa de vida nos últimos anos tem elevado significativamente o número de idosos. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística,⁽⁶⁾ a população idosa tende a aumentar no Brasil. Estimativas mostram que esse percentual deve passar de 14,9 milhões (7,4% do total), em 2013, para 58,4 milhões (26,7% do total), em 2060. Inúmeras doenças estão relacionadas com a idade avançada incluindo câncer, artrite, doenças cardiovasculares e doenças degenerativas com destaque para degeneração macular relacionada à idade (DMRI).⁽⁷⁻⁹⁾

A DMRI, descrita inicialmente em 1903 por Oeller, e considerada em 1926 por Junius e Kunt como a principal causa de cegueira no mundo,⁽¹⁰⁾ é uma doença de início tardio e multifatorial. Caracteriza-se pela formação de depósitos extracelulares ricos em lipídios, inflamação localizada e neurodegeneração na parte central da retina, denominada mácula lútea. Esta se manifesta com a perda progressiva e irreversível da visão central em indivíduos acima de 50 anos de idade,^(3,11-12) afetando mundialmente 8,7% dos idosos,⁽⁸⁾ com estimativa de 196 milhões em 2020, e 288 milhões em 2040.⁽¹³⁾

No Brasil, são escassos estudos epidemiológicos de DMRI. Medina (1997)⁽¹⁴⁾ relatou prevalência de 13,9% em idosos moradores da cidade de São Paulo. Já Klein et al. (2007)⁽¹⁵⁾ detectaram 15,1% de casos em 478 descendentes de japoneses no Paraná. Contudo, baseando-se em dados norte-americanos e no censo brasileiro de 2010, estima-se cerca de 4.150.000 portadores de DMRI no país,⁽⁶⁾ o que representaria 5% dos casos de cegueira no Brasil.⁽¹⁶⁻¹⁷⁾

A prevalência da DMRI varia entre os diferentes grupos étnicos, entretanto, todas as formas da doença destacam-se em populações caucasianas (1,9% a 3,5%), comparado a não brancos (0,19% a 1,4%),⁽¹⁸⁾ sendo até nove vezes maior em brancos do que em afro-americanos.⁽¹⁹⁾ Na população latino-americana estudos mostram prevalência de 2,4% a 16,4% em indivíduos com idade superior a 50 anos.⁽²⁰⁾

A DMRI, por ser uma doença complexa, requer definição universal e uniforme para entendimento de etiologia, risco predito, identificação de fatores de risco, progressão, e também para comparação entre diferentes estudos.⁽²¹⁾ O sistema de classificação mais comumente usado está baseado no critério do estudo de doença do olho relacionado à idade (AREDS - *Age-Related Eye Disease Study*, 2001),⁽²²⁾ o qual

utiliza fotografias de fundo de olho para extensiva classificação dos diferentes sub estágios da doença.

A mácula lútea, pequena porção central da retina, transmite ao cérebro 90% da informação visual, essencial para a observação de detalhes e resolução da imagem.⁽²³⁾ Com a idade avançada a DMRI se apresenta clinicamente com alterações no EPR, monocamada de células que se encontram entre os fotorreceptores e a membrana de Bruch (MB) (Figura 1), prejudicando a troca de nutrientes entre a coriocapilar da coróide (CC) e o EPR, com comprometimento funcional da retina.⁽²⁴⁾ Fotorreceptores, EPR, MB e CC são camadas de células envolvidas no processo da doença,^(8,25) sendo que o EPR forma a barreira hemato-retiniana externa e regula as trocas metabólicas locais.⁽²³⁾

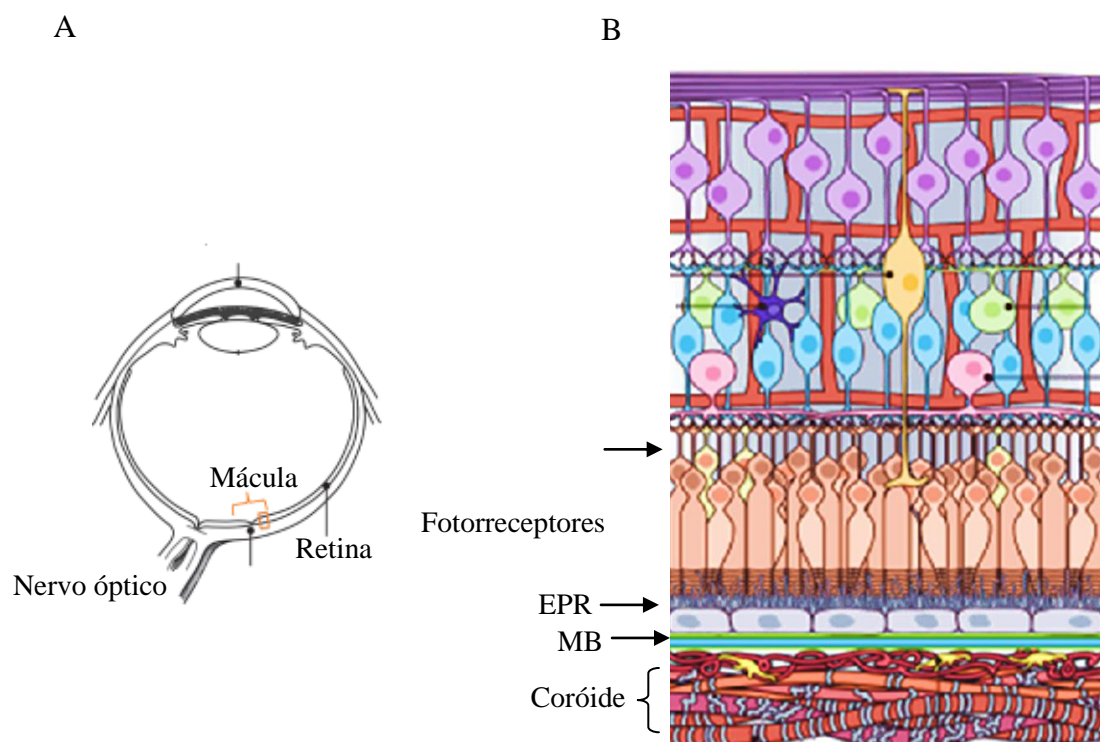


Figura 1. Diagrama ilustrando a estrutura do olho humano e da retina. (A) Próximo ao centro do olho há uma área oval de 1,5 mm de diâmetro na retina, denominada mácula. (B) As estruturas afetadas na degeneração macular relacionada à idade estão na parte posterior da retina e incluem membrana de Bruch (MB), epitélio pigmentado da retina (EPR) e, secundariamente, fotorreceptores, além de vasos sanguíneos da coróide.⁽²⁶⁾

A mácula é uma região especializada da retina, com aproximadamente 5-6 mm de diâmetro, contendo segmentos de neurônios denominados fotorreceptores (cones e bastonetes), cujos fosfolipídios são responsáveis pela iniciação da fototransdução, no entanto, estão expostos a mecanismos relacionados ao estresse oxidativo.⁽²⁷⁻²⁸⁾ Nesse caso, há produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) que podem reagir com proteínas e lipídios, alterando a estrutura química e, conseqüentemente, sua função.⁽²⁹⁾ O produto eliminado pelos fotorreceptores são fagocitados pelas células do EPR por degradação lisossomal, depois são eliminados para a coróide passando através da MB.

Quando a MB começa a ficar espessa, este produto começa a se acumular entre a MB e o EPR, causando as drusas.⁽²⁷⁾

A formação de drusas na região macular é o marcador para todos os fenótipos de DMRI. Drusas, caracterizadas como pigmentos amarelados, são depósitos extracelulares de proteínas e lipídios (incluindo os componentes do complemento) que se formam entre a lâmina basal do EPR e a camada interna colagenosa da MB, visíveis como pontos translúcidos sob a luz do biomicroscópio.⁽³⁰⁾

As drusas são classificadas morfológicamente como drusas duras (<63µm de diâmetro) e moles (> 125 µm de diâmetro com bordas indistintas).^(10,24) As drusas duras são elevações ou agregados de matriz extracelular, dispostas na superfície da MB, cujo desenvolvimento é influenciado pela apoptose.⁽²³⁾ A presença de poucas drusas duras não necessariamente é um fator de risco, entretanto, em grande quantidade podem resultar em DMRI.⁽³¹⁾ Assim, o tamanho e número de drusas podem ser correlacionados com a progressão da doença e utilizados como parâmetro na evolução da DMRI.⁽²⁷⁾ As drusas moles são depósitos na lâmina basal da MB, e à microscopia de luz aparecem como placas extensas em camadas de material granular mole. Deslocam, nesse caso, o EPR da superfície interna da MB e interferem nas trocas metabólicas da coriocapilar e EPR.⁽²³⁾

Clinicamente, a DMRI classifica-se em forma inicial e tardia.⁽³²⁻³³⁾ A primeira é caracterizada pela presença de drusas (≤ 10) associadas ou não com anormalidades do EPR, com hiper ou hipopigmentação⁽²⁴⁾ e sem comprometimento clínico da função visual na maioria dos casos. Porém, pode ocorrer atrofia geográfica ou formação de neovascularização coroidal (NVC), exsudação sub-retiniana e cicatriz fibrosa macular,

com baixa visão acentuada. A forma tardia pode se diferenciar em seca e/ou atrofia geográfica (AG) e exsudativa e/ou neovascular.⁽³⁴⁻³⁵⁾

A classificação da DMRI em seca ou exsudativa é uma consequência de dois processos que causam disfunção nos fotorreceptores. O primeiro é a AG, na qual ocorre atrofia confluyente do coriocapilar e EPR, com vasos coroidais visíveis e morte de células fotorreceptores. É caracterizada por espessamento da MB ao longo dos anos, acumulando depósitos extracelulares lipídicos e proteínas (drusas), dificultando assim a difusão de oxigênio e nutrientes às camadas externas da retina (Figura 2).⁽²⁴⁾ Mecanismos para o desenvolvimento da AG incluem isquemia, senescência, danos oxidativos e foto-oxidativos e inflamação, seja diretamente ou por mecanismos apoptóticos.^(13,36) AG pode ocorrer em ambas às formas da doença, porém é mais comum na forma seca.⁽³⁷⁾

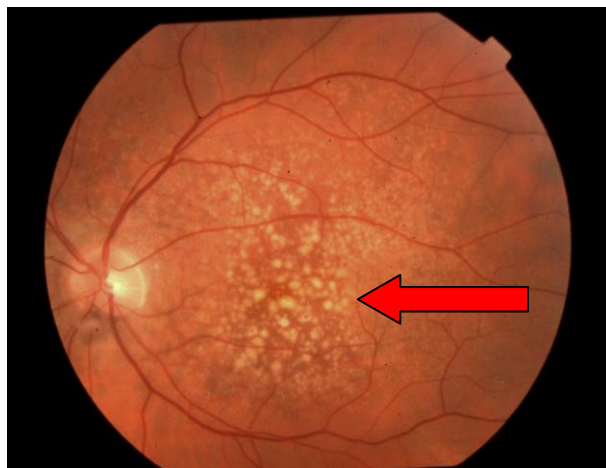


Figura 2. Imagem de retinografia colorida mostrando pontos brancos amarelados (seta), correspondentes à drusas em paciente com degeneração macular relacionada à idade na forma seca.

O segundo processo acontece na DMRI exsudativa (também conhecida como neovascular) e envolve a NVC, com crescimento de novos vasos oriundos da

coriocapilar abaixo do EPR, invadindo a retina. Estes neovasos friáveis e fenestrados permitem extravasamento de fluidos, lipídios e sangue dentro e abaixo da retina, resultando na exsudação, hemorragia e, conseqüentemente, formação de tecido fibroso (denominado de cicatriz disciforme), que define o estágio final da doença, ocasionando a perda da visão central em pacientes com DMRI^(24,30) (Figura 3). A forma exsudativa ocorre com menor frequência (15%) do que a seca (85%), mas é responsável por dois terços da perda visual significativa.^(30,38)



Figura 3. Imagem de fundo de olho mostrando grande cicatriz disciforme (seta) cobrindo a região macular em paciente com degeneração macular relacionada à idade na forma seca.

Os sintomas clínicos da doença incluem perda gradual da visão com presença de áreas borradas e escuras na visão central, distorção de imagens e linhas retas, além da diminuição da sensibilidade ao contraste. Desse modo, provoca impacto no estilo de vida dos pacientes por comprometer as atividades cotidianas, como ler e dirigir.^(8,23,39)

As ferramentas de diagnóstico para DMRI foram desenvolvidas ao longo dos últimos anos, tanto com elaboração de novos métodos de abordagem como melhoria daqueles já existentes. Angiografia com fluoresceína (AF) é um procedimento

minimamente invasivo que oferece vigilância fotográfica da circulação do sangue na retina e coróide, fornecendo dados sobre a doença de fundo de olho. Em pacientes com DMRI a avaliação por AF é necessária para confirmar a presença de NVC. Além disso, AF oferece detalhes sobre tamanho, localização e tipo (oculto ou clássico) de NVC, sendo útil no diagnóstico e classificação da doença e, também, no seguimento após tratamento.⁽⁴⁰⁾

A angiografia com indocianina verde é também outra ferramenta para o diagnóstico e consiste em procedimento semelhante à angiografia com fluoresceína. Entretanto, utiliza-se contraste de indocianina verde que, por meio de filtros infravermelhos especiais na câmera, é possível delimitar com maior definição os vasos da coróide e o ponto inicial da neovascularização.⁽⁴¹⁾

Outro exame atualmente utilizado é a tomografia de coerência ótica (OCT), um método de imagem não invasivo e de fácil execução, captura imagens *in vivo*, que representam secções transversais da retina. Imagens de OCT são capazes de detectar presença de NVC e acúmulo de fluido sub e intraretinal. Durante as últimas décadas, o manejo de DMRI neovascular tem mudado e a terapia anti-VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) é a escolha para todos os tipos de membrana vascular coroidal sub foveal.⁽⁴²⁾

Atualmente, o tratamento para DMRI exsudativa considerado padrão ouro são as drogas antiangiogênicas, incluindo bevacizumab, ranibizumab e aflibercept, utilizadas para bloquear as diferentes fases das vias de ação do VEGF. Representam importante avanço, com eficácia comprovada, visto que melhoram substancialmente o prognóstico dos pacientes e reduzem o risco de cegueira.⁽⁴³⁻⁴⁵⁾ Bevacizumab (Avastin®; Genentech Inc/Roche) e Ranibizumab (Lucentis ®; Genentech Inc./Novartis Pharma AG) são

anticorpos monoclonais recombinantes (RhuAbV2), que inibem todas as isoformas de VEGF-A de modo não seletivo. Embora Bevacizumab seja aprovada para o tratamento intravenoso de alguns carcinomas avançados e metastáticos, sua administração repetida intravítrea em casos de DMRI exsudativa também demonstra a capacidade de reduzir a exsudação vascular e bloquear NVC,⁽⁴⁶⁻⁴⁷⁾ mas ainda é considerado medicamento “off label” para uso intravítreo. Ranibizumab, por sua vez, devido ao baixo peso molecular (~ 48 kDa), a penetração intravítrea ocorre facilmente através das diferentes camadas da retina e exerce efeito inibidor sobre a permeabilidade vascular e angiogênese.⁽⁴⁸⁻⁴⁹⁾

Mais recentemente foi lançado Aflibercept (Eylea®; Regeneron Pharmaceuticals Inc./Bayer), uma proteína de fusão com ligação de afinidade elevada específica para os domínios dos receptores de VEGF (VEGF-A e VEGF-B) e o fator de crescimento placentário (PlGF-1 e PlGF-2), que se liga ao VEGF atuando como um receptor. Demonstra segurança e eficácia clínica para suprimir NVC em pacientes com a forma neovascular de DMRI, com durabilidade de ação em relação a outros anticorpos anti-VEGF intravítreos.⁽⁵⁰⁾ Com relação à posologia, Ranibizumab é mensalmente aplicado, enquanto Aflibercept são três injeções mensais inicialmente e após, a cada dois meses, intervalo estes determinados pelos estudos clínicos iniciais e posteriormente modificados com esquemas alternativos como PRN (pro re nata) com a injeção dada quando necessário e o esquema determinado para o tratamento.⁽⁵⁰⁾ Há referência de equivalência entre os efeitos de Ranibizumab e Bevacizumab na acuidade visual.⁽⁴³⁾

O tratamento da forma seca representa um desafio, pois não existe terapia aprovada disponível para os pacientes. Vitaminas antioxidantes são a única opção de tratamento atualmente disponível no início de DMRI, mas, de acordo com o *Eye Disease Study Age-Related*, não existe evidência de efeito benéfico sobre a taxa de

progressão da AG.⁽⁵¹⁾ A incidência da doença é crescente, sendo AG cerca de quatro vezes mais comum que a DMRI exsudativa em pacientes acima de 85 anos de idade.⁽¹⁵⁾ Embora identificadas várias vias envolvidas na patogênese da doença, a investigação de fatores clínicos relacionados com o desenvolvimento e crescimento de lesões atróficas é fundamental para acelerar o tratamento.⁽³⁷⁾

1.2 Fatores de Risco para Degeneração Macular Relacionada à Idade

Mecanismos fisiopatológicos relacionados à DMRI ainda necessitam esclarecimento.⁽⁵²⁻⁵³⁾ Estudos⁽⁵⁴⁻⁵⁷⁾ mostram associação da doença com idade avançada, etnia, tabagismo, exposição à luz, índice de massa corporal (IMC) elevado, hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia, obesidade e predisposição genética.⁽⁵⁸⁻⁵⁹⁾

Idade avançada é o principal fator de risco para DMRI.^(13,47,58) Segundo o *National Eye Institute* (2014),⁽⁶⁰⁾ 10% das pessoas com mais de 80 anos apresentam a forma tardia da doença. Assim, a combinação da idade avançada com risco genético e causas ambientais potencializa o risco da doença.⁽³⁾

Indivíduos na faixa etária de 60 a 80 anos apresentam risco três vezes maior de desenvolver a doença, quando comparado àqueles com menos de 60 anos.⁽⁶¹⁾ A razão de chance para DMRI (*odds ratio* - OR) varia de 1 (55-69 anos) para 4,42-8,70 (70-79 anos) e até 18,8-32,3 (80-86 anos).⁽¹³⁾ O estresse oxidativo é um importante mediador do efeito da idade, considerando que a oxidação mitocondrial é prejudicada com o envelhecimento e os danos oxidativos são claramente observados.⁽⁶²⁾ Além disso, o envelhecimento está associado com aumento de danos no DNA e a deficiência dos mecanismos de reparação.⁽⁶³⁾

Na retina humana, com aumento da idade, há perda aproximada de 30% dos fotorreceptores na mácula.⁽⁶⁴⁾ Ainda, aumento da espessura da MB, acúmulo de lipoproteínas que contêm apolipoproteínas B e E, e colesterol acarretam a formação de drusas,⁽⁶⁵⁻⁶⁶⁾ que atuam como uma barreira de difusão e estímulo para inflamação, com comprometimento funcional da retina.^(3,67)

Existe relação bem estabelecida entre tabagismo e DMRI.⁽⁵⁰⁾ Esse é um dos fatores mais fortes associados com o desenvolvimento para ambas as formas da doença, mesmo em pessoas expostas passivamente.⁽⁶⁸⁻⁷⁰⁾ Indivíduos que iniciaram o hábito tabagista têm 45% de chance de desenvolver DMRI inicial e apresentam progressão pior da doença em comparação com não-fumantes.⁽⁷¹⁾ Aqueles que fumaram pelo menos 100 cigarros têm risco três vezes maior de desenvolver a doença, em relação aos não-fumantes.⁽⁷²⁾ Desse modo, a quantidade de cigarros aumenta o risco de desenvolvimento da doença, provavelmente devido à lesão oxidativa.⁽⁷³⁾ Além disso, há referência que ex-fumantes, mesmo após 20 anos de cessação, apresentam risco aumentado para DMRI neovascular.⁽⁷⁴⁾

Estudo *in vitro* mostrou que o extrato do fumo pode ocasionar a morte de células do EPR humano e anormalidades na síntese de matriz extracelular,⁽⁷⁵⁾ confirmando a importância da avaliação desse tecido em fumantes.⁽⁵⁰⁾ O cigarro é composto por substâncias tóxicas, o que contribui negativamente para aterosclerose, desregulação endotelial e angiogênese. Nesse contexto, o aumento da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) decorre em danos oxidativos no EPR, apoptose dos fotorreceptores, alterações vasculares e inflamação.⁽⁷⁶⁻⁷⁷⁾

A nicotina, uma das substâncias do tabaco, promove a angiogênese devido suas propriedades vasculogênicas e compromete o processo de cicatrização.⁽⁷⁸⁾ Exerce, adicionalmente, ação vasoconstritora da via de estimulação adrenérgica, que pode

prejudicar o fluxo de sangue através da coróide.⁽⁷⁹⁾ As dioxinas, igualmente presentes no fumo, atuam sobre tecidos oculares pela via do receptor de hidrocarboneto aromático, promovendo a produção de VEGF em tecidos da retina de ratos e em células humanas do EPR, e agrava o desenvolvimento de NVC.⁽⁷⁹⁾

O etilismo destaca-se também como fator de risco para DMRI. O consumo de álcool tem alta prevalência na maioria dos países, tornando-se a droga mais consumida em muitas sociedades.⁽⁸⁰⁾ Hipóteses sobre a etiologia da doença ressaltam que o consumo de álcool possui efeitos negativos e positivos no desenvolvimento da DMRI.^(55,81) Estudos mostram aumento do risco, particularmente associado com o consumo excessivo de álcool,⁽⁸²⁻⁸³⁾ enquanto outros indicam diminuição do risco associado ao vinho.⁽⁸⁴⁾

Há referência, ainda, da associação entre dislipidemia e DMRI, incluindo alterações no colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL) e a relação do colesterol total/HDL.⁽⁸⁵⁾ Ressalta-se que a lipoproteína de baixa densidade (LDL) oxidada é um impulso poderoso no acréscimo da expressão de moléculas de adesão quimiotáticas e, desta maneira, atrai macrófagos para o tecido inflamatório.⁽⁸⁶⁾ Porém, não apenas a forma oxidada, mas também LDL nativa induz aumento da expressão de moléculas de adesão intercelular-1 (ICAM-1).⁽⁸⁶⁾ Assim, LDL, que é depositada sobre a MB, acarreta aumento da expressão de ICAM-1 e macrófagos e, conseqüentemente, o desenvolvimento da DMRI.⁽⁸⁶⁾

Reconhecidamente, o aumento do colesterol sérico ocasiona acúmulo de lipídios na MB, proporcionando resistência pós-capilar da rede vascular da coróide. A diminuição do fluxo sanguíneo da coróide e a ampliação da resistência propiciam elevação da pressão hidrostática do coriocapilar, induzindo vazamento e deposição de proteínas extracelulares e lipídios, particularmente no polo posterior, formando depósitos basais na MB e, conseqüentemente, drusas, primeira manifestação clínica da

DMRI.⁽⁸⁷⁾ Nesse caso, alteração nos níveis séricos de colesterol pode acarretar espessamento da MB, redução da fenestração e atrofia dos vasos do coriocapilar. Acúmulo de lipídios na MB, além de modificações anatômicas, pode causar hipóxia na retina externa e, conseqüentemente, aumento da expressão de VEGF nos coriocapilares.⁽⁸⁸⁾

Adicionalmente, variantes genéticas estão relacionadas ao risco de aproximadamente 71% para o desenvolvimento de DMRI.⁽⁸⁹⁻⁹⁰⁾ A contribuição de fatores genéticos decorre, na maioria das vezes, de valores de OR, além de variantes ou SNPs comuns em DMRI, estimados com base em estudos do tipo caso-controle.⁽⁹¹⁾ Estudos de famílias têm mostrado risco relativo aproximadamente 6 a 12 vezes maior para a doença em parentes em primeiro grau de indivíduos com a doença, comparado à população geral. Além disso, algumas famílias apresentam maior risco de recorrência para os familiares do que outras.⁽⁹¹⁻⁹²⁾

1.2.1 Fatores Genéticos Associados à Degeneração Macular Relacionada à Idade

Apolipoproteína E

A apolipoproteína E (apo E), proteína altamente expressa no fígado, cérebro e retina,⁽³³⁾ particularmente EPR e MB,⁽⁹³⁻⁹⁴⁾ participa do metabolismo de lipoproteínas ricas em triglicérides (TG).⁽⁹⁵⁾ Essa glicoproteína é codificada por um gene mapeado no cromossomo 19q13.2 humano, apresentando 3.597 nucleotídeos organizados em quatro exons e três íntrons. São descritos dois polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) dentro da sequência que codifica apo E, rs429358 e rs7412, resultando em três alelos identificados como *APOE*2*, *APOE*3* e *APOE*4*, cujas proteínas diferem na afinidade

de ligação ao receptor LDL. O alelo *APOE*2* apresenta afinidade de ligação reduzida a esses receptores, em relação aos demais alelos, influenciando nos níveis séricos de colesterol.⁽⁹⁶⁻⁹⁷⁾

As isoformas reconhecidas como apo E2, apo E3 e apo E4 são diferenciadas pelo intercâmbio dos resíduos de cisteína (Cys) e arginina (Arg) nas posições 112 (rs429358) e 158 (rs7412) na cadeia polipeptídica. O alelo *APOE*2* determina a presença de um resíduo Cys nas posições 112 e 158, correspondente a região ligante ao receptor da apo E. Já o alelo *APOE*3* é responsável pelos resíduos Cys-112 e Arg-158, e *APOE*4* pelo resíduo Arg em ambas as posições, tendo a substituição de aminoácidos consequência fisiológica na função da proteína.⁽⁹⁸⁾

A associação entre apo E e DMRI é sustentada por mecanismos como imunoregulação e sinalização celular.⁽⁹⁹⁾ A retina apresenta o segundo nível mais alto de apo E depois do fígado, com importante papel na manutenção da função normal da retina.⁽¹⁰⁰⁾ Vários mecanismos de efeito da apo E na DMRI foram propostos, assim como a variabilidade na dimerização da isoforma associada com transporte de lipídios ou variação na afinidade de ligação com seu receptor.⁽⁹²⁾ Nesse contexto, apo E4 carregada positivamente tem sido associada com melhora da permeabilidade da MB, pelo transporte de lipídios e redução no acúmulo de detritos relacionados com a formação de drusas,⁽¹⁰¹⁻¹⁰³⁾ enquanto apo E2 apresenta-se como fator de risco para a doença.^(33,95)

Transportador ABCA4

O transporte de lipídios através das membranas biológicas é fundamental para a estrutura, função e sobrevivência celular. Esse processo é normalmente realizado por uma variedade de proteínas integrantes da membrana, o qual especificamente liga e ativa, ou passivamente transloca lipídios através da bicamada lipídica.⁽¹⁰⁴⁾ Nesse contexto, destacam-se os transportadores ABC que utilizam a energia a partir da ligação de trifosfato de adenosina (ATP) e hidrólise para carrear quimicamente diversos substratos através das membranas biológicas, incluindo nutrientes, antibióticos, vitaminas, lipídios, aminoácidos, dentre outros. Desse modo, alterações nos transportadores ABC têm sido associadas a doenças genéticas graves.⁽¹⁰⁵⁻¹⁰⁶⁾

O genoma humano codifica 48 transportadores ABC, que foram organizados em sete subfamílias designadas ABCA, ABCB, ABCC, ABCD, ABCE, ABCF e ABCG.⁽¹⁰⁷⁾ O gene *ABCA4* (membro 4 da sub-família A de transportadores ABC - ABCA4, MIM 601691) está localizado no cromossomo 1p22.1 humano e codifica uma proteína transmembrana (ABCR) expressa exclusivamente em fotorreceptores, e envolvida na remoção de aldeídos da retina, um produto do ciclo retinóide da visão.⁽¹⁰⁸⁾ Essa proteína carrega também vitaminas, lipídios, aminoácidos e polipeptídios através das membranas celulares.⁽¹⁰⁹⁾

Mutações no gene *ABCA4* têm sido associadas a várias condições, tais como retinose pigmentar autossômica recessiva (arRP), doença de Stargardt (autossômica recessiva - arSTGD), distrofia de cones e bastonetes (autossômica recessiva - arCRD) e DMRI.^(29,110) Ressalta-se, nesse caso, o polimorfismo rs49555 A>G localizado na posição 94021798 pb (NCBI - GRCh38), intron 33,⁽¹¹¹⁾ de *ABCA4* associado à DMRI. Nesse contexto, a ausência ou disfunção da proteína ABCR induz a elevação de

fosfatidiletanolamina no segmento externo dos cones e no EPR, que reage com retinóides formando o composto A2E tóxico. O acúmulo de A2E resulta na disfunção e/ou apoptose do EPR seguido de perda dos fotorreceptores e, conseqüentemente, o desenvolvimento da doença.⁽¹⁰⁹⁾

Complemento do fator H

Evidências indicam que drusas contêm proteínas da via alternativa do complemento, desse modo, é possível sua relação com o processo inflamatório resultante da doença.^(35,112) Além disso, constatou-se que uma das proteínas desse sistema, o complemento do fator H (CFH), é um importante inibidor dessa via, visto que mantém a homeostase local e protege a mácula contra desintegração.⁽¹¹³⁾ Assim, ressalta-se que o sistema complemento regulado é fundamental para evitar a amplificação do processo inflamatório no olho e o agravamento da doença.⁽¹¹⁴⁾

CFH, abundante no plasma, é sintetizado particularmente nos hepatócitos. No olho sadio CFH é altamente expresso nas células do EPR, porém, pouco nos neurônios retinais.⁽¹¹²⁾ Os fagócitos mononucleares, bem como macrófagos e células microgliais também podem expressar CFH,⁽¹¹⁵⁾ e colaboram significativamente para a concentração local do complemento nos tecidos com inflamação.⁽¹¹⁶⁻¹¹⁷⁾

O gene que codifica CFH está localizado no cromossomo 1q32 humano.⁽¹¹⁸⁾ Alterações polimórficas e deleções no *cluster* do gene estão associadas a doenças como glomerulonefrite membrano-proliferativa do tipo II, síndrome hemolítica urêmica e DMRI. Essas alterações podem formar códons de parada prematura ou desordem na estrutura protéica, ocasionando bloqueio na síntese da proteína, falha na função ou

retardo da secreção de CFH.⁽¹¹⁹⁾ Destaca-se, nesse caso, o polimorfismo rs1061170 - 1277 T > C, localizado na posição 94021798 pb (NCBI - GRCh38), no intron 33.⁽¹¹¹⁾

Fator de crescimento endotelial vascular

A angiogênese é uma das principais causas de inúmeras doenças oculares tais como retinopatia diabética (RD), NVC e DMRI.⁽¹²⁰⁻¹²¹⁾ Idade avançada diminui a capacidade do EPR de reciclar metabólitos decorrentes do processo visual resultantes dos fotorreceptores, que, nesse caso, se acumulam no espaço sub-retiniano. Ainda, o envelhecimento promove acúmulo de lipídios na MB, tornando-a mais espessa e diminuindo a capacidade de difusão do oxigênio.⁽¹²²⁾ As células do EPR, que comumente são permeáveis ao oxigênio, devido à produção local do VEGF tornam-se menos permeáveis, o que resulta em menor capacidade de difusão de oxigênio e VEGF, levando a hipóxia dos fotorreceptores e atrofia do coriocalilar.⁽¹²³⁾

Outros fatores também contribuem para hipóxia macular. O consumo de oxigênio elevado na mácula, ocasionado pela alta taxa de metabolismo local e quantidades elevadas de ácidos graxos poliinsaturados, provocam estresse oxidativo e DMRI exsudativa (Beatty et al., 2000). Esses aspectos, associados à exposição contínua à luz visível, causam dano oxidativo às células do EPR e acúmulo de lipofuscina na mácula, que é visível sob a forma de drusas, reconhecidas como primeira manifestação clínica da DMRI.⁽¹²³⁾

A presença dos metabólitos oriundos dos fotorreceptores, da lipofuscina e da degeneração oxidativa das células do EPR faz com que a mácula na DMRI se encontre numa condição inflamatória subclínica contínua. A inflamação crônica induz à produção local de citosinas quimiotáticas, migração de células inflamatórias, como

macrófagos, para o espaço sub-retiniano e acarreta a ativação do sistema complemento, causando destruição focal da MB. Os macrófagos também secretam VEGF, amplificando seus efeitos locais.⁽¹²³⁾ Por fim, a grande quantidade de VEGF local induzida pela hipóxia, acrescida dos defeitos da MB, resulta na formação de neovasos que penetram no espaço sub-retiniano provocando exsudação e hemorragia.⁽¹²³⁾ Além de VEGF, outros fatores de crescimento estão relacionados com a angiogênese, incluindo fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF).^(121,124) Nesse contexto, a via do VEGF destaca-se na angiogênese ocular fisiológica e patológica,⁽¹²⁵⁾ com papel primordial na regulação da angiogênese, derrame vascular e inflamação, características da DMRI.^(126,127)

A família dos polipeptídios VEGF é composta pelos subgrupos VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, e o fator de crescimento placentário (PIGF - *placental growth factor*). O VEGF-A, cujo gene localiza-se no cromossomo 6p21.3 humano contendo oito exons e sete introns,⁽¹²⁸⁻¹³⁰⁾ representa uma proteína de aproximadamente 40 kDa e destaca-se como o membro mais estudado.⁽¹³¹⁾ Há pelo menos seis isoformas conhecidas de VEGF-A em humanos: VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF183, VEGF189 e VEGF206. A isoforma predominante no olho é VEGF165. As várias isoformas de VEGF interagem com os três membros de receptores de VEGF identificados como VEGFR-1 e VEGFR-2 e VEGFR-3.^(130,132) VEGF-A atua nas várias fases da angiogênese como proliferação e migração de células endoteliais, e aumento da permeabilidade vascular.^(131,133)

Estudos genéticos associados à DMRI, têm sido realizados em diferentes populações. Entretanto, ainda permanece obscuro o papel das bases genéticas e moleculares envolvidas na patogênese da doença. A ampliação de estudos possibilitará

esclarecer a correlação genótipo/fenótipo e, desse modo, estabelecer com mais precisão quais genes contribuem para DMRI precoce e evolução da doença. A identificação de populações de risco, com base no perfil genético, poderá auxiliar no tratamento precoce da doença e estabelecer a individualização da terapia anti-VEGF para DMRI neovascular.

No Brasil, são escassos estudos envolvendo fatores de risco genéticos para DMRI. Diante do seu perfil miscigenado torna-se necessário identificar fatores relacionados à doença, específicos para essa população. Nesse contexto, estudos de polimorfismos genéticos, expressão gênica, proteínas e fatores ambientais envolvidos na fisiopatologia da DMRI, incluindo vias de metabolismo de lipídios, angiogênese e inflamação, poderá identificar subgrupos de indivíduos e seus respectivos riscos refletindo, conseqüentemente, no prognóstico e tratamento da doença.

1.3 Objetivo Geral

Avaliar a influência de variantes genéticas, expressão gênica e níveis séricos relacionados com o metabolismo de lipídios, angiogênese e inflamação em pacientes com DMRI.

Objetivos específicos

1. Analisar a distribuição dos polimorfismos, *APOE*-rs429358/rs7412, *ABCA4*-rs472908, *CFH*-rs1061170, *VEGF*-rs3025039 e *VEGF*-rs1570360 em pacientes com diagnóstico de DMRI na forma exsudativa e seca.

2. Avaliar a associação de DMRI com hábitos de vida (tabagismo e etilismo), perfil demográfico (sexo e idade), e antecedentes pessoais (IMC, HAS e dislipidemia), considerando as respectivas variantes genéticas.

3. Analisar a expressão gênica de *APOE*, *ABCA4*, *CFH* e *VEGF* no sangue periférico de pacientes com DMRI (forma exsudativa e seca) e indivíduos sem a doença (controle).

4. Analisar os níveis séricos de apo E, ABCR, CFH e VEGF em pacientes com DMRI (forma exsudativa e seca) e nos indivíduos controle, além de avaliar sua associação com as referidas variantes genéticas e caracterizar os respectivos valores de sensibilidade e especificidade.

5. Avaliar a associação de perfil lipídico [CT, fração de colesterol de HDL (HDLc) e LDL (LDLc) e TG] com DMRI e sua relação com os polimorfismos *APOE*-rs429358/rs7412 e *ABCA4*-rs472908.

2. CASUÍSTICA E MÉTODOS

2.1 Casuística

Neste estudo, com delineamento do tipo caso-controle, foram selecionados 333 indivíduos no período de 2013 a 2015, com idade ≥ 50 anos,⁽⁵⁹⁾ independente de sexo e grupo étnico, distribuídos em três grupos: Grupo 1 (G1) - 108 pacientes com DMRI na forma exsudativa; Grupo 2 (G2) - 45 pacientes com DMRI na forma seca; Grupo 3 (G3) - 180 indivíduos sem sinais clínicos da doença, constituindo o grupo controle (Figura 4).

Os pacientes foram atendidos por médico em clínica particular de oftalmologia em São José do Rio Preto – SP e no Ambulatório de Oftalmologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP). O diagnóstico da DMRI foi baseado em achados oftalmológicos, além de exames de mapeamento de retina, FA e tomografia de coerência óptica.⁽¹³⁴⁾ Todos pacientes foram submetidos a exame clínico oftalmológico completo por um especialista em retina, com avaliação da melhor acuidade e exame de fundo de olho após dilatação pupilar, além dos referidos exames para diagnóstico de DMRI.

Os critérios de inclusão para seleção de G1 foram: idade ≥ 50 anos, presença de drusas moles e/ou atrofia geográfica do epitélio pigmentado da retina, corroborando o diagnóstico de DMRI na forma seca. Os critérios de inclusão para seleção de G2 foram: ≥ 50 anos, com DMRI na forma exsudativa, ou seja, apresentando ao exame neovascularização coroideia em qualquer estágio e padrão angiográfico. O grupo controle (G3) foi constituído por indivíduos em acompanhamento oftalmológico de rotina nas referidas unidades oftalmológicas, sem sinais clínicos de DMRI. Foram excluídos indivíduos com idade inferior a 50 anos, portadores de diabetes melito, com

condições médicas e psicológicas que impeçam o paciente de concluir o estudo ou assinar o consentimento informado. Além de doença significativa e não controlada que, na opinião do investigador, possa excluir o paciente do estudo.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - CAEE 02711112.0.0000.5415 (Anexo I). Todos os participantes foram informados das características do estudo, confirmando sua participação pelo Termo de Consentimento Livre Esclarecido (Anexo II) e preencheram questionário específico para antecedentes pessoais e histórico médico (Anexo III).

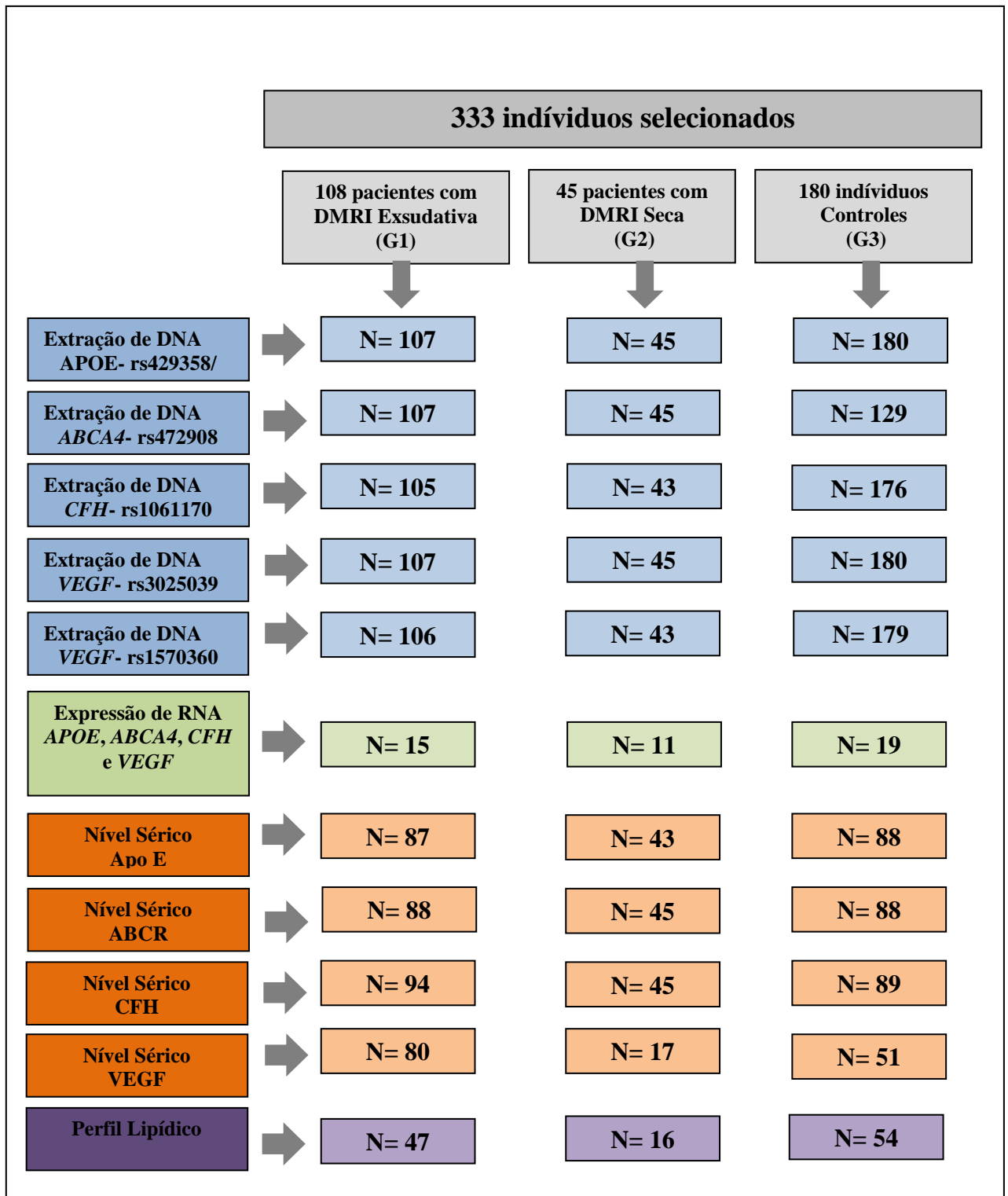


Figura 4. Fluxograma ilustrando a distribuição dos grupos estudados, incluindo pacientes com degeneração macular relacionada à idade (DMRI) na forma seca e exsudativa e indivíduos sem a doença (grupo controle), e as respectivas análises realizadas. N=número de indivíduos; DNA= Ácido desoxirribonucleico; RNA= ácido ribonucleico; APOE = apolipoproteína E; ABCA4 e ABCR = ATP-triphosphate binding cassette transporte sub-family A-member 4; CFH = complemento do fator h; VEGF = fator de crescimento endotelial vascular.

2.2 Métodos

2.2.1 Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído de leucócitos de sangue periférico coletado com EDTA. A técnica de extração de DNA genômico consistiu no método de precipitação salina ou *salting-out* (Salazar et al., 1998), realizado em três etapas, compreendendo: 1) lise das células sanguíneas; 2) desproteinização; 3) precipitação do DNA e ressuspensão, seguindo-se o protocolo apresentado a seguir.

O sangue periférico total foi coletado em tubo *vacutaner* com EDTA (1 mg/mL de sangue), em seguida, foi transferido 1 mL de sangue para um tubo estéril de microcentrífuga de 2 mL. Logo após, foi centrifugado a 5.000 rpm por 5 minutos, à temperatura ambiente (TA) e o plasma foi desprezado. Foram adicionados ao sedimento 900 µL de Tampão 1x contendo Triton. O próximo passo consistiu na homogeneização, sendo necessário o uso do Vortex durante 1 minuto. A amostra foi centrifugada novamente a 5.000 rpm por 5 minutos. Posteriormente, realizou-se o descarte do sobrenadante por inversão de modo devagar e constante, seguida da adição de 1 mL de tampão 1x. Esse procedimento foi repetido por cerca de três vezes ou até que o *pellet* estivesse isento de hemoglobina.

Ao término da etapa anterior, o próximo passo foi ressuspender o sedimento, ou seja, os núcleos de leucócitos, com 200 µL de Tampão 2 1X, em seguida, colocou-se 20 µL de SDS (dodecil sulfato de sódio) 10%, promovendo a mistura da suspensão com o uso da pipeta, sendo que o SDS tem por função causar o rompimento da membrana nuclear. Incubou-se a amostra no banho a 56°C por 15 minutos. Logo em seguida, fez-se a adição de 100 µL de NaCl 5 M seguido de homogeneização. A amostra foi, então,

centrifugada a 12000 rpm durante 5 minutos em temperatura ambiente, o que favoreceu a precipitação das proteínas.

A etapa seguinte se resume a transferir o sobrenadante, o DNA, para outro tubo de microcentrífuga e descartar o precipitado, ou seja, o tubo com as proteínas. O DNA foi misturado com 1 mL de etanol absoluto gelado e homogeneizado por inversão lenta do tubo, de modo que o etanol promoveu a purificação do DNA e sua precipitação. A amostra foi mantida no congelador (-20 C) *overnight*.

A próxima fase, conhecida como precipitação de DNA, teve início com a retirada das amostras do congelador e centrifugação a 12.000 rpm por 5 minutos a TA. O etanol absoluto foi removido e as amostras lavadas com etanol a 70% gelado e centrifugadas a 12.000 rpm por 5 minutos. Essa etapa foi repetida. Depois, foi removido todo o etanol. O tubo contendo as amostras foi colocado sobre papel absorvente para a evaporação do etanol (cerca de 5 horas).

A terceira parte da extração iniciou-se com a ressuspensão do precipitado em 100 µL de Tampão TE (pH8,0), o qual permitiu a suspensão do DNA. Após, fez-se a incubação em banho-maria a 56°C por 15 minutos, reidratando o DNA (para não degradar). Enfim, a amostra foi armazenada a -20°C até o processamento para análise dos polimorfismos.

2.2.2 Análise Genotípica

Após a extração de DNA genômico procedeu-se a análise dos polimorfismos *APOE-HhaI* (rs429358) e (rs7412), *CFH-Y402H* (rs1061170), *ABCA4* (rs472908), *VEGF-C936T* (rs3025039) e *VEGF-G1154A* (rs1570360), com amplificação do DNA por PCR (*polymerase chain reaction*) convencional, sendo cada tubo de reação composto por 50 ng

de DNA genômico em um volume final de 25 μL , contendo 20 mmol de cada *primer*; 0,1 mmol/L dNTPs; 0,75 mmol/L de MgCl_2 ; 5 mmol/L de tampão PCR 10 X; 0,25 U de Taq polimerase (5 U/ μL) e 7 μL de água deionizada.

Em seguida, o produto de amplificação foi submetido às enzimas de restrição *HhaI Digest*, *NlaIII Digest*, *TasI (Tsp509I)*, e *Mn1I Digest* (Fermentas[®]), seguido de coloração com GelRed (Uniscience[®]), eletroforese e análise em sistema de fotodocumentação. Os respectivos *primers*, e as etapas de amplificação e eletroforese para os referidos polimorfismos são apresentados no Quadro 1. As Figuras 5 a 9 mostram o perfil eletroforético dos polimorfismos estudados.

Quadro 1. Primers, etapas de amplificação e eletroforese dos polimorfismos *APOE*-rs429358/rs7412, *CFH*-rs1061170, *ABCA4*-rs472908 e *VEGF*-rs3025039/rs1570360.

Polimorfismo	Primer	Desnaturação inicial	Ciclagem (ciclos)	Desnaturação (temperatura/tempo)	Annealing	Extensão final	Ciclo final	Restrição enzimática	Fragmento (pb)	Eletroforese	Genótipos
<i>APOE</i> -rs429358/rs7412	P1: 5'ACAGAATTGCCC CGGCCTGGTACAC 3'	94°C/ 5 min	35	94°C/ 30 s	65°C/ 30 s	72°C/ 30 s	72°C/ 10 min	<i>HhaI</i>	91, 83, 72 e 48	Gel agarose 5%	T/T
	P2: 5'TAAGCTTGGC ACGGCTGTCCAAGGA 3'										110V, 150 min
<i>CFH</i> -rs1061170	P1: 5' CCATTGGTAAAA CAAGGTGACA 3'	95°C/ 5 min	30	95°C/ 60s	59°C/ 60s	72°C/ 60s	72°C/ 10 min	<i>NlaIII</i>	400, 300 e 200	Gel agarose 2%	C/C
	P2: 5' TCTTTTGTGCA AACCTTGTAG 3'										150V, 90 min
<i>ABCA4</i> -rs472908	P1: 5' TTCCTGTTATCACI CATGAGAGTTTCT 3'	94°C/ 5 min	35	94°C/ 30 s	54°C/ 30 s	72°C/ 30 s	72°C/ 5 min	<i>TspI</i> (Tsp509I)	210, 183, 142, 110 e 41	Gel agarose 2%	A/A
	P2: 5'AGGAGCTCTG GAAGTGACTCGATAT 3'										100V, 90 min
<i>VEGF</i> -rs3025039	P1: 5'AAGGAAGAGGA GACTCTGCGC 3'	95°C/ 5 min	30	95°C/ 60 s	59°C/ 60 s	72°C/ 60 s	72°C/ 10 min	<i>NlaIII</i>	208, 122 e 86	Gel agarose 2,5%	T/T
	P2: 5' TATGTGGGTGGG TGIGTCTACAGG 3'										90V, 90 min
<i>VEGF</i> -rs1570360	P1: 5'TCCTGCTCCCT CCTCGCCAATG3'	94°C/ 5 min	35	94°C/ 45 s	61°C/ 45 s	72°C/ 45 s	72°C/ 7 min	<i>MnII</i>	185, 150, 34 e 22	Gel agarose 4%	A/A
	P2: 5'GGCGGGGA CAGGCGAGCATC3'										105V, 90 min
											G/G

APOE= apolipoproteína E; *ABCA4*= ATP-triphosphate binding cassette transporte sub-family A -member 4; *CFH*= complemento do fator h; *VEGF*= fator de crescimento endotelial vascular, pb=pares de base; V=Volts.

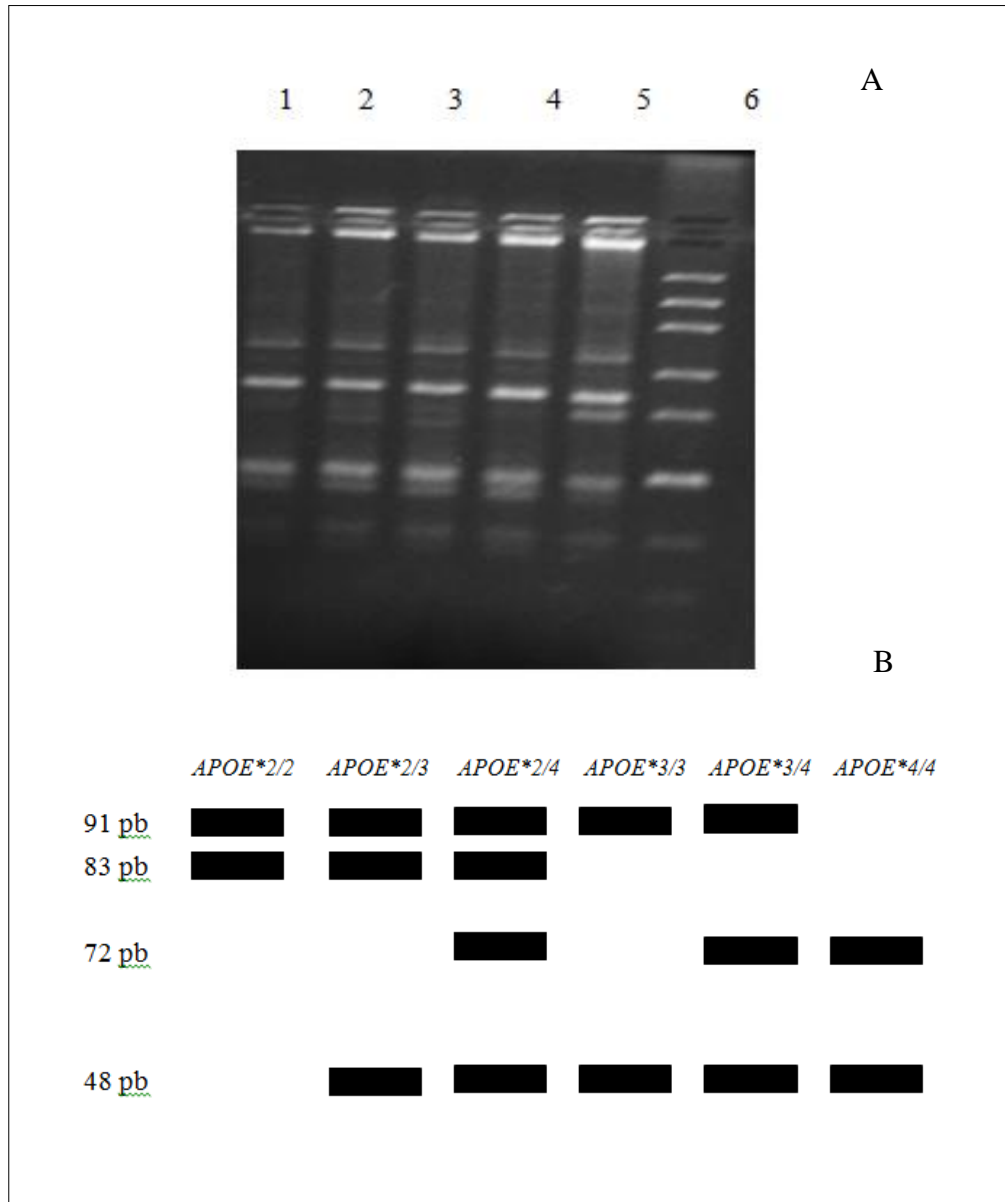


Figura 5. Fotografia de gel de agarose 5% submetido a eletroforese para análise dos genótipos de *APOE*-rs429358/rs7412. Notam-se genótipos *APOE**2/3 na coluna 1, 2, 3 e 4, *APOE**2/4 na coluna 5. A coluna 6 apresenta uma amostra de DNA padrão (Ladder 10pb) (A). Padrão de bandas (perfil eletroforético) para o polimorfismo *APOE*-rs429358/rs7412; pb= pares de bases (B).

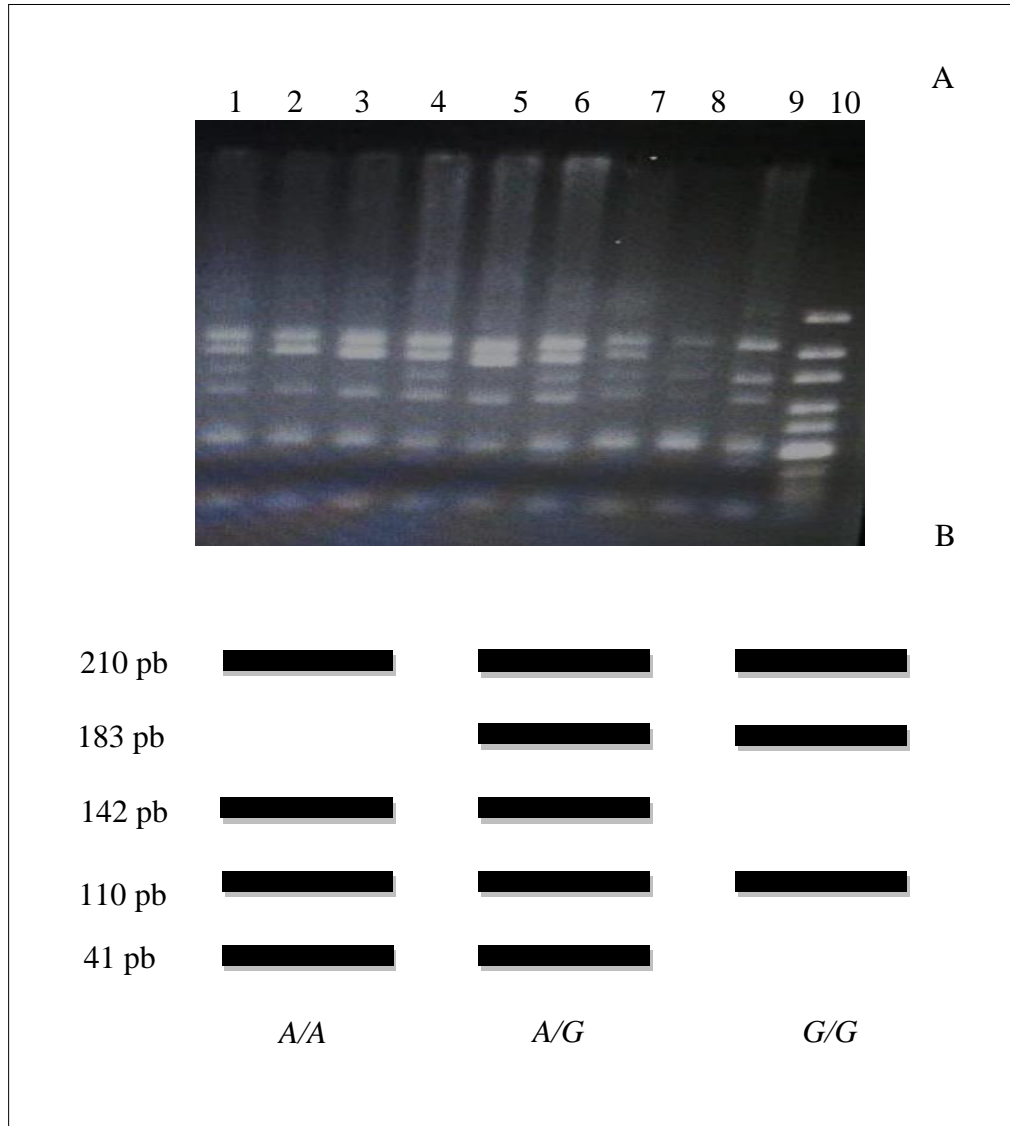


Figura 6. Fotografia de gel de agarose 2% submetido a eletroforese para análise dos genótipos de *ABCA4*-rs472908. Notam-se genótipos *A/G* na coluna 1, 4, 6, 7, *A/A* na coluna 8, 9 e *G/G* na coluna 2, 3, 5. A coluna 10 apresenta uma amostra de DNA padrão (Ladder 10pb) (A). Padrão de bandas (perfil eletroforético) para o polimorfismo *ABCA4*-rs472908; pb= pares de bases (B).

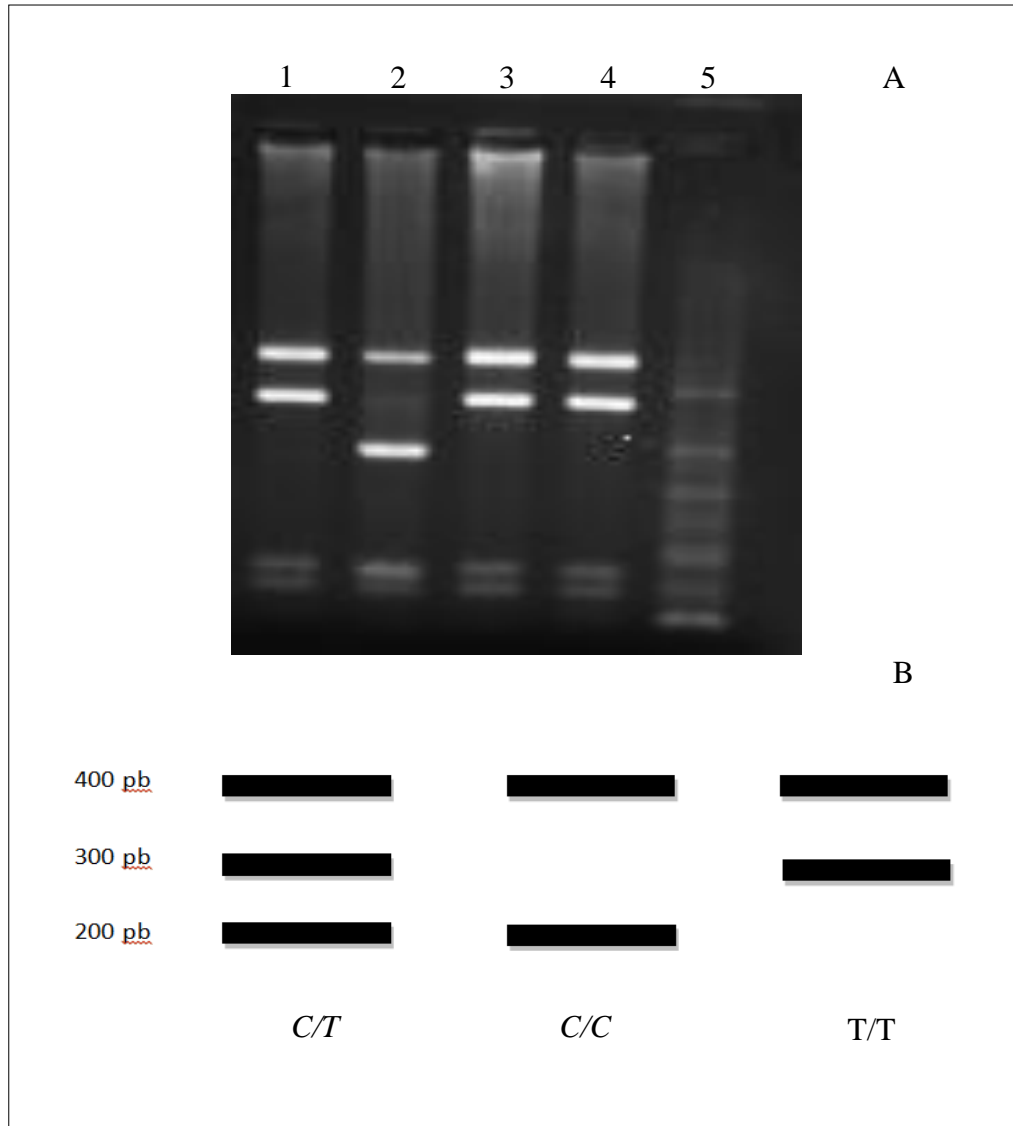


Figura 7. Fotografia de gel de agarose 2,0% submetido a eletroforese para análise dos genótipos de *CFH*-rs1061170. Notam-se genótipos *T/T* nas colunas 1, 3, 4 e *C/C* na coluna 2. A coluna 5 apresenta uma amostra de DNA padrão (Ladder 10pb) pb = pares de bases (A). Padrão de bandas (perfil eletroforético) para o polimorfismo *CFH*- rs1061170; pb = pares de bases (B)

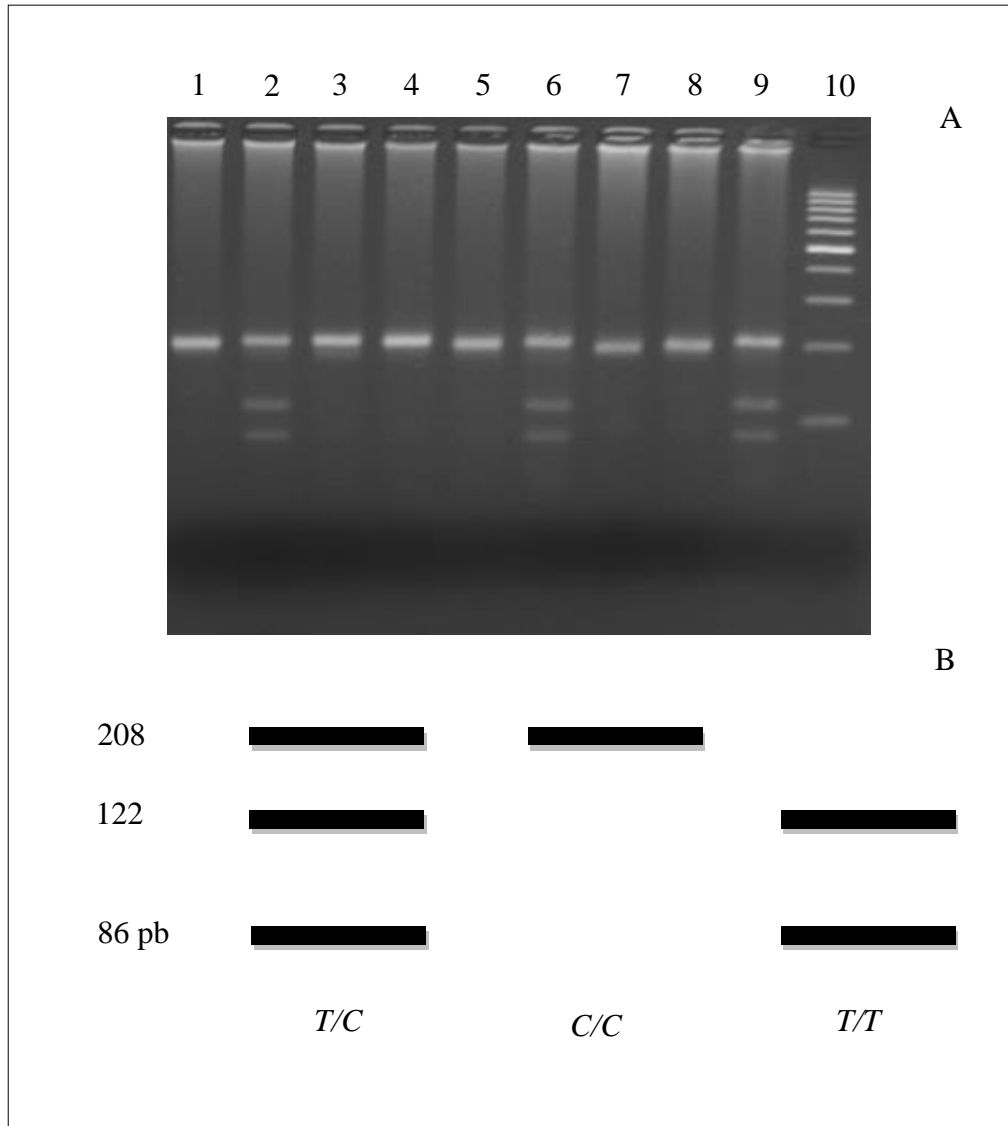


Figura 8. Fotografia de gel de agarose 2,5 % submetido a eletroforese para análise dos genótipos de *VEGF*-rs3025039. Notam-se genótipos *C/C* nas colunas 1, 3, 4, 5, 7, 8 e *T/C* na coluna 2, 6, 9. A coluna 10 apresenta uma amostra de DNA padrão (Ladder 100pb – Fermentas) (A). Figura 8b. Padrão de bandas (perfil eletroforético) para o polimorfismo *VEGF*- rs3025039; pb = pares de bases (B).

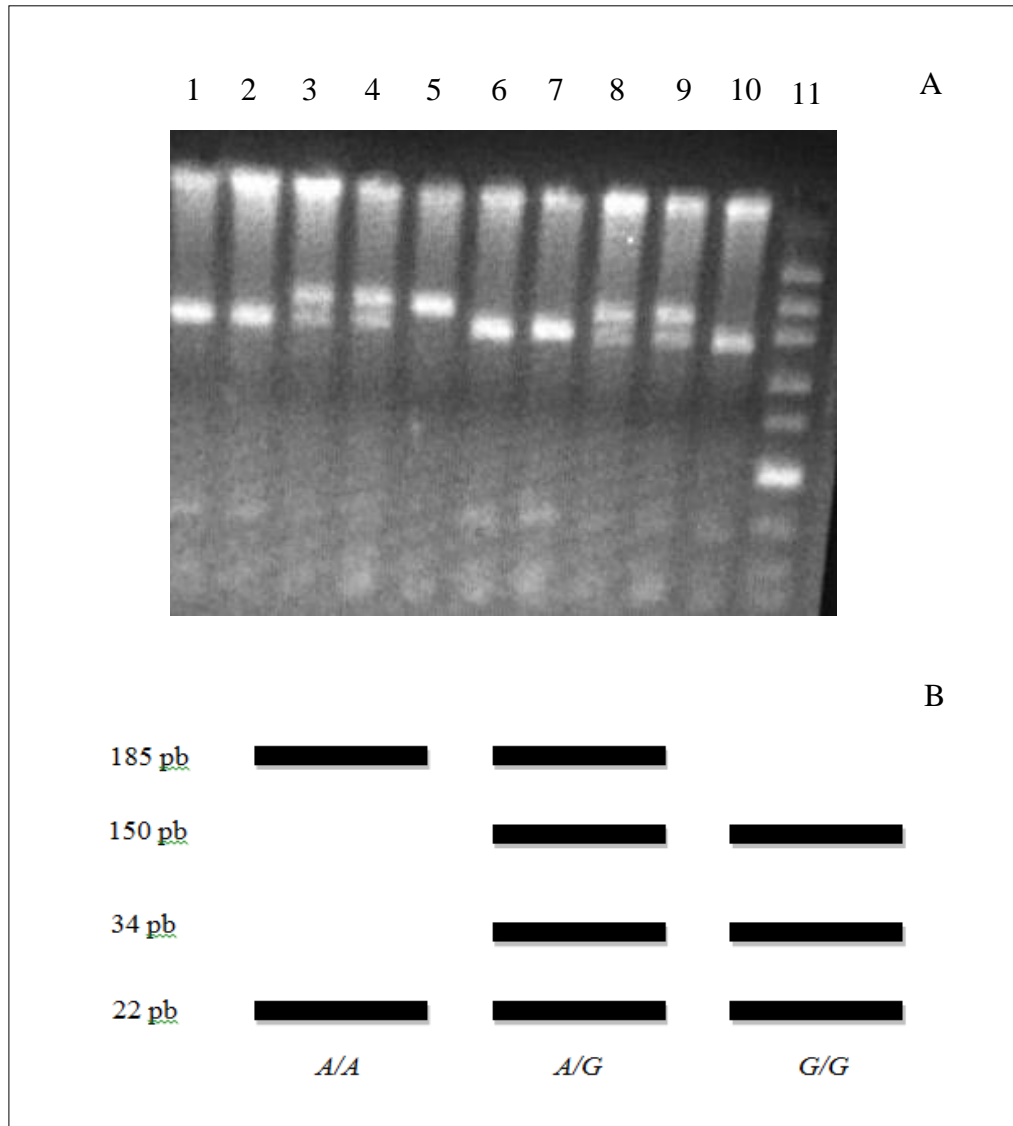


Figura 9. Fotografia de gel de agarose 2,5 % submetido a eletroforese para análise dos genótipos de *VEGF*-rs1570360. Notam-se genótipos *G/G* nas colunas 1, 2, 6, 7 e 10, *A/G* nas colunas 3, 4, 8 e 9 e *A/A* na coluna 5. A coluna 11 apresenta uma amostra de DNA padrão (Ladder 100pb – Fermentas) (A). Padrão de bandas (perfil eletroforético) para o polimorfismo *VEGF*-rs1570360; pb = pares de bases (B).

2.2.3 Extração de RNA

O RNA total foi extraído a partir do sangue periférico pelo kit Kit “Direct-zol™ RNA MiniPrep “ (Invitrogen Life Technologies – São Paulo, Brasil). A seguir, são descritos os procedimentos técnicos realizados para a extração de RNA de sangue.

Foi utilizado para cada reação 100 µL de sangue periférico. Foram adicionados três volumes de *TRI Reagent* para cada volume de amostra (3:1), ou seja, 300 µL. Utilizou-se o Vortex para homogeneização e incubou-se a mistura por 5 minutos a TA. Adicionou-se 280µL de etanol (95-100%) diretamente a um volume de homogeneizado de amostra em *TRI Reagent* ou similar (1:1). A mistura foi colocada em coluna *Zymo-Spin IIC Column* de coleta *Collection Tube* e submetida por 1 minuto a 16.000 rpm em centrífuga refrigerada (*Hermle*) a 4°C. A coluna foi transferida para um novo *Collection Tube* e descartou-se o *Collection Tube* contendo o líquido filtrado pela coluna.

Acrescentou-se 400 µL de *Direct-zol RNA PreWash* à coluna e centrifugou-se a 16.000 rpm por mais um minuto. Descartou-se o líquido, e em seguida, repetiu-se esse procedimento. Foram adicionados 700µL de *RNA Wash Buffer* à coluna e centrifugou-se a 16.000 rpm por um minuto, o líquido foi descartado novamente. Para garantir a completa remoção do *RNA Wash Buffer*, centrifugou-se a coluna por dois minutos em um *Collection tube* vazio.

A coluna foi transferida cuidadosamente para um tubo *eppendorf* de 2 mL, adicionou-se 25 µL de água *DNase/Rnase-FreeWater* diretamente à matriz da coluna, e centrifugada na velocidade máxima de 21.000 rpm por um minuto. Em seguida foi estocada à -70°C.

Amostras de RNA foram quantificadas em fluorômetro Qubit® 2.0 (Life Technologies), segundo o manual do fabricante, e armazenadas a 4°C. Para a solução de trabalho acrescentou-se 199 µL do Buffer multiplicado pelo número de amostras e 1 µL de amostra. Para as quantificações foram utilizados dois padrões (Standard 1 e 2), nos quais foram acrescentados 10µL dos respectivos Standards mais 190µL de solução de trabalho, obtendo o volume final de 200 uL. Após, as amostras foram homogeneizadas no Vortex por três segundos e incubadas a TA por dois minutos, em seguida realizou-se a leitura.

Após a quantificação das amostras, a fita de cDNA foi sintetizada utilizando o Kit *High Capacity cDNA* (Applied Biosystems®, Foster City, CA, EUA) em volume total de 20 µL das misturas da reação na concentração final de 100 ng/µL de cDNA, 10 mL *TaqMan Universal Master Mix*, 8 mL de solução de água DEPC, 1 mL *TaqMan Gene Expression* para *APOE*, *CFH*, *ABCA4* e *VEGF* (Sondas - Applied Biosystems® - Hs00171168_m1, Hs00264683_m1, Hs00979594_m1 e Hs00900055_m1 respectivamente). Cada amostra foi avaliada em triplicata. Os níveis de transcrição foram normalizados pelos genes *GAPDH* e *ACTB*, frequentemente usados em estudos para determinar o melhor normalizador para as amostras analisadas.⁽¹³⁵⁻¹³⁶⁾

Os dados foram armazenados no programa *StepOne Plus* (Applied Biosystems), e utilizados para analisar a curva de expressão. A expressão relativa dos genes de interesse foi determinada pelo método comparativo $\Delta\Delta Ct$.⁽¹³⁷⁾ O *software* de análise de dados (Applied Biosystems, Inc) utiliza a técnica de normalização da média geométrica de múltiplos genes endógenos.⁽¹³⁸⁾

2.2.4 Perfil Lipídico

Na análise do perfil lipídico foram consideradas concentrações séricas de CT, LDLc, HDLc e TG obtidas em prontuários informatizados dos pacientes e controles. Admitiram-se valores de referência para perfil lipídico, níveis séricos de: CT <200 mg/dL; LDLc <130 mg/dL; HDLc \geq 50 mg/dL (sexo feminino); HDLc \geq 40 mg/dL (sexo masculino); e TG <150 mg/dL.⁽¹⁴⁰⁾

2.2.5 Níveis Séricos por ELISA

Os níveis séricos de apo E, ABCR, CFH e VEGF foram determinados por ELISA (Kit Quantikine ELISA, R&D Systems, USA - teste imunoenzimático “sanduíche”, com placa de microtitulação pré-revestida com anticorpo específico), de acordo com as instruções do fabricante. Basicamente, 100 uL da solução diluída (RD1W) foram adicionados a cada um dos 96 poços da placa e, em seguida, cada poço recebeu 100 uL de plasma de pacientes ou controles. Após leve homogeneização, a placa foi incubada em temperatura ambiente por duas horas. Seguiu-se com lavagem (400 uL do tampão de lavagem) por três vezes e posterior adição de 200 uL de conjugado para as respectivas proteínas, incubação por duas horas em temperatura ambiente e nova lavagem com tampão de lavagem, por três vezes. Após, foram adicionados 200 uL da solução contendo o substrato da enzima, logo após, a placa foi incubada por 25 minutos em temperatura ambiente e, finalmente, 25 uL da solução de parada foram adicionados em cada poço, sendo esta composta por solução de ácido sulfúrico. A concentração de apo E, ABCR, CFH, e VEGF foi determinada por comparação de densidade óptica das amostras com a curva padrão, com comprimento de onda de 450 nm \pm 10 nm. Fabricante (R&D Systems).

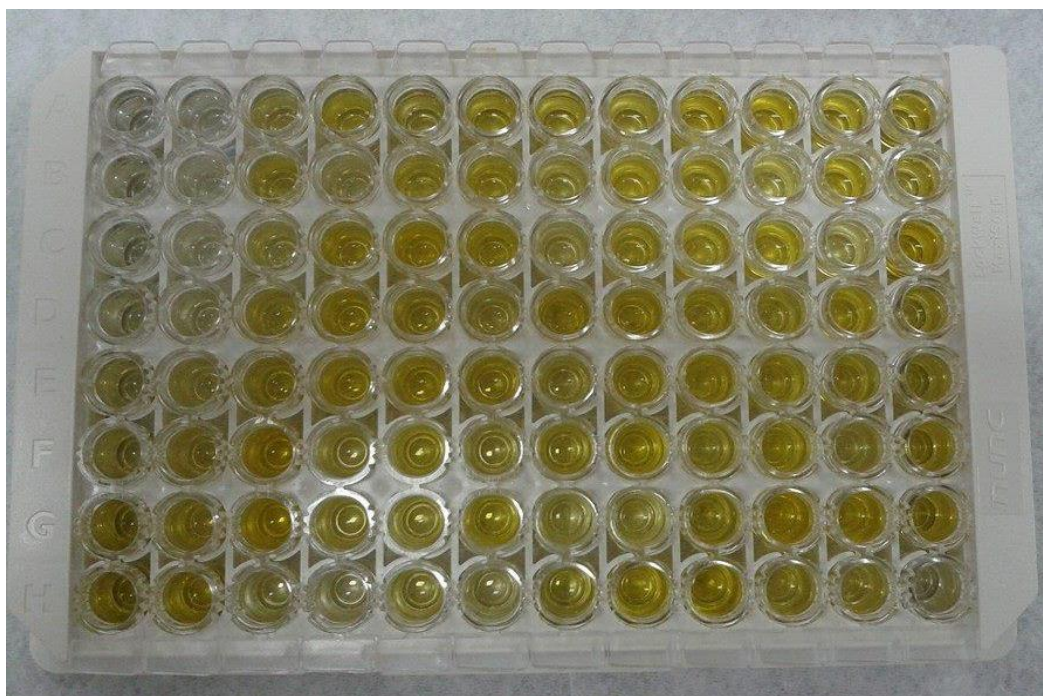


Figura 10. Fotografia da placa de ELISA (*Enzyme-LinkedImmunosorbentAssay*– R&D Systems) com adição de amostras de soro e padrões em cada poço específico antes da adição do substrato tetrametilbenzidina.

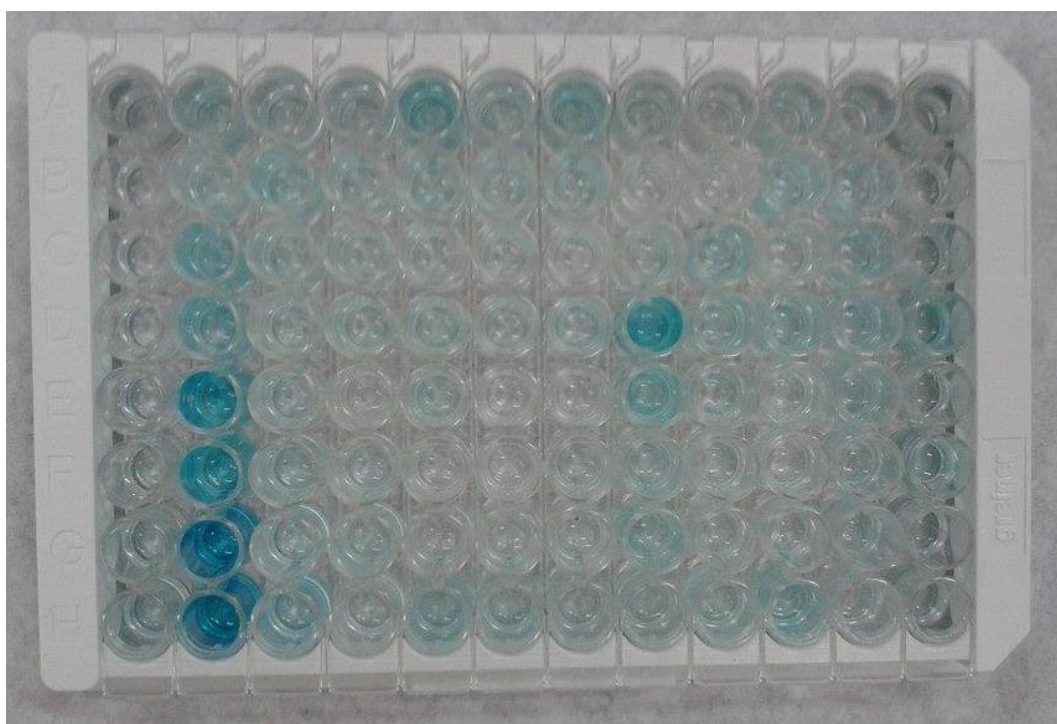


Figura 11. Fotografia da placa de ELISA (*Enzyme-LinkedImmunosorbentAssay*– R&D Systems) com adição de amostras de soro e padrões em cada poço específico depois da adição do substrato tetrametilbenzidina.

2.2.6 Hábitos de vida e comorbidades

Todos os participantes preencheram um questionário com informações sobre estilo de vida e história médica. Com relação ao hábito de fumar, Para etilismo, considerou-se frequência diária de bebidas alcoólicas, independente da dose. Para critério de dislipidemia foram considerados uso de medicamentos hipolipemiantes, assim como valores alterados para o perfil lipídico.

Valor de IMC foi definido como peso (kg) dividido pela altura ao quadrado em metros,⁽¹⁴⁰⁾ e foi categorizado de acordo com a faixa etária. Para indivíduos com idade entre 20 e 60 anos incompletos: $<18,5\text{kg/m}^2$ = Baixo peso; $>18,5$ e $<25\text{kg/m}^2$ = Eutróficos; >25 e $<30\text{kg/m}^2$ = Sobrepeso; $>30\text{kg/m}^2$ = Obesidade. Os indivíduos com idade igual ou maior do que 60 anos: $<22\text{kg/m}^2$ = Baixo peso; >22 e $<27\text{kg/m}^2$ = Eutróficos; $>27\text{kg/m}^2$ = Sobrepeso (Protocolos do Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional – SISVAN, 2008).⁽¹⁴¹⁾

Hipertensão foi definida como pressão arterial sistólica de $\geq 140\text{mmHg}$ e pressão arterial diastólica $\geq 90\text{mmHg}$, ou já haviam sido diagnosticados com hipertensão e/ou estavam em tratamento com medicação anti-hipertensiva.⁽¹⁴⁰⁾

2.2.7 Análise estatística

Foram utilizados os programas MiniTab, Stats Direct e GraphPad. As variáveis qualitativas foram analisadas pelo teste de Fisher ou teste Qui-quadrado (χ^2). A análise de distribuição de genótipos para o cálculo de equilíbrio de Hardy-Weinberg (H-W) foi realizada pelo teste χ^2 . Para as variáveis quantitativas com distribuição gaussiana empregou-se análise de variância (ANOVA) para comparação entre três ou mais grupos. Para as variáveis quantitativas sem distribuição gaussiana foi empregado teste de

Kruskal Wallis na comparação entre três ou mais grupos e Mann Whitney para dois grupos. Para variação da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo dos testes realizados empregou-se a construção de Curvas ROC, admitindo-se como relevância clínica, áreas sob a curva $\geq 0,7$. Empregou-se representação gráfica por meio de box-plot incluindo valor mínimo, intervalo interquartil, mediana e valor máximo, além de eventuais *outliers*. Foi admitido erro alfa de 5% considerando-se significantes valores de $P \leq 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1 Perfil da Casuística

Dados demográficos, hábitos de vida e comorbidades são apresentados na Tabela 1. A idade foi semelhante entre os pacientes com DMRI na forma exsudativa (mediana=77 anos) e seca (mediana=73 anos; $P=0,132$), ambos com faixa etária superior comparado aos controles (mediana=61 anos; $P<0,0001$, para ambos os grupos). Tabagismo prevaleceu nos pacientes com DMRI exsudativa (49%), comparado ao grupo com DMRI seca (20%; $P=0,001$) e controles (29%; $P=0,001$). O mesmo ocorreu para HAS em relação aos controles (70% versus 48%; $P=0,0004$). Houve semelhança entre os grupos para etilismo, dislipidemia e IMC ($P>0,05$).

3.2 Análise de Polimorfismos Genéticos

APOE-rs429358/rs7412

O genótipo *APOE**3/3 destacou-se em ambos os grupos de pacientes ($G1=70\%$; $G2=80\%$) e controles ($G3=76\%$), seguido do genótipo heterozigoto *APOE**3/4 (18%, 16%, 13%, respectivamente), assim como os alelos *APOE**3 (0,85; 0,89; 0,87, respectivamente) e *APOE**4 (0,09; 0,10; 0,07, respectivamente). A distribuição de genótipos e alelos foi semelhante entre os grupos ($P>0,05$; Tabela 2). As frequências genotípicas observadas foram semelhantes à esperada constatando-se equilíbrio H-W ($G1: X^2=0,39$; $P=0,58$; $G2: X^2=0,46$; $P=0,68$; $G3: X^2=0,25$; $P=0,86$).

ABCA4-rs472908

O genótipo heterozigoto (A/G) prevaleceu em todos os grupos, no entanto, com menor frequência nos pacientes com DMRI seca (G2=44%) comparado aos controles (G3=68%; $P < 0,0001$; Tabela 3), o mesmo ocorreu na combinação dos grupos (G1+G2) versus controles ($P = 0,035$). Por outro lado, o homozigoto selvagem (A/A) destacou-se em G2 (36%), comparado a G1 (19%; $P = 0,043$) e G3 (14%; $P = 0,003$), bem como na combinação de pacientes DMRI exsudativa e seca (G1+G2) comparado a G3 ($P = 0,048$). O genótipo mutante (G/G) prevaleceu na combinação dos grupos de pacientes (G1+G2) em relação a G3 ($P < 0,0001$). O alelo G destacou-se em G1 (0,51) e G3 (0,52), e o alelo A em G2 (0,58), embora sem diferença significativa entre os grupos ($P > 0,05$; Tabela 3). Notou-se semelhança entre frequências genotípicas observadas e esperadas com padrão de equilíbrio de H-W em G2 ($X^2 = 0,35$; $P = 0,55$), o que não ocorreu nos outros grupos (G1: $X^2 = 5,53$; $P = 0,01$; G3: $X^2 = 17,3$; $P = 0,030$).

CFH- rs1061170

O genótipo homozigoto selvagem (T/T) destacou-se em todos os grupos, particularmente nos controles (G3=58%) comparado a pacientes com DMRI exsudativa (G1=39%, $P = 0,003$; Tabela 4). Já o homozigoto mutante (C/C) prevaleceu em G1 (27%) e G2 (23%) em relação a G3 (14%; $P = 0,003$; $P = 0,010$ respectivamente), assim como na combinação dos grupos de pacientes (G1+G2) versus controles ($P = 0,009$). O alelo selvagem (T) foi mais frequente nos controles (0,72) comparado a G1 (0,56; $P = 0,0002$) e na combinação de pacientes com DMRI (G1+G2) em relação a G3 ($P = 0,0003$; Tabela 4). A análise comparativa de frequências genotípicas observadas

versus o esperado constatou ausência do padrão de equilíbrio de H-W em todos os grupos (G1: $\chi^2=9,67$; $P=0,001$; G2: $\chi^2=9,67$; $P=0,001$; G3: $\chi^2=15,1$; $P=0,0001$).

VEGF-rs3025039

A distribuição genotípica e alélica foi semelhante entre os grupos ($P>0,05$), com destaque para o genótipo C/C (G1=715; G2=76%; G3=77%) e alelo C (0,86; 0,88; 0,88, respectivamente; Tabela5). Houve semelhança entre a distribuição genotípica observada e esperada, constatando-se equilíbrio de H-W em todos os grupos (G1: $\chi^2 =3,07$; $P=0,07$; G2: $\chi^2=0,87$; $P=0,35$; G3: $\chi^2=2,97$; $P= 0,08$).

VEGF-rs1570360

O genótipo homocigoto mutante (A/A) mostrou maior frequência em G2 (21%), em relação a G1 (5%; $P=0,004$) e G3 (8%; $P=0,024$; Tabela 6). Para a frequência alélica, observou-se prevalência do alelo selvagem (G) em G1 (0,75) e G3 (0,71), comparado a G2 (0,57; $P=0,004$; $P=0,020$, respectivamente; (Tabela 6). A distribuição observada de genótipos foi semelhante à esperada, com padrão de equilíbrio de H-W em todos os grupos (G1: $\chi^2 = 0,92$; $P=0,33$; G2: $\chi^2= 0,41$; $P=0,51$; G3: $\chi^2= 0,25$; $P=0,61$).

Tabela 1. Perfil demográfico, hábitos de vida e comorbidades em pacientes com degeneração macular relacionada à idade nas formas exsudativa (G1) e seca (G2), e indivíduos sem a doença (G3).

Variáveis	G1 (N=108)		G2 (N=45)		G3 (N=180)		P		
							G1xG2	G2xG3	G1xG3
Idade (anos)									
Mediana	77		73		61				
Mínimo	52		50		50	0,132	<0,0001*	<0,0001*	
Máximo	93		87		84				
Gênero	N	%	N	%	N	%			
Masculino	58	54	27	60	90	50	0,592	0,301	0,626
Feminino	50	46	18	40	90	50			
Hábito de vida	N	%	N	%	N	%			
Tabagismo	52	49	9	20	52	29	0,001**	0,311	0,001**
Etilismo	12	11	6	13	24	13	0,925	1,000	0,734
Comorbidade	N	%	N	%	N	%			
HAS	75	70	23	51	86	48	0,040	0,815	0,0004**
Dislipidemia	30	28	12	27	48	27	0,863	1,000	0,908
IMC	65	61	21	48	114	64	0,176	0,077	0,785

*Mann Whitney; **Teste Qui-quadrado; P= nível de significância $P < 0,05$; HAS= hipertensão arterial sistêmica; IMC= índice de massa corporal; N= número de indivíduos.

Tabela 2. Distribuição das frequências alélicas e genótípicas para o polimorfismo *APOE*-rs429358/rs7412 em pacientes com degeneração macular relacionada à idade nas formas exsudativa (G1) e seca (G2), e indivíduos sem a doença (G3).

Genótipo	Polimorfismo <i>APOE</i> rs429358/ rs7412 E3>E2 / E4>E2	*P									
		G1		G2		G3		G1xG2	G2xG3	G1xG3	G1+G2xG3
	Genótipo	N	%	N	%	N	%				
Selvagem	<i>APOE</i> *4/4	0	-	1	2%	0	-	-	0,200	-	1,000
	<i>APOE</i> *3/4	19	18%	7	16 %	23	13%	0,925	0,806	0,326	0,933
Heterozigoto	<i>APOE</i> *3/3	75	70%	36	80%	137	76%	0,290	0,722	0,325	0,604
	<i>APOE</i> *2/4	0	-	0	-	2	1%	-	1,000	0,530	0,502
	<i>APOE</i> *2/3	13	12%	1	2%	18	10%	0,066	0,130	0,710	0,955
Mutante	<i>APOE</i> *2/2	0	-	0	-	0	-	-	-	-	-
	Total	107	100	45	100	180	100				
	<i>APOE</i> *4	19	0,09	9	0,10	25	0,07	0,927	0,448	0,496	0,302
	<i>APOE</i> *3	182	0,85	80	0,89	315	0,87	0,481	0,454	0,976	0,700
	<i>APOE</i> *2	13	0,06	1	0,01	20	0,06	0,072	0,092	0,941	0,706
	Total	214	1,0	90	1,0	360	1,0				

*Teste Qui-quadrado ou Fisher; P= nível de significância $P < 0,05$; N= número de indivíduos; Freq= Frequência absoluta; *APOE* = apolipoproteína E; *E2*=alelo de risco; *E3*= nulo; *E4*= alelo protetor.

Tabela 3. Distribuição das frequências alélicas e genotípicas para o polimorfismo *ABCA4*-rs472908 em pacientes com degeneração macular relacionada à idade nas formas exsudativa (G1) e seca (G2), e indivíduos sem a doença (G3).

Genótipo	Polimorfismo <i>ABCA4</i> rs472908 - A>G	*P									
		G1		G2		G3		G1xG2	G2xG3	G1xG3	G1+G2xG3
	Genótipo	N	%	N	%	N	%				
Selvagem	A/A	20	19%	16	36%	18	14%	0,043	0,003	0,419	0,048
Heterozigoto	A/G	64	60%	20	44%	88	68%	0,118	<0,0001	0,227	0,035
Mutante	G/G	23	21%	9	20%	23	18%	0,836	0,920	0,587	<0,0001
	Total	107	100	45	100	129	100				
	Alelo	N	Freq	N	Freq	N	Freq				
	A	104	0,49	52	0,58	124	0,48				
	G	110	0,51	38	0,42	134	0,52				
	Total	214	1,0	90	1,0	258	1,0				

*Teste Qui-Quadrado; P= nível de significância $P < 0,05$; N= número de indivíduos; Freq= Frequência absoluta; *ABCA4*= ATP-triphosphate binding cassette transporte sub-family A -member 4; G=alelo de risco; A= alelo selvagem.

Tabela 4. Distribuição das frequências alélicas e genótípicas para o polimorfismo *CFH*-rs1061170 em pacientes com degeneração macular relacionada à idade nas formas exsudativa (G1) e seca (G2), e indivíduos sem a doença (G3).

Genótipo	Polimorfismo <i>CFH</i> rs1061170 - T>C	*P									
		G1		G2		G3		G1xG2	G2xG3	G1xG3	G1+G2xG3
	Genótipo	N	%	N	%	N	%				
Selvagem	<i>T/T</i>	41	39	22	51	102	58	0,292	0,434	0,003	0,929
Heterozigoto	<i>C/T</i>	36	34	11	26	50	28	0,401	0,856	0,367	0,593
Mutante	<i>C/C</i>	28	27	10	23	24	14	0,822	0,003	0,010	0,009
	Total	105	100	43	100	176	100				
	Alelo	N	Freq	N	Freq	N	Freq				
	<i>T</i>	118	0,56	55	0,64	254	0,72				
	<i>C</i>	92	0,44	31	0,36	98	0,28	0,271	0,172	0,0002	0,0003
	Total	210	1,0	86	1,0	352	1,0				

*Teste Qui-Quadrado; P= nível de significância $P < 0,05$; N= número de indivíduos; Freq= Frequência absoluta; *CFH*= complemento do fator H; *C*= alelo de risco; *T*= alelo selvagem.

Tabela 5. Distribuição das frequências alélicas e genotípicas para o polimorfismo *VEGF*-rs3025039 em pacientes com degeneração macular relacionada à idade nas formas exsudativa (G1) e seca (G2), e indivíduos sem a doença (G3).

Genótipo	Polimorfismo <i>VEGF</i> rs3025039 – C>T	*P									
		G1		G2		G3		G1xG2	G2xG3	G1xG3	G1+G2xG3
	Genótipo	N	%	N	%	N	%				
Selvagem	C/C	76	71	34	76	139	77	0,710	0,968	0,303	0,373
Heterozigoto	T/C	31	29	11	24	41	23				
Mutante	T/T	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-
	Total	107	100	45	100	180	100				
	Alelo	N	Freq	N	Freq	N	Freq				
	C	183	0,86	79	0,88	313	0,88				
	T	31	0,14	11	0,12	41	0,12				
	Total	214	1,0	90	1,0	313	1,0				

* Teste Qui-quadrado ou Fisher; P= nível de significância $P < 0,05$; N= número de indivíduos; Freq= Frequência absoluta; *VEGF*= fator de crescimento endotelial vascular; T= alelo de risco; C= alelo selvagem.

Tabela 6. Distribuição das frequências alélicas e genotípicas para o polimorfismo *VEGF*-rs1570360 em pacientes com degeneração macular relacionada à idade nas formas exsudativa (G1) e DMRI seca (G2), e indivíduos sem a doença (G3).

Genótipo	Polimorfismo <i>VEGF</i> rs1570360 - G>A									*P	
		G1		G2		G3		G1xG2	G2xG3	G1xG3	G1+G2xG3
	Genótipo	N	%	N	%	N	%				
Selvagem	<i>G/G</i>	57	54	15	35	88	49	0,056	0,129	0,528	0,967
Heterozigoto	<i>A/G</i>	44	41	19	44	77	43	0,907	0,889	0,900	0,982
Mutante	<i>A/A</i>	5	5	9	21	14	8	0,004	0,024	0,376	0,756
	Total	106	100	43	100	179	100				
	Alelo	N	Freq	N	Freq	N	Freq				
	G	158	0,75	49	0,57	253	0,71				
	A	54	0,25	37	0,43	105	0,29				
	Total	212	1,0	86	1,0	358	1,0				

* Teste Qui-quadrado ou Fisher; P= nível de significância $P < 0,05$; N= número de indivíduos; Freq= Frequência absoluta; *VEGF*= fator de crescimento endotelial vascular; A= alelo de risco; G= alelo selvagem.

3.3 Relação entre Polimorfismos Genéticos, Hábitos de Vida e Comorbidades

Na análise comparativa da distribuição dos respectivos genótipos em relação ao tabagismo (Tabela 7), destacou-se *APOE**_ε/2 em G1 comparado a G3 (P=0,0004), assim como *APOE**_ε3/3 em G1 em relação a G2 (P<0,0001). A análise intragrupo mostrou em G3 menor frequência de fumantes com genótipo *APOE**_ε/2 em relação a *APOE**_ε3/3 (P=0,026).

O genótipo de risco _ε/G (*ABCA4*) prevaleceu nos fumantes em G1 versus G2 (P=0,003), o que também ocorreu para o genótipo A/A em G1, comparado a G3 (P=0,003). Em relação ao polimorfismo *CFH*-rs1061170 observou-se em G1 maior frequência de tabagistas com genótipo T/T, comparado a G3 (P=0,001), o que também ocorreu em relação a G2 (P=0,031). Para *VEGF*-rs3025039 prevaleceu em G1 o genótipo C/C e tabagismo, comparado a G3 (P=0,0005), o mesmo ocorreu em relação a G2 (P=0,001). Para *VEGF*-rs1570360, em G1 houve aumento de frequência de fumantes com genótipo de risco (_ε/A), comparado a G3 (P= 0,006), o mesmo ocorreu em relação a G2 (P=0,046; Tabela 7).

Tabela 7. Frequência de hábito tabagista distribuída de acordo com os genótipos dos polimorfismos *APOE*-rs429358/rs7412, *ABCA4*-rs472908, *CFH*-rs1061170, *VEGF*-rs3025039 e *VEGF*-rs1570360 em pacientes com degeneração macular relacionada à idade nas formas exsudativa (G1) e seca (G2), e indivíduos sem a doença (G3).

Genótipo	G1				G2				G3				* P		
	Fuma		Não Fuma		Fuma		Não Fuma		Fuma		Não Fuma		G1xG3	G1xG2	G2xG3
N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%				
<i>APOE</i>-rs429358/rs7412															
-/E2	6	14	7	16	0	0	7	19	1	6	41	30	0,0004	1,000	1,000
E3/E3	38	86	37	84	1	100	29	81	17	94	96	70	<0,0001	<0,0001	0,121
Total	44	100	44	100	1	100	36	100	18	100	137	100			
*P			0,763				1,000				0,026				
<i>ABCA4</i>-rs472908															
-/G	39	75	48	87	4	44	25	69	43	93	68	82	0,472	0,003	0,114
AA	13	25	7	13	5	56	11	31	3	7	15	18	0,003	0,092	0,429
Total	52	100	55	100	9	100	36	100	46	100	83	100			
*P			0,167				0,244				0,109				
<i>CFH</i>-rs1061170															
-/C	28	56	36	65	4	44	17	50	27	53	47	38	0,487	0,067	0,188
TT	22	44	19	35	5	56	17	50	24	47	78	62	0,001	0,031	1,000
Total	50	100	55	100	9	100	34	100	51	100	125	100			
*P			0,428				1,000				0,088				
<i>VEGF</i>-rs3025039															
-/T	13	25	18	33	3	33	8	22	15	29	26	20	0,828	0,485	0,727
CC	39	75	37	67	6	67	28	78	37	71	102	80	0,0005	0,001	1,000
Total	52	100	55	100	9	100	36	100	52	100	128	100			
*P			0,504				0,666				0,297				
<i>VEGF</i>-1570360															
-/A	25	49	24	44	7	78	21	62	24	47	67	52	0,006	0,046	0,884
GG	26	51	31	56	2	22	13	38	27	53	61	48	0,099	0,305	0,222
Total	51	100	55	100	9	100	34	100	51	100	128	100			
*P			0,718				0,458				0,636				

N= número de indivíduos; *APOE*= apolipoproteína E; *ABCA4*= ATP-triphosphate binding cassette transporte sub-family A -member 4; *CFH*= complemento do fator h; *VEGF*= fator de crescimento endotelial vascular; *Teste de Fisher ou Qui-Quadrado com nível de significância para P<0,05.

A Tabela 8 apresenta a frequência de hábito etilista nos grupos estudados distribuída de acordo com os genótipos. A análise intragrupo mostrou semelhança entre os genótipos para cada polimorfismo, exceto *VEGF*-rs3025039 em G1 com maior frequência de etilismo e genótipo $_T$ (56%), comparado ao grupo de não etilistas (22%; $P=0,001$). A análise entre grupos mostrou para *CFH*-rs1061170 menor frequência de etilistas com genótipo de risco ($_/C$) em pacientes com DMRI exsudativa (G1), em relação aos grupo controle (G3; $P=0,005$). Para o genótipo *T/T* notou-se menor frequência de etilismo em G1 e G2 comparado a G3 ($P=0,0002$; $P=0,035$, respectivamente).

Tabela 8. Frequência de hábito etilista distribuída de acordo com os genótipos dos polimorfismos *APOE*-rs429358/rs7412, *ABCA4*-rs472908, *CFH*-rs1061170, *VEGF*-rs3025039 e *VEGF*-rs1570360 em pacientes com degeneração macular relacionada à idade nas formas exsudativa (G1) e seca (G2), e indivíduos sem a doença (G3).

Genótipo	G1				G2				G3				* P		
	Bebe		Não Bebe		Bebe		Não Bebe		Bebe		Não Bebe		G1xG3	G1xG2	G2xG3
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%			
<i>APOE</i>-rs429358/rs7412															
-/E2	2	20	11	14	0	0	1	3	0	0	18	13	0,167	1,000	-
E3/E3	8	80	67	86	6	100	30	97	20	100	117	87	0,550	0,557	0,962
Total	10	100	78	100	6	100	31	100	20	100	135	100			
*P			0,638				1,000				0,131				
<i>ABCA4</i>-rs472908															
-/G	8	67	79	83	6	67	26	67	15	94	96	85	0,472	0,265	0,649
AA	4	33	16	17	3	33	13	33	1	6	17	15	0,343	1,000	0,322
Total	12	100	95	100	9	100	39	100	16	100	113	100			
*P			0,231				1,000				0,468				
<i>CFH</i>-rs1061170															
-/C	6	55	58	62	2	33	4	18	9	12	15	15	0,005	0,136	1,000
TT	5	45	36	38	4	67	18	82	65	88	87	85	0,0002	0,707	0,035
Total	11	100	94	100	6	100	22	100	74	100	102	100			
*P			0,747				0,580				0,792				
<i>VEGF</i>-rs3025039															
-/T	15	56	26	22	0	0	11	28	6	25	35	22	0,043	0,118	0,321
CC	12	44	90	78	6	100	28	72	18	75	121	78	0,938	0,559	0,664
Total	27	100	116	100	6	100	39	100	24	100	156	100			
*P			0,001				0,311				0,986				
<i>VEGF</i>-1570360															
-/A	7	64	42	44	2	33	26	70	11	46	80	52	0,915	0,474	0,730
GG	4	36	53	56	4	67	11	30	13	54	75	48	0,192	0,053	0,266
Total	11	100	95	100	6	100	37	100	24	100	155	100			
*P			0,339				0,161				0,758				

N= número de indivíduos; *APOE*= apolipoproteína E; *ABCA4*= ATP-triphosphate binding cassette transporte sub-family A -member 4; *CFH*= complemento do fator h; *VEGF*= fator de crescimento endotelial vascular; Teste de Fisher ou Qui-Quadrado com nível de significância para $P < 0,05$.

A Tabela 9 apresenta a frequência de HAS nos grupos distribuída de acordo com os genótipos dos respectivos polimorfismos. A análise intragrupo mostrou para o polimorfismo *ABCA4*-rs472908 em DMRI exsudativa o genótipo de risco ($_/G$) mais frequente em hipertensos (88%), em relação aqueles não hipertensos (66%; $P=0,014$), já o polimorfismo *VEGF*-rs3025039 apresentou prevalência de $_/T$ e HAS (49%) comparado aqueles sem hipertensão (17%; $P=0,0008$).

Na análise entre grupos observou-se em *APOE*-rs429358/rs7412 prevalência de hipertensos com genótipo *E3/E3* em G1, comparado a G2 e G3 ($P=0,042$; $P=0,019$, respectivamente). Para *ABCA4*-rs472908 notou-se maior frequência de genótipos $_/G$ e HAS em G1 comparado a G3 ($P<0,0001$). Em *CFH*-rs1061170 destacou-se aumento do genótipo *T/T* e hipertensão em G1 versus G3 ($P=0,005$). Em relação ao polimorfismo *VEGF*-rs3025039, observou-se menor frequência do genótipo selvagem (*C/C*) e hipertensos em G1, comparado a G2 e G3 ($P=0,018$; $P=0,009$ respectivamente; Tabela 9).

Para dislipidemia, distribuída de acordo com os genótipos dos polimorfismos *APOE*-rs429358/rs7412, *ABCA4*-rs472908, *CFH*-rs1061170, *VEGF*-rs3025039 e *VEGF*-rs1570360, houve semelhança intra e entre grupos ($P>0,05$), exceto para *E3/E3* (*APOE*) e dislipidemia com menor frequência em G2 comparado a G3 ($P=0,005$; Tabela 10).

Tabela 9. Frequência de hipertensão arterial sistêmica (HAS) distribuída de acordo com os genótipos dos polimorfismos *APOE*-rs429358/rs7412, *ABCA4*-rs472908, *CFH*-rs1061170, *VEGF*-rs3025039 e *VEGF*-rs1570360 em pacientes com degeneração macular relacionada à idade nas formas exsudativa (G1) e seca (G2), e indivíduos sem a doença (G3).

Genótipo	G1				G2				G3				* P		
	HAS		Não HAS		HAS		Não HAS		HAS		Não HAS		G1xG3	G1xG2	G2xG3
N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%				
<i>APOE</i>-rs429358/rs7412															
-/E2	10	17	3	11	1	6	0	0	8	11	10	13	0,139	1,000	0,473
E3/E3	50	83	25	89	16	94	20	100	67	89	70	87	0,019	0,042	0,772
Total	60	100	28	100	17	100	20	100	75	100	80	100			
*P			0,538			0,459				0,916					
<i>ABCA4</i>-rs472908															
-/G	66	88	21	66	18	78	11	50	52	85	59	87	< 0,0001	0,230	0,210
AA	9	12	11	34	5	22	11	50	9	15	9	13	0,757	0,619	0,315
Total	75	100	32	100	23	100	22	100	61	100	68	100			
*P			0,014			0,065				0,803					
<i>CFH</i>-rs1061170															
-/C	45	60	16	59	12	57	9	41	36	43	38	41	0,106	0,397	0,660
TT	30	40	11	41	9	43	13	59	47	57	55	59	0,005	0,225	0,837
Total	75	100	27	100	21	100	22	100	83	100	93	100			
*P			0,924			0,447				0,853					
<i>VEGF</i>-rs3025039															
-/T	20	49	11	17	5	22	6	27	21	24	20	21	0,374	0,304	0,734
CC	21	51	55	83	18	78	16	73	65	76	74	79	0,009	0,018	0,649
Total	41	100	66	100	23	100	22	100	86	100	94	100			
*P			0,0008			0,738				0,745					
<i>VEGF</i>-1570360															
-/A	35	47	14	45	16	76	12	55	48	56	43	46	0,409	0,305	0,848
GG	40	53	17	55	5	24	10	45	37	44	51	54	0,100	0,115	0,582
Total	75	100	31	100	21	100	22	100	85	100	94	100			
*P			0,887			0,242				0,199					

N= número de indivíduos; *APOE*= apolipoproteína E; *ABCA4*= ATP-triphosphate binding cassette transporte sub-family A -member 4; *CFH*= complemento do fator h; *VEGF*= fator de crescimento endotelial vascular; HAS= hipertensão arterial sistêmica; Teste de Fisher ou Qui-Quadrado com nível de significância para $P < 0,05$.

Tabela 10. Frequência de dislipidemia distribuída de acordo com os genótipos dos polimorfismos *APOE*-rs429358/ rs7412, *ABCA4*-rs472908, *CFH*-rs1061170, *VEGF*-rs3025039 e *VEGF*-rs1570360 em pacientes com degeneração macular relacionada à idade nas formas exsudativa (G1) e seca (G2), e indivíduos sem a doença (G3).

Genótipo	G1				G2				G3				* P		
	DISL		Não DISL		DISL		Não DISL		DISL		Não DISL		G1xG3	G1xG2	G2xG3
N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%				
<i>APOE</i>-rs429358/															
rs7412															
-/E2	3	13	10	15	0	0	10	28	4	8	11	10	1,000	1,000	1,000
E3/E3	20	87	55	85	1	100	26	72	37	90	100	90	0,957	0,110	0,005
Total	23	100	65	100	1	100	36	100	41	100	111	100			
*P			1,000				1,000				1,000				
<i>ABCA4</i>-rs472908															
-/G	25	83	62	81	9	75	20	61	28	85	83	86	0,695	0,813	0,692
AA	5	17	15	19	3	25	13	39	5	15	13	14	1,000	0,708	0,693
Total	30	100	77	100	12	100	33	100	33	100	96	100			
*P			1,000				0,491				0,777				
<i>CFH</i>-rs1061170															
-/C	18	60	46	61	5	42	16	52	23	49	51	40	0,847	0,917	0,708
TT	12	40	29	39	7	58	15	48	24	51	78	60	0,615	0,833	0,587
Total	30	100	75	100	12	100	31	100	47	100	129	100			
*P			0,899				0,806				0,344				
<i>VEGF</i>-rs3025039															
-/T	9	30	22	29	2	17	9	27	7	15	34	26	0,356	0,262	1,000
CC	21	70	55	71	10	83	24	73	41	85	98	74	0,895	0,847	0,992
Total	30	100	77	100	12	100	33	100	48	100	132	100			
*P			0,883				0,699				0,167				
<i>VEGF</i>-1570360															
-/A	10	33	39	51	8	29	4	27	28	31	20	23	0,264	0,593	0,824
GG	20	67	37	49	20	71	11	73	63	69	68	77	0,136	0,115	0,148
Total	30	100	76	100	28	100	15	100	91	100	88	100			
*P			0,145				1,000				0,295				

N= número de indivíduos; *APOE*= apolipoproteína E; *ABCA4*= ATP-triphosphate binding cassette transporte sub-family A -member 4; *CFH*= complemento do fator h; *VEGF*= fator de crescimento endotelial vascular; DISL= dislipidemia; Teste de Fisher ou Qui-Quadrado com nível de significância para $P < 0,05$.

A Tabela 11 mostra frequência de IMC correspondente ao grupo de eutróficos e aqueles com IMC alterado, de acordo com os genótipos. A análise intra-grupo mostrou semelhança na distribuição dos genótipos em todos os grupos ($P > 0,05$). Enquanto na comparação entre grupos para *VEGF*-rs3025039 notou-se maior frequência da combinação eutróficos e *C/C* em G2, comparado a G3 ($P = 0,047$), enquanto para *VEGF*-rs1570360 houve menor frequência de genótipos de risco *_/A* e IMC alterado em G1 versus G2 ($P = 0,017$).

Tabela 11. Frequência de índice de massa corporal (IMC) distribuída de acordo com os genótipos dos polimorfismos *APOE*-rs429358/rs7412, *ABCA4*-rs472908, *CFH*-rs1061170, *VEGF*-rs3025039 e *VEGF*-rs1570360 em pacientes com degeneração macular relacionada à idade nas formas exsudativa (G1) e seca (G2), e indivíduos sem a doença (G3).

Genótipo	G1				G2				G3				* P		
	IMC Eutrófico		IMC Baixo peso/ Sobrepeso/Obesidade		IMC Eutrófico		IMC Baixo peso/ Sobrepeso/Obesidade		IMC Eutrófico		IMC Baixo peso/ Sobrepeso/Obesidade		G1xG3	G1xG2	G2xG3
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%			
<i>APOE</i>-rs429358/rs7412															
-/E2	9	15	4	14	1	5	0	0	12	12	6	11	1,000	1,000	1,000
E3/E3	50	85	25	86	18	95	17	100	88	88	48	89	0,892	0,186	0,212
Total	59	100	29	100	19	100	17	100	100	100	54	100			
*P			1,000				1,000				0,869				
<i>ABCA4</i>-rs472908															
-/G	50	76	37	91	12	57	16	70	64	85	46	87	0,920	0,257	0,214
AA	16	24	4	10	9	43	7	30	11	15	7	13	0,287	0,159	0,773
Total	66	100	41	100	21	100	23	100	75	100	53	100			
*P			0,076				0,587				0,815				
<i>CFH</i>-rs1061170															
-/C	38	58	26	65	9	45	11	50	52	46	22	35	0,245	0,383	0,066
TT	27	42	14	35	11	55	11	50	60	54	41	65	0,599	0,339	0,567
Total	65	100	40	100	20	100	22	100	112	100	63	100			
*P			0,644				0,988				0,186				
<i>VEGF</i>-rs3025039															
-/T	19	29	12	29	6	29	5	22	23	20	18	28	0,840	0,972	0,926
CC	47	71	29	71	15	71	18	78	91	80	47	72	0,652	0,168	0,047
Total	66	100	41	100	21	100	23	100	114	100	65	100			
*P			0,957				0,861				0,334				
<i>VEGF</i>-1570360															
-/A	35	54	14	34	11	55	16	73	59	52	32	49	0,069	0,017	0,281
GG	30	46	27	66	9	45	6	27	54	48	33	51	0,341	0,827	0,879
Total	65	100	41	100	20	100	22	100	113	100	65	100			
*P			0,074				0,271				0,820				

N= número de indivíduos; *APOE*= apolipoproteína E; *ABCA4*= ATP-triphosphate binding cassette transporte sub-family A -member 4; *CFH*= complemento do fator h; *VEGF*= fator de crescimento endotelial vascular; DISL= dislipidemia; Teste de Fisher ou Qui-Quadrado com nível de significância para P<0,05.

3.4 Análise de Expressão Gênica

A Figura 12 representa os valores de mediana e quartis dos níveis de expressão de RNA para *APOE*, *ABCA4*, *CFH* e *VEGF* em pacientes com DMRI na forma exsudativa e seca. Notou-se para os respectivos genes acréscimo na expressão particularmente no grupo com a forma exsudativa, embora sem diferença significativa em relação à forma seca da doença, destacando-se valor de mediana para *VEGF* de 0,85ng/mL (versus 0,68ng/mL; P= 0,215), seguido de *ABCA4* com mediana de 0,71ng/mL (versus 0,36ng/mL; P= 0,251), *CFH* (0,68ng/mL versus 0,34ng/mL; P=0,305) e *APOE* (0,36ng/mL versus 0,30ng/mL; P=0,330).

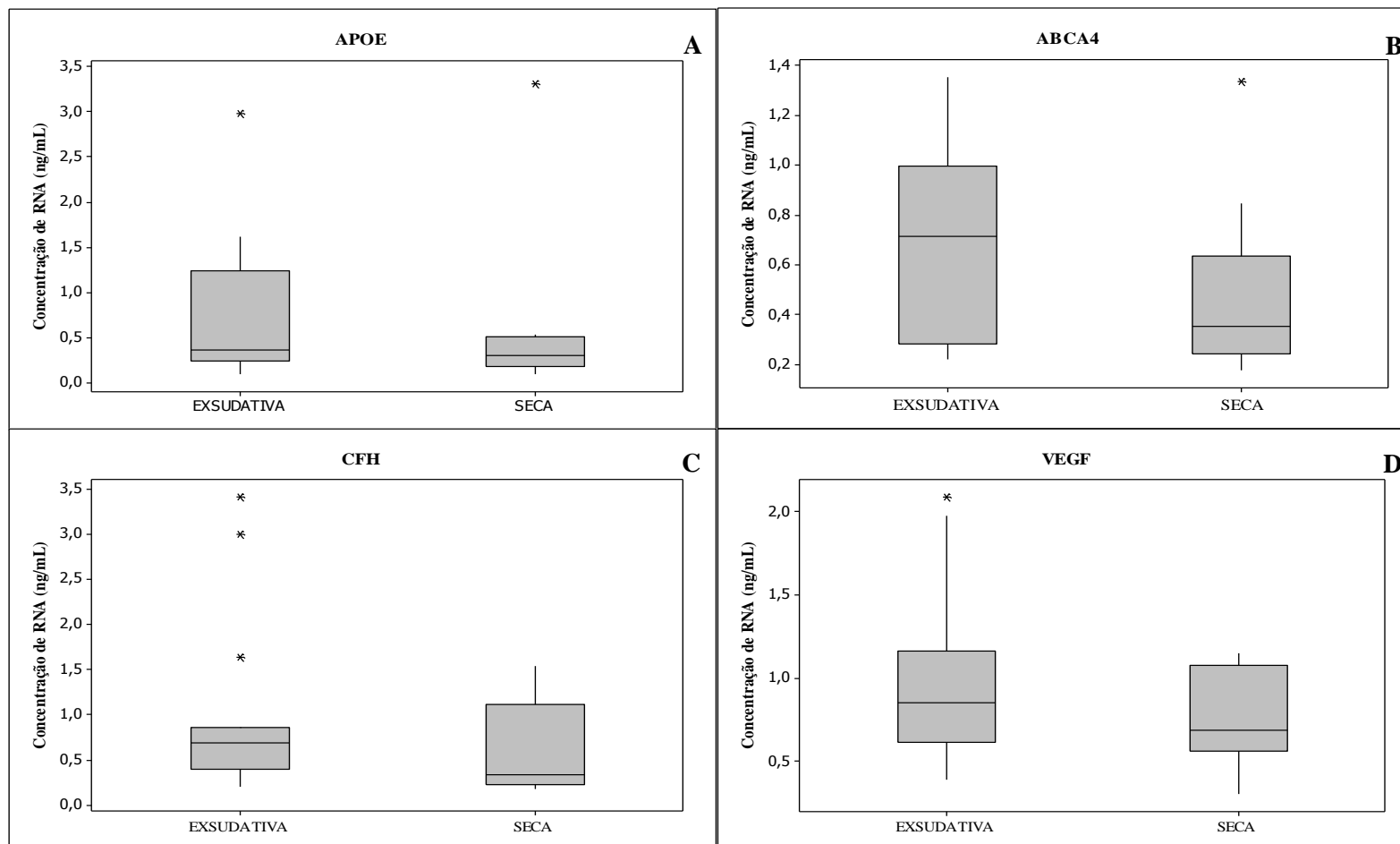


Figura 12. Representação esquemática por “box-plot” de valores de mediana e quartis dos níveis de expressão de RNA para A) apolipoproteína E (*APOE*): Exsudativa: Q1=0,235ng/mL; Q3=1,241ng/mL; IQR=1,006ng/mL; Seca: Q1=0,181ng/mL; Q3=0,505ng/mL; IQR=0,324ng/mL; B) *ATP-triphosphate binding cassette transporte sub-family A -member 4 (ABCA4)*: Exsudativa: Q1=0,282ng/mL; Q3=0,995ng/mL; IQR=0,712ng/mL; Seca: Q1= 0,243ng/mL; Q3=1,115ng/mL; IQR=0,879ng/mL; C) complemento do fator H (*CFH*): Exsudativa: Q1=0,618ng/mL; Q3=1,163ng/mL; IQR=0,545ng/mL; Seca: Q1=0,565ng/mL; Q3=1,078ng/mL; IQR=0,512ng/mL; D) fator de crescimento endotelial vascular (*VEGF*): Exsudativa: Q1=0,618ng/mL; Q3=1,163 ng/mL; IQR=0,545ng/mL; Seca: Q1=0,565pg/mL; Q3=1,078pg/mL; IQR=0,512pg/mL. Teste Mann-Whitney: P>0,05.

3.5 Dosagem Sérica

Houve diferença significativa entre os grupos em relação aos níveis séricos de apo E, com destaque para pacientes com DMRI exsudativa (mediana=270,6ng/mL), comparado à forma seca (G2=196,5ng/mL; $P<0,0001$) e controles (G3=242,8ng/mL; $P=0,035$), cujos valores mostraram-se aumentados em relação a G2 ($P=0,0002$, Figura 13).

O grupo com DMRI exsudativa também mostrou valores mais elevados de ABCR (mediana=0,30ng/mL), comparado a forma seca e controles, cujos valores de mediana foram semelhantes em ambos os grupos (0,25ng/mL; $P=0,003$; $P<0,0001$, respectivamente; Figura 14).

Para CFH notou-se diferença entre os grupos de pacientes (G1=1.198,9ng/mL; G2=859,8ng/mL; $P=0,0069$), ambos os valores aumentados em relação ao grupo controle (G3=618,3 ng/mL; $P<0,001$; $P=0,001$, respectivamente; Figura 15).

Valores séricos de VEGF mostraram-se semelhantes entre os grupos, com mediana de 277,1pg/mL e 293,7pg/mL em pacientes com DMRI exsudativa e seca, respectivamente, e 210,8pg/mL nos indivíduos sem a doença ($P>0,05$; Figura 16).

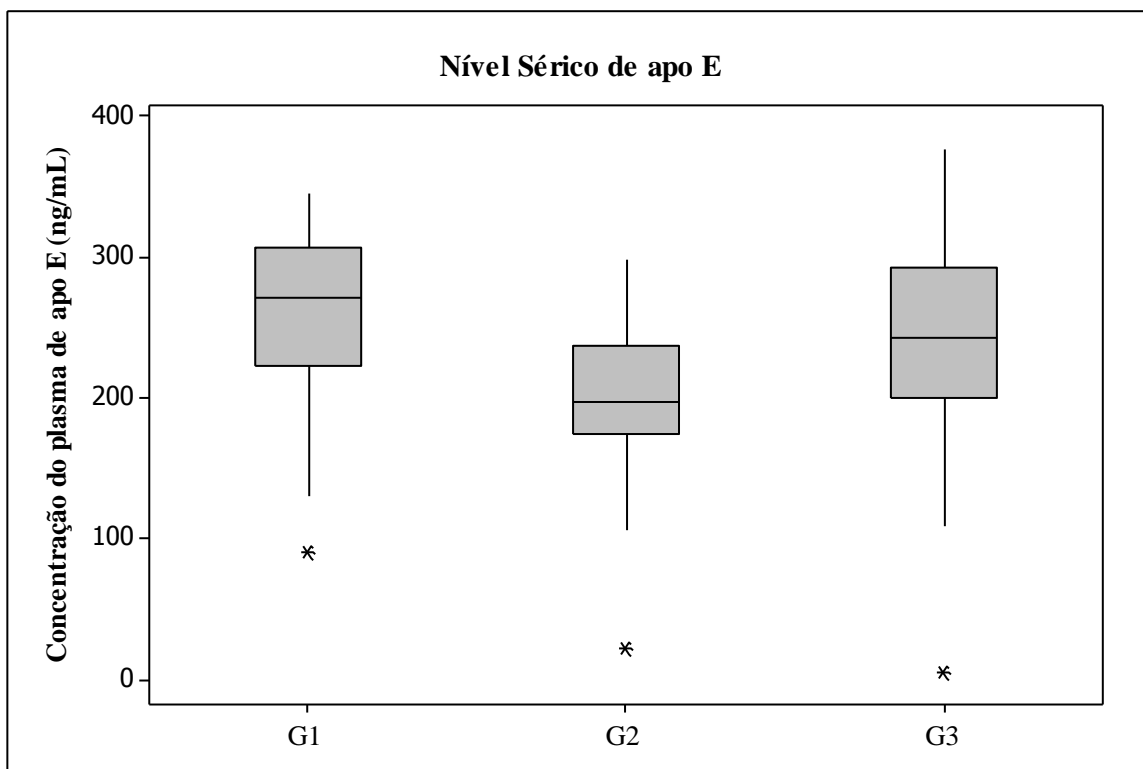


Figura 13. Representação esquemática por “box-plot” de valores de medianas e quartis dos níveis séricos de apolipoproteína E (apo E) em pacientes com degeneração macular relacionada à idade nas formas exsudativa (G1) e seca (G2), e indivíduos sem a doença (G3). *outlier; G1: Q1=222,9ng/mL;Q3=306,8ng/mL; IQR=83,9ng/mL-G2:Q1=174,7ng/mL;Q3=236,6ng/mL;IQR=61,9ng/mL-G3: Q1=200,4ng/mL; Q3=292,1ng/mL; IQR=92,1ng/mL. Teste Mann-Whitney: G1xG2: P<0,0001; G2xG3: P=0,0002; G1xG3: P=0,035.

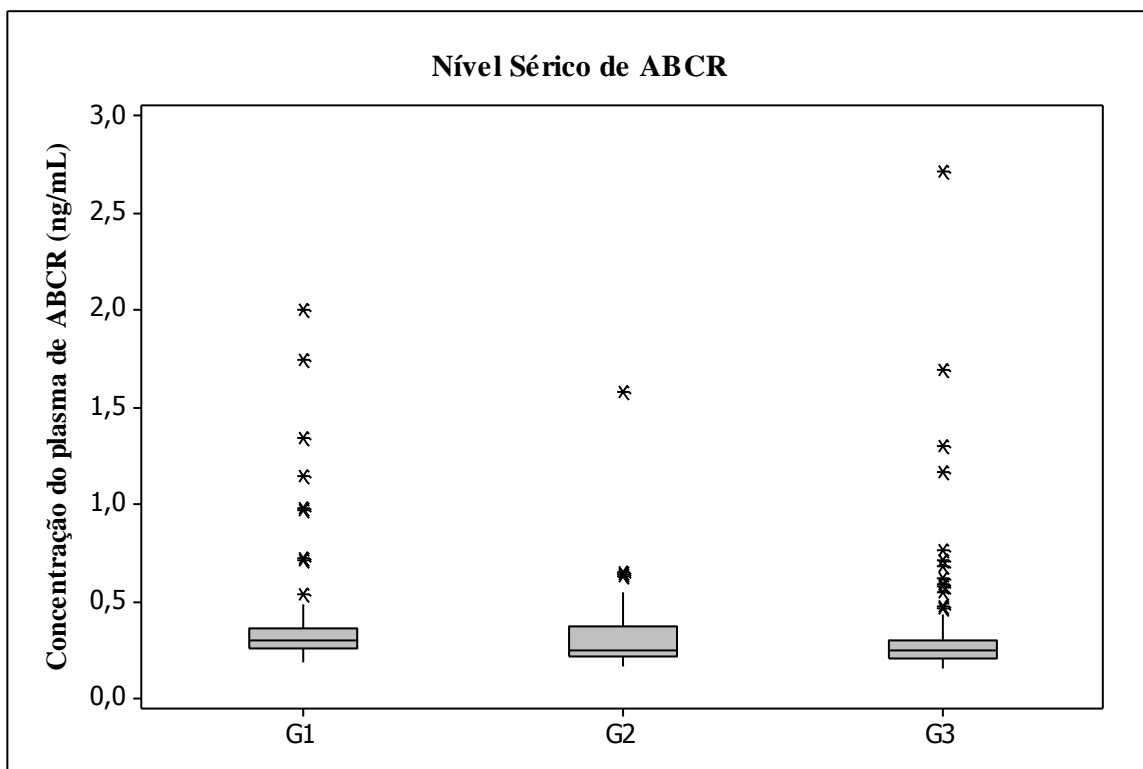


Figura 14. Representação esquemática por “box-plot” de valores de medianas e quartis dos níveis séricos de *ATP-triphosphate binding cassette transporte sub-family A-member 4* (ABCR) em pacientes com degeneração macular relacionada à idade nas formas exsudativa (G1) e seca (G2), e indivíduos sem a doença (G3). *outlier; G1: Q1=0,26ng/mL; Q3=0,36ng/mL; IQRRange: 0,10ng/mL - G2: Q1=0,22ng/mL; Q3=0,37ng/mL; IQRRange: 0,15ng/mL - G3: Q1=0,21ng/mL; Q3=0,3ng/mL; IQRRange: 0,09ng/mL. Teste Mann-Whitney: G1xG2: P=0,003; G1xG3: P<0,0001; G2xG3: P=0,632.

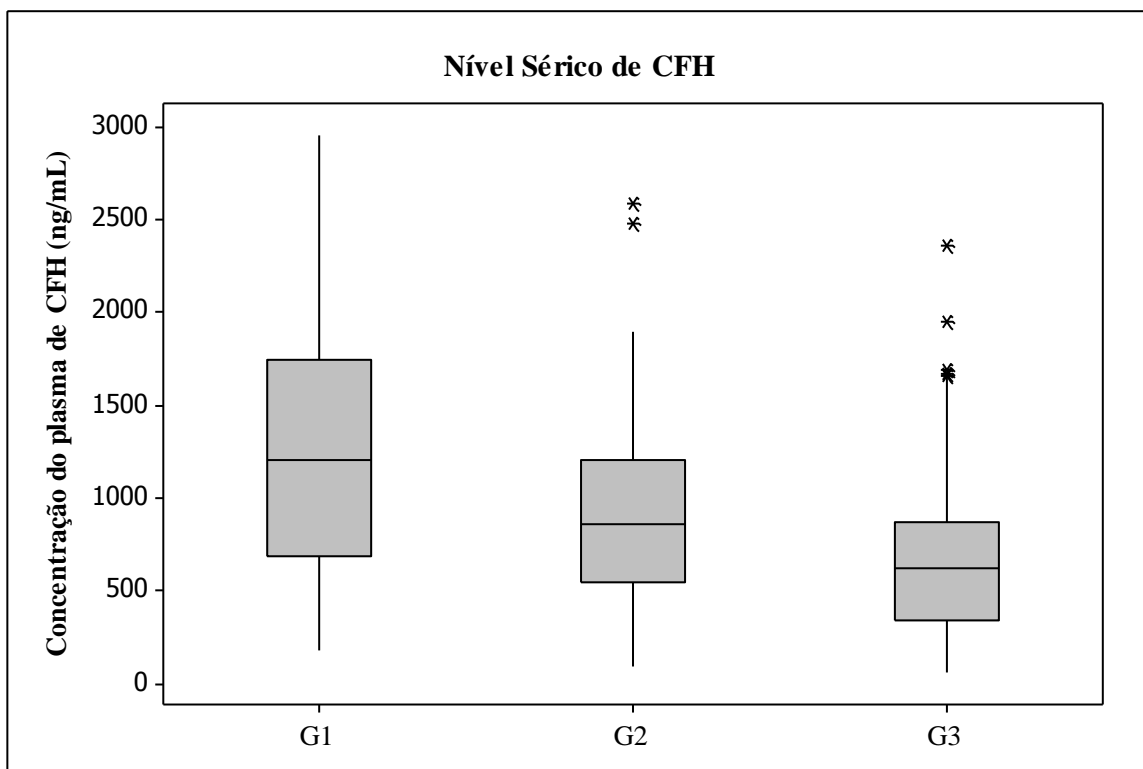


Figura 15. Representação esquemática por “box-plot” com valores de medianas e quartis dos níveis séricos de fator de complemento H (CFH) em pacientes com degeneração macular relacionada à idade nas formas exsudativa (G1) e seca (G2), e indivíduos sem a doença (G3). *outlier; G1: Q1=688,4ng/mL; Q3=1.745,4ng/mL; IQRRange: 1.056,9ng/mL - G2: Q1=550,0ng/mL; Q3=1.206,3ng/mL; IQRRange: 656,3ng/mL - G3: Q1=341,9ng/mL; Q3=868,0ng/mL; IQRRange=526,1ng/mL. Teste de Mann-Whitney: G1xG3: P<0,001; G1xG2: P=0,0069; G2xG3: P=0,001.

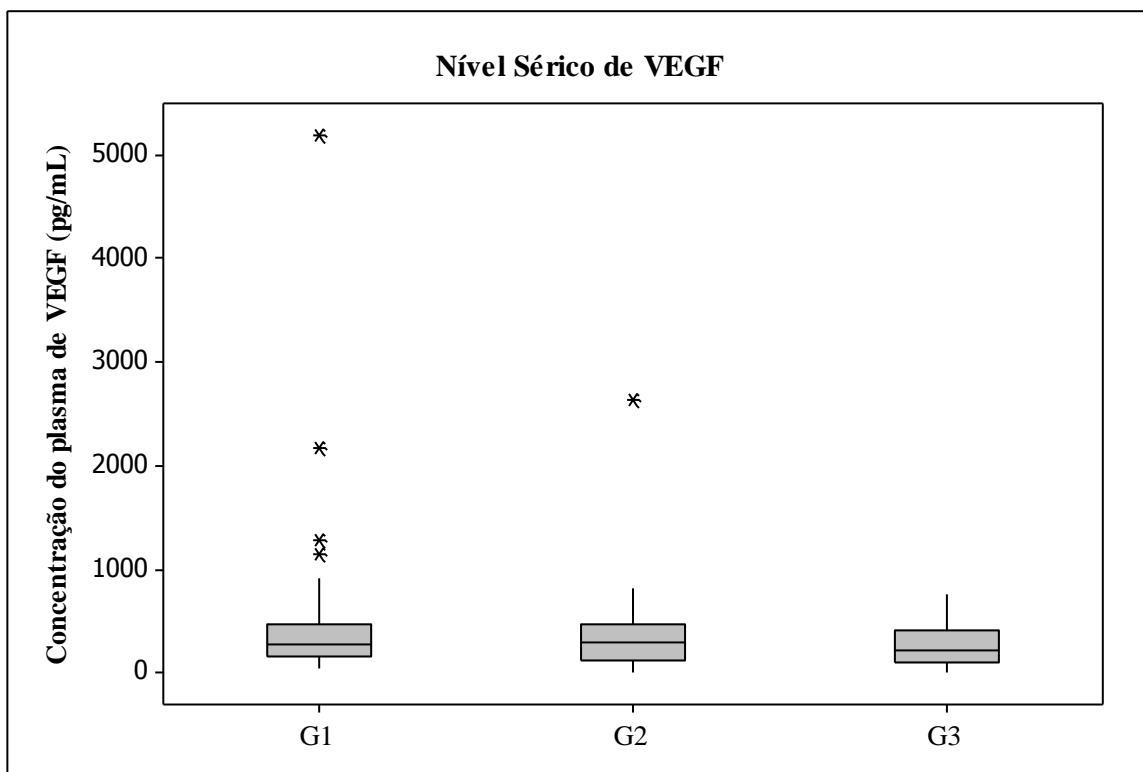


Figura 16. Representação esquemática por “box-plot” com valores de medianas e quartis dos níveis séricos de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em pacientes com degeneração macular relacionada à idade nas formas exsudativa (G1) e seca (G2), e indivíduos sem a doença (G3). *outlier; G1: Q1=148,0pg/mL; Q3=459,7pg/mL; IQRRange: 311,7pg/mL - G2: Q1=124,9pg/mL; Q3=457,9g/mL; IQRRange:332,9pg/mL-G3:Q1=95,1pg/mL;Q3=412,5pg/mL;IQRRange=317,4pg/mL. Teste Kruskal Wallis: P >0,05.

3.6 Curva Receiver Operator Characteristic

A curva *receiver operator characteristic* (ROC) foi utilizada para avaliar o poder discriminativo de cada variável. A proteína apoE mostrou-se relevante na discriminação entre G2 e G3 com sensibilidade de 67% e especificidade de 71% [área sob a curva = 0,70], valor preditivo positivo e negativo de 0,53 e 0,81, respectivamente, e *cutt-off* de 208,8 pg/mL. O mesmo ocorreu para a proteína CFH, notou-se relevante na discriminação entre G1 e G2 com sensibilidade de 59% e especificidade de 82% [área sob a curva = 0,75], valor preditivo positivo de 0,77 e negativo de 0,65, respectivamente, e *cutt-off* de 1.014,19 ng/mL. Valores séricos de ABCA4 e VEGF não permitiram diferenciar os grupos ($P>0,05$).

3.7 Relação entre Dosagem Sérica e Perfil Genético

A Tabela 12 apresenta a distribuição da dosagem sérica das proteínas apo E, ABCR, CFH e VEGF nos grupos de pacientes e controles. A análise intra grupo mostrou semelhança entre os genótipos para cada polimorfismo em todos os grupos ($P > 0,05$). Porém, na análise entre grupos para *ABCA4* notou-se aumento de níveis séricos de ABCR no heterozito *A/G* em G1 em relação a G2 e G3 ($P < 0,0001$; $P = 0,0004$, respectivamente). Assim como para *A/A* em relação a G1 e G2 versus G3 ($P = 0,002$; $P = 0,015$). Em *CFH* houve prevalência de níveis séricos da respectiva proteína em portadores do genótipo de risco *C/C* em G1 versus G2 ($P = 0,034$) e G3 ($P = 0,011$). Além disso, para o genótipo selvagem (*T/T*) níveis elevados foram observados em G1 comparado a G2 ($P < 0,0001$) e G3 ($P = 0,005$). Para *APOE* notou-se níveis elevados da proteína apo E e genótipos *APOE*/_2* em G1 versus G3 ($P = 0,007$), o mesmo ocorreu para *APOE*3/3* em G1 e G3 versus G2 ($P < 0,0001$; $P = 0,0005$, respectivamente), assim como em *APOE*/_4* ($P = 0,007$; $P = 0,034$, respectivamente).

Tabela 12. Valores de mediana, mínimo e máximo das dosagens séricas de proteínas (ng/mL/pg/mL) distribuídos de acordo com seus respectivos genótipos referentes aos polimorfismos *APOE*- rs429358/ rs7412, *ABCA4*-rs472908, *CFH*-rs1061170, *VEGF*-rs3025039 e *VEGF*-rs1570360 em pacientes com degeneração macular relacionada à idade nas formas exsudativa (G1) e seca (G2), e indivíduos sem a doença (G3).

Genótipo	G1				G2				G3				
	Mediana	Mínimo	Máximo	P	Mediana	Mínimo	Máximo	P	Mediana	Mínimo	Máximo	P	P total
<i>APOE</i> -E/2	253,40π	188,17	325,94		191,89	191,89	191,89		214,67π	109,12	325,35		<0,05 2κ
<i>E3/E3</i> _E4	281,362κ	146,17	345,25	0,739	198,152	140,34	297,74	0,632	247,27κ	4,50	376,04	0,083	
	279,58	168,45	324,20		190,79	22,30	258,36		159,72	15,89	345,40		
<i>ABCA4</i> G/G	Mediana 0,27	Mínimo 0,19	Máximo 0,48		Mediana 0,23	Mínimo 0,18	Máximo 0,64		Mediana 0,26	Mínimo 0,19	Máximo 1,17		<0,05 £Ω∞∞®
A/G	0,32£Ω	0,20	2,01	0,608	0,23£	0,17	1,58	0,208	0,25Ω	0,16	1,70	0,076	
A/A	0,30∞	0,23	1,35		0,28®	0,21	0,65		0,22∞®	0,17	1,30		
<i>CFH</i> C/C	Mediana 1.292,1¥*	Mínimo 199,81	Máximo 2.810,3		Mediana 810,70¥	Mínimo 88,29	Máximo 1.793,9		Mediana 475,63*	Mínimo 219,51	Máximo 2.353,2		<0,05* ¥β§
C/T	1.480,6	178,89	295,62	0,958	658,07	324,79	2.475,2	0,424	701,40	97,21	1.666,8	0,5311	
T/T	1.131,2§β	295,62	2.924,5		918,08§	181,94	2.586,9		620,17β	60,21	1.684,5		
<i>VEGF</i> [®] T/T	Mediana -	Mínimo -	Máximo -		Mediana -	Mínimo -	Máximo -		Mediana -	Mínimo -	Máximo -		
T/C	296,19	43,88	1.284,1	0,407	1.381,4	130,4	2.632,4	0,571	282,07	3,24	501,82	0,858	>0,05
C/C	233,43	33,60	5.183,6		332,39	9,03	813,60		210,56	3,26	754,83		
<i>VEGF</i> ^ε A/A	Mediana 157,62	Mínimo 139,97	Máximo 291,74		Mediana 508,0	Mínimo 92,19	Máximo 2.632,4		Mediana 210,83	Mínimo 55,45	Máximo 754,83		
A/G	335,5	33,60	1.284,1	0,376	293,66	9,03	497,78	0,466	177,06	3,24	501,82	0,366	>0,05
G/G	233,43	42,36	5.183,6		332,39	18,98	813,6		225,69	25,39	734,72		

Test T; One-Way ANOVA test; Kruskal-Wallis test; Mann-Whitney test; P=nível de significância P<0,05; *APOE*: _/E2: G1xG3: P=007; *E3/E3*:G1xG2:P=0,0005/G1xG3:P<0,0001κ; *ABCA4*=G/G:G1xG2:P<0,0001£; G1xG3:P=0,0004Ω; A/A: G1xG3=P=0,002∞; G2xG3=P=0,015®; *CFH*= C/C: G1xG2=P0,034¥; G1xG3: 0,011*; T/T: G1xG2:=P<0,0001§; G1xG3= P<0,0001β; N= número de indivíduos; *APOE*= apolipoproteína E; *ABCA4*= ATP-triphosphate binding cassette transporte sub-family A -member 4; *CFH*= complemento do fator h; *VEGF*= fator de crescimento endotelial vascular; *VEGF*[®] = rs3025039; *VEGF*^ε=rs1570360.

3.8 Perfil Lipídico

A Tabela 13 mostra valores de mediana para níveis séricos de CT semelhantes entre os grupos de pacientes e controle (G1=193mg/dL; G2=191mg/dL; G3=213,0 mg/dL, respectivamente; P=0,068), assim como LDLc (109mg/dL;104,3mg/dL;125,6 mg/dL, respectivamente; P=0,072), e TG (137mg/dL;130mg/dL;118,5mg/dL, respectivamente; P=0,855). Por outro lado, controles mostraram valores mais elevados de HDLc (mediana=71mg/dL), comparado ao grupo com a forma seca (60mg/dL) e exsudativa (45mg/dL) (P=0,003; P=0,029, respectivamente).

Tabela 13. Valores de mediana, mínimo e máximo para perfil lipídico em pacientes com degeneração macular relacionada à idade nas formas exsudativa (G1) e seca (G2), e indivíduos sem a doença (G3).

Perfil Lipídico (mg/dL)	G1 (N = 47)	G2 (N = 16)	G3 (N = 54)	*P
CT				
Mediana	193,0	191,0	213,0	
Mínimo	122,0	144,0	107,0	0,068
Máximo	327,0	236,0	280,0	
HDLc				
Mediana	45,0[§]	60,0[‡]	71,0[‡]	
Mínimo	24,0	33,0	22,0	<0,05
Máximo	80,0	84,0	160,0	
LDLc				
Mediana	109,0	104,3	125,6	
Mínimo	43,0	36,0	35,0	0,072
Máximo	255,0	175,0	206,0	
TG				
Mediana	137,0	130,0	118,5	
Mínimo	43,0	54,0	54,0	0,855
Máximo	561,0	338,0	338,0	

P=nível de significância P<0,05; *Teste t; Teste de Mann-Whitney; CT= colesterol total, HDLc= fração de colesterol de lipoproteína de alta densidade; LDLc=fração de colesterol de lipoproteína de baixa densidade; TG=triglicérides; N=número de indivíduos; G1xG2: P=0,003§; G2xG3: P=0,029‡.

A Tabela 14 apresenta a distribuição de perfil lipídico alterado nos grupos de pacientes e controles. Notou-se semelhança entre os grupos para todas as variáveis, exceto CT com maior frequência de valores elevados nos controles (63%), comparado a pacientes com DMRI exsudativa (40%; P=0,039). A frequência de níveis reduzidos de HDLc destacou-se entre as mulheres do grupo com DMRI exsudativa (30%) e controles (24%), com diferença significativa entre ambos (P=0,0006), e a forma seca da doença (P=0,013; P=0,030, respectivamente).

Tabela 14. Frequência de perfil lipídico alterado em pacientes com degeneração macular relacionada à idade nas formas exsudativa (G1) e seca (G2), e indivíduos sem a doença (G3).

Perfil Lipídico (mg/dL)	G1 N= 47		G2 N= 16		G3 N= 54		*P		
	N	%	N	%	N	%	G1xG2	G2xG3	G1xG3
CT>200	19	40	6	37	34	63	0,836	0,128	0,039
LDLc ≥130	14	30	4	25	26	48	0,963	0,175	0,093
HDLc									
Feminino (<50)	14	30	0	0	13	24	0,013	0,030	0,0006
Masculino (<40)	11	23	2	12	4	7	0,486	0,614	0,268
TG ≥150	18	38	6	37	20	37	0,954	0,973	0,896

P=Nível de significância <0,05; *Teste Qui-quadrado ou Fisher; CT=colesterol total, HDLc= fração de colesterol de lipoproteína de alta densidade; LDLc=fração de colesterol de lipoproteína de baixa densidade; TG=triglicérides; N=número de indivíduos.

3.9 Relação de *APOE*-rs429358/rs7412 e *ABCA4*-rs472908 com Perfil Lipídico

As Tabelas 15 e 16 apresentam valores de mediana para CT, HDLc, LDLc e TG, considerando os polimorfismos de *APOE* (genótipos *APOE**/₂ e *APOE**3/3) e *ABCA4* (_{/G} e *A/A*), respectivamente. A análise intra grupo mostrou semelhança nos valores de perfil lipídico entre os genótipos de *APOE* em todos os grupos (Tabela 15; $P > 0,05$). Para *ABCA4*, em G3 houve aumento nos níveis de LDLc em portadores de genótipos _{/G} (mediana=152mg/dL), comparado a *A/A* (53mg/dL; $P=0,0006$; Tabela 16). Na análise comparativa entre os grupos notou-se prevalência de níveis aumentados de HDLc na presença de *APOE**3/3 em G3 (73mg/dL), comparado a G1 (46mg/dL; $P < 0,0001$) e G2 (60mg/dL; $P=0,020$), como também de LDLc em G3 (130mg/dL) versus G2 (105,2mg/dL; $P=0,033$). Para *ABCA4* houve semelhança na distribuição do perfil lipídico entre os grupos para ambos os genótipos (_{/G} e *A/A*) ($P > 0,05$).

Tabela 15. Valores de mediana, mínimo e máximo para perfil lipídico distribuídos de acordo com os genótipos para o polimorfismo *APOE*-rs429358/ rs7412 em pacientes com degeneração macular relacionada à idade nas formas exsudativa (G1) e seca (G2), e indivíduos sem a doença (G3).

Perfil Lipídico (mg/dL)	G1 (N = 45)			G2 (N = 15)			G3 (N =39)			P total
	E-/2(a) N=6	E3/E3(b) N=32	P	E -/2(c) N=0	E3/E3 (d) N=13	P	E-/2 (e) N=6	E3/E3 (f) N=37	P	
CT										
Mediana	200,5	192,0		-	193,0		223,5	219,0		
Mínimo	134,0	122,0	0,836	-	144,0	-	131,0	123,0	0,648	0,824
Máximo	210,0	327,0		-	236,0		278,0	280,0		
HDLc										
Mediana	46,0	46,0≠§		-	60,0§		48,0	73,0≠		
Mínimo	30,0	24,0	0,492	-	33,0	-	38,0	22,0	0,604	0,027≠§
Máximo	68,0	80,0		-	83,0		55,0	160,0		
LDLc										
Mediana	111,5	111,5		-	105,2¥		143,5	130,0¥		
Mínimo	73,0	43,0	0,593	-	60,0	-	71,0	35,0	0,186	0,034¥
Máximo	138,0	255,0		-	143,0		206,0	206,0		
TG										
Mediana	157,5	103,5		-	121,0		138,0	127,0		
Mínimo	95,0	46,0	0,242	-	54,0	-	72,0	55,0	0,899	0,416
Máximo	295,0	561,0		-	243,0		227,0	338,0		

Test T; One-Way ANOVA test; Kruskal-Wallis test; Mann-Whitney test; P= nível de significância $P < 0,05$; HDLc: bXf- $P = 0,020 \pm$; bXd- $P < 0,0001 \text{ §}$; LDLc: dXf- $P = 0,033 \text{ ¥}$; CT=colesterol total, HDLc= fração de colesterol de lipoproteína de alta densidade; LDLc=fração de colesterol de lipoproteína de baixa densidade; TG=triglicérides; N= número de indivíduos; *APOE*= apolipoproteína E.

Tabela 16. Valores de mediana, mínimo e máximo para perfil lipídico distribuídos de acordo com os genótipos para o polimorfismo *ABCA4*-rs472908 em pacientes com degeneração macular relacionada à idade nas formas exsudativa (G1) e seca (G2), e indivíduos sem a doença (G3).

Perfil Lipídico (mg/dL)	G1 (N = 45)			G2 (N = 15)			G3 (N =39)			P total
	-/G (a) N= 37	A/A (b) N= 8	P	-/G (c) N= 11	A/A (d) N= 4	P	-/G (e) N= 37	A/A (f) N= 2	P	
CT										
Mediana	191,0	204,5		200,5	164,5		212,0	209,0		
Mínimo	122,0	135,0	0,154	144,0	150,0	0,281	107,0	155,0	0,874	0,360
Máximo	327,0	270,0		236,0	190,2		279,0	263,0		
HDLc										
Mediana	50,0	40,0		61,0	59,0		22,0	102,5		
Mínimo	29,0	24,0	0,162	34,0	33,0	0,949	51,0	45,0	0,339	0,153
Máximo	80,0	49,0		83,0	84,0		80,0	160,0		
LDLc										
Mediana	107,0	112,0		108,7	86,5		125,2	53,0		
Mínimo	43,0	86,0	0,237	60,0	36,0	0,255	51,0	35,0	0,006	0,233
Máximo	255,0	161,0		175,0	114,0		206,0	71,0		
TG										
Mediana	112,0	180,0		119,0	155,6		116,8	180,0		
Mínimo	46,0	43,0	0,331	54,0	111,0	0,411	54,0	165,0	0,242	0,516
Máximo	255,0	561,0		338,0	161,0		333,0	195,0		

Test T; One-Way ANOVA test; Kruskal-Wallis test; Mann-Whitney test; P=nível de significância $P < 0,05$; CT=colesterol total, HDLc= fração de colesterol de lipoproteína de alta densidade; LDLc=fração de colesterol de lipoproteína de baixa densidade; TG= triglicérides; N= número de indivíduos; *ABCA4*= *ATP-triphosphate binding cassette transporte sub-family A -member 4*.

4. DISCUSSÃO

A DMRI, nas formas exsudativa e seca, foi avaliada no presente estudo considerando genes relacionados com metabolismo lipídico, angiogênese e inflamação, além de fatores associados à doença como idade, sexo, tabagismo, consumo de bebidas alcoólicas, dislipidemia, HAS e IMC.

Perfil Genético

Neste estudo, assim como em outras casuísticas,⁽¹⁴²⁻¹⁴⁵⁾ não se confirma a associação do polimorfismo *APOE*-rs429358/rs7412 com DMRI, discordando de outros autores.⁽¹⁴⁶⁻¹⁴⁷⁾ O genótipo *APOE**3/3, assim como o alelo *APOE**3 destacou-se em pacientes e controles, corroborando outros estudos.^(81,95,98) Há referência, ainda, de frequência mais elevada do alelo *APOE**3, particularmente nos indivíduos sem a doença.^(98, 148-149) Ressalta-se, em relação à divergência entre os estudos, além do tamanho amostral, também a etnia das diferentes populações. Nesse contexto, destaca-se o caráter miscigenado da casuística ora estudada, tendo em vista que a população brasileira é constituída, principalmente, por indivíduos de origem ameríndia, africana e europeia.⁽¹⁵⁰⁾

Em estudo de meta-análise o alelo *APOE**4, mesmo em heterozigose, mostrou efeito protetor,⁽¹⁵¹⁾ o que não foi observado no presente estudo. Já *APOE**2, é considerado alelo de risco para DMRI,^(81,146-147,152) no entanto, isso não foi evidenciado entre os grupos de pacientes com DMRI nas formas exsudativa e seca, corroborando outros estudos.^(144-145,153-155)

O caráter protetor de *APOE**4 pode ser explicado considerando que, diferentemente de *APOE**2 e *APOE**3, essa proteína não tem resíduos de cisteína na posição 112 e 158, o que impede a formação de pontes dissulfeto com outras proteínas,

como ocorre na ligação entre apo E3 e apo A-II na HDL.⁽¹⁵⁶⁾ Nesse caso, a incapacidade de apo E4 para formar dímeros com outras proteínas presentes na HDL, facilita o transporte dessa lipoproteína na MB, dado seu tamanho pequeno, permitindo, assim, a prevenção de drusas,⁽¹⁵⁶⁻¹⁵⁷⁾ o que poderia ser otimizado, portanto, na presença de apo E4.

Este estudo mostrou associação do polimorfismo *ABCA4*-rs472908 e DMRI. O genótipo de risco (*G/G*) prevaleceu na combinação dos grupos de pacientes com DMRI exsudativa e seca em relação ao grupo controle. Por outro lado, o homozigoto selvagem (*A/A*) prevaleceu naqueles com DMRI seca, comparado aos demais grupos, enquanto o genótipo heterozigoto *A/G* destacou-se no grupo controle, sugerindo proteção para a doença. Reconhecidamente, mutações em *ABCA4* ocasionam uma variedade de doenças na retina,⁽¹⁵⁸⁻¹⁶⁰⁾ tendo em vista que podem acarretar deposição de compostos tóxicos na retina, acúmulo de drusas e atrofia do EPR.⁽¹⁰⁹⁾ Essas alterações resultam na perda de função de fotorreceptores e comprometimento da visão.^(111,159)

Esses dados corroboram estudo realizado em 15 centros (sete nos Estados Unidos e oito na Europa) (*Allikmets & International ABCR Screening Consortium*, 2000),⁽¹⁶¹⁾ com 1.218 indivíduos portadores de DMRI e 1.258 controles. Nesse caso, houve prevalência do polimorfismo *ABCA4*-rs472908 em pacientes (1,56%), comparado ao grupo controle (0,32%). No entanto, sua influência no desenvolvimento da doença ainda é controversa.⁽¹⁶¹⁻¹⁶³⁾

Notou-se, também associação do polimorfismo *CFH*-rs1061170 (homozigoto mutante *C/C*) com DMRI nas formas seca e exsudativa, assim como em outros estudos.⁽¹⁶⁴⁻¹⁶⁶⁾ Nesse caso, pacientes com DMRI portadores do alelo de risco estão pré-dispostos a um processo "pró-inflamatório".⁽¹⁶⁷⁾ Por outro lado, a prevalência do

genótipo selvagem *T/T* nos controles, corroborando estudo de Sepp et al.(2006),⁽¹⁶⁸⁾ ressalta o caráter protetor do alelo T para a doença.

Reconhecidamente, alterações genéticas na via alternativa do sistema imunológico podem desencadear processo inflamatório.⁽¹⁶⁷⁾ Diversos relatos mostram o polimorfismo *CFH*-Y402H (rs1061170), no qual uma tirosina é substituída por uma histidina, relacionado a risco maior para ambas as formas de DMRI, inicial^(165,169-171) e tardia (exsudativa e seca).^(168,172-174) No entanto, estudo em 158 pacientes com a forma inicial da doença não evidenciou associação com *CFH*,⁽¹⁷⁵⁾ assim como em coortes de japoneses com DMRI neovascular.⁽¹⁷⁶⁻¹⁷⁷⁾ Adicionalmente, há referência de outras variantes de *CFH*, além de Y402H, associadas com ambas as formas inicial e avançada da doença.^(172,178-179)

Ressaltam-se, ainda, dois polimorfismos de *VEGF* (rs1570360 e rs3025039) com resultados divergentes neste estudo, sendo que apenas *VEGF*-rs1570360 mostrou associação com DMRI. Estudo de meta-análise⁽¹⁴⁵⁾ também não observou associação de *VEGF*-rs3025039 com a doença em casuísticas chinesa⁽¹⁸⁰⁾ e caucasiana,⁽¹⁸¹⁾ cujos resultados são discordantes de outro estudo.⁽¹⁸²⁾ Nesse caso, a estreita ligação ($D' = 0,99$) entre o referido polimorfismo e outro SNP presente no gene do fator H do sistema complemento (*CFH*-rs1061170), que tem mostrado associação com DMRI,^(35,183) poderia explicar essas divergências.

As frequências observadas de genótipos e alelos para *VEGF*-rs3025039 não diferiram entre os grupos, corroborando estudos em populações caucasiana (alelo C=0,80)⁽¹⁸¹⁾ e chinesa (alelo C=0,85).⁽¹⁸⁰⁾ Entretanto, observou-se decréscimo na frequência do alelo 936T, comparado a populações grega (0,116),⁽¹⁸⁴⁾ austríaca (0,16)⁽¹⁸⁵⁾ e chinesa (0,19).⁽¹⁸⁶⁾ Reconhecidamente, na população brasileira, resultante

do cruzamento étnico de europeus, ameríndios e africanos e, ainda, entre ancestrais europeus vindos de Portugal, seguidos de italianos, espanhóis e alemães,⁽¹⁵⁰⁾ há ampla diversidade na contribuição genética oriunda de cada grupo. Desse modo, torna-se difícil a interpretação étnica, exigindo estudos com abrangência das diferentes regiões brasileiras.

Em relação a *VEGF*-rs1570360, o genótipo mutante *A/A* prevaleceu nos pacientes com DMRI seca, comparado aos demais grupos. O que pode ser esclarecido, uma vez que *VEGF* participa de mecanismos relacionados à fisiopatologia da doença, envolvidos no crescimento de neovasos. No entanto, há controvérsias, sendo que, diferente deste estudo, o genótipo mutante *A/A* foi associado com DMRI exsudativa,⁽¹⁸⁷⁾ enquanto em outro não houve associação com as formas inicial e tardia da doença.⁽¹⁸⁸⁾

Neste estudo, os grupos apresentaram diferentes distribuições genótípicas para os polimorfismos analisados de acordo com o padrão do equilíbrio de HW. Estudos do tipo caso-controle, em análise de diversos polimorfismos genéticos, também relatam ausência desse padrão.⁽¹⁸⁹⁻¹⁹⁰⁾ A escolha da casuística, não representativa da população geral em relação a diversas variáveis, poderia interferir na distribuição dos genótipos. Na verdade, a ausência do equilíbrio de HW seria esperada para um amplo grupo de doenças genéticas, considerando a contribuição dos genes, apesar de modesta, para doenças complexas, o que provavelmente ocorreu neste estudo para os polimorfismos estudados. No entanto, tendo em vista o grande número de estudos de genes candidatos em diferentes casuísticas, mostra-se escasso o número de marcadores genéticos sem o padrão de equilíbrio de HW, suspeitando-se que investigadores desconsiderem esses resultados, desprezando informações valiosas para identificar polimorfismos casuais.⁽¹⁸⁹⁾

Perfil Demográfico, Hábitos de Vida e Fatores Genéticos

Houve diferença entre os grupos com relação à idade, sendo que pacientes (forma exsudativa e seca) apresentaram faixa etária mais avançada, o que era esperado. Reconhecidamente, no decorrer da idade há aumento de fatores de risco relacionados à doença como estresse oxidativo,^(3,62,65-66,191-192) além de HAS,⁽¹⁹³⁾ presente neste estudo particularmente no grupo com DMRI exsudativa. Tal resultado corrobora estudo de meta-análise com prevalência (9% a 25%) de DMRI entre 65 e 75 anos, em população europeia.⁽¹⁹⁴⁾ Outra meta-análise, em população caucasiana, mostrou 1,4% dos indivíduos afetados com 71 anos, aumentando para 5,6% aos 80 e 20% aos 90.⁽¹⁹⁵⁻¹⁹⁶⁾

Em relação ao gênero, assim como no estudo de Marano et al. (2014),⁽⁴⁷⁾ não houve diferença em ambos os grupos de pacientes. Porém, outros estudos observaram maior frequência de DMRI no sexo feminino.⁽¹⁹⁶⁻¹⁹⁸⁾ Meta-análise recente mostrou elevada incidência anual de DMRI tardia em mulheres, comparado a homens.⁽¹⁹⁹⁾ Dados estes, particularmente em DMRI exsudativa, são sustentados com base em estudos prospectivos^(15, 200-201) e sugerem efeito protetor do hormônio estrogênio que reduz a degeneração do tecido vascular e da retina.⁽²⁰²⁾ Entretanto, estudos isolados são insuficientes para constatar diferença significativa entre homens e mulheres.

Este estudo encontrou associação entre tabagismo e DMRI exsudativa, comparado aos demais grupos, corroborando diversos estudos.^(54,203) Fato este já esperado, uma vez que o uso do cigarro contribui negativamente com vários processos envolvidos na doença, como desregulação endotelial, angiogênese, além de promover a produção de VEGF e acarretar o desenvolvimento de NVC.^(76-77, 79) Porém, existe controvérsia, como no estudo de Coleman et al. (2010)⁽²⁰⁴⁾ em que não foi constatada associação entre tabagismo e DMRI.

Além disso, no presente estudo, houve menor frequência de tabagistas com genótipos de risco (*APOE**_/2) para *APOE*-rs429358/rs7412 em relação a *APOE**3/3, nos controles contribuindo na proteção contra a doença. Por outro lado, no grupo com DMRI exsudativa e tabagismo prevaleceram os genótipos *APOE**_/2 em relação ao grupo controle.⁽²⁰⁵⁾ O mesmo ocorreu para *VEGF*-rs1570360, com maior frequência de tabagistas com genótipos de risco _/A, em relação à DMRI seca e controles. Nesse caso, o risco conferido a tabagismo pode ser potencializado pelos genótipos de risco, influenciando no desenvolvimento da doença.

Com relação ao polimorfismo *ABCA4*-rs472908, o genótipo de risco prevaleceu nos fumantes com DMRI exsudativa em relação a forma seca, no entanto, isso também ocorreu na presença do alelo selvagem, indicando nesses pacientes o tabagismo como fator de risco, independente dos genótipos de risco. Para o polimorfismo *CFH*-rs1061170, por outro lado, houve maior frequência de tabagistas e genótipo selvagem *T/T* em DMRI exsudativa, comparado a controles e DMRI seca, desse modo, ressaltando também o tabagismo como fator de risco para a doença independente de *CFH*-rs1061170.⁽⁵⁴⁾ O mesmo ocorreu para o polimorfismo *VEGF*-rs3025039, indicando risco para hábito tabagista.

Neste estudo, o consumo de bebidas alcoólicas não se associou com DMRI, assim como na casuística avaliada por Coleman et al. (2010).⁽²⁰⁴⁾ Porém, Klein et al. (2002)⁽⁸²⁾ relataram aumento do risco para a doença, particularmente com consumo excessivo de álcool. Ressalta-se, nesse caso, o fato do álcool ser uma neurotoxina capaz de induzir o aumento do estresse oxidativo, ou até modificar os mecanismos de proteção, além de estimular a angiogênese.^(91,206)

Por outro lado, neste estudo, o grupo com DMRI exsudativa apresentou frequência elevada de etilismo e o alelo de risco para *VEGF*-rs3025039, comparado a não-etilistas sugerindo, nesse caso, a potencialização do risco para a doença.⁽⁸²⁾ Em contrapartida, para *CFH*-rs1061170 observou-se menor frequências de etilistas com genótipos de risco em DMRI exsudativa comparado a controles, assim como o genótipo selvagem (*T/T*) em DMRI exsudativa e seca, sugerindo a influência dos genótipos de risco para a doença.⁽²⁰⁴⁾

Comorbidades, Perfil Lipídico e Fatores Genéticos

Houve associação entre HAS e DMRI exsudativa, mas não com a forma seca da doença. Na literatura há inconsistência,⁽¹⁹³⁾ sendo que alguns estudos mostram fraca associação,⁽²⁰⁷⁾ enquanto em outros isso não ocorre.^(15,54) No estudo *Age-Related Eye Disease Study* (2010), indivíduos com hipertensão apresentaram 1,5 vez mais chance de desenvolver DMRI neovascular, quando comparado com aqueles sem hipertensão. Há hipótese de que o aumento da pressão arterial ocasiona danos na circulação da coróide afetando o EPR, o que poderia explicar essa associação.⁽¹⁵⁾ Porém, não há dados de ensaios clínicos randomizados comprovando a eficácia da redução da pressão arterial em reduzir a progressão da DMRI.

A análise intragrupo dos polimorfismos *ABCA4*-rs472908 e *VEGF*-rs3025039 mostrou para DMRI exsudativa destaque dos genótipos de risco na HAS em relação a não-HAS.⁽²⁰⁸⁾ O mesmo ocorreu para *ABCA4*-rs472908 na análise entre os grupos, prevalecendo em DMRI exsudativa genótipos de risco *_/G* e HAS em relação aos controles, indicando que a presença desses dois fatores pode potencializar o risco para a doença.

Por outro lado, na análise entre os grupos, para *APOE*-rs429358/rs7412 notou-se prevalência de hipertensos e genótipo *APOE**3/3 em DMRI exsudativa, comparado ao grupo controle e seca. O mesmo ocorreu para os polimorfismos *CFH*-rs1061170 e *VEGF*-rs3025039, com prevalência dos respectivos genótipos selvagens e HAS comparado a forma seca e controles, conferindo maior risco à hipertensão no desenvolvimento da doença.⁽⁵⁴⁾

Em relação à dislipidemia, também avaliada neste estudo, postula-se que o colesterol pode ser obtido de fontes sistêmicas e reciclado no interior da retina, cujo processo é completado por meio da circulação de lipídios no sangue. Assim, os bastonetes da retina são capazes de utilizar ambos os lipídios provenientes do fígado e lipídios reciclados a partir do EPR,^(67,209) o que justificaria a relação entre níveis séricos elevados de colesterol e DMRI, o que não foi observado neste estudo, corroborando alguns autores,^(24,54,174) e discordando de outros.^(207,210-211)

No entanto, este estudo mostrou valores elevados de HDLc particularmente no grupo controle, corroborando outro estudo,^(104,174) sugerindo acréscimo de HDLc como fator protetor para DMRI. No entanto, alguns autores não confirmam essa associação,^(54,68,213) enquanto outros conferem maior risco para a doença relacionado a níveis séricos elevados de HDLc.^(55,214-215)

Partículas de LDL (55%), seguido de HDL (33%) e VLDL (10%) são responsáveis pelo transporte dos carotenóides luteína e zeaxantina, presentes em vegetais folhosos verdes, milho, abóbora, brócolis, ervilha e gema de ovo.⁽²¹⁶⁻²¹⁷⁾ Além de função antioxidante, esses carotenóides apresentam potencial para aumentar a densidade de pigmento macular⁽²¹⁸⁾ contribuindo, portanto, para filtragem e absorção da

luz azul. Desse modo, a HDL é alvo de investigação pelo possível papel-chave na proteção contra a DMRI.⁽²¹⁹⁾

Nesse contexto, é possível que alterações no metabolismo do colesterol, em particular na HDL, influenciem no acúmulo de drusas e, conseqüentemente, no desenvolvimento de DMRI. Isso sugere que o aumento de níveis de HDLc associado a uma dieta rica em carotenóides poderia interferir na progressão da doença particularmente nos pacientes em tratamento contribuindo, portanto, para seu prognóstico. Desse modo, níveis reduzidos de HDLc poderiam conferir risco para a doença, constatado neste estudo.

Postula-se que o colesterol pode ser obtido a partir de fontes sistêmicas e reciclado no interior da retina, cujo processo é completado por meio da circulação de lipídios no sangue. Assim, os bastonetes da retina são capazes de utilizar ambos os lipídios provenientes do fígado e lipídios reciclados a partir do EPR.^(67,205,209,220) Em nosso estudo observamos níveis aumentados de colesterol nos controles em relação à DMRI seca e exsudativa, corroborando alguns autores,^(24,54,174) e discordando de outros.^(207,210-211) Níveis reduzidos de HDLc foram observados no sexo feminino, corroborando estudo de Stefanick (1998)⁽²²¹⁾ fato este que pode ser explicado pela faixa etária das mulheres e sua relação com a menopausa.

Neste estudo avaliou-se a associação do perfil lipídico com o polimorfismo *APOE*-rs429358/rs7412, tendo em vista que a apo E tem função no metabolismo de lipoproteínas séricas ricas em TG (quilomícrons e LDL), além de sua relação com HDL.^(24,97,222) Em nosso estudo notou-se menor frequência do genótipo *APOE**3/3 e dislipidemia no grupo com DMRI exsudativa em relação à forma seca e controles, sugerindo a presença de outros fatores envolvidos na doença. Por outro lado, prevaleceram

níveis elevados de HDLc na presença de *APOE**3/3 nos controles em relação aos demais grupos, assim como também para LDLc nos controles em relação a DMRI seca. Ressalta-se que *APOE**3 e, principalmente, *APOE**4 apresentam afinidade com o receptor de membrana apoB/E, enquanto *APOE**2 é resistente à ligação, o que influencia níveis séricos de CT, LDLc e TG.^(151,223) Desse modo, os genótipos de *APOE*- rs429358/rs7412 poderiam contribuir para variações nos níveis de lipídios séricos e, conseqüentemente, sua maior deposição no EPR, formando drusas.⁽⁶⁷⁾

Para *ABCA4* notou-se semelhança na distribuição do perfil lipídico em todos os grupos estudados, o que deve ser esclarecido, pois estudos com este gene são escassos, particularmente para o polimorfismo *ABCA4*-rs472908, e perfil lipídico é inexistente, tornando este estudo inédito.

Não houve associação entre IMC e DMRI, assim como no estudo de Klein et al. (2003)⁽²¹⁴⁾ em que avaliaram obesidade e incidência de DMRI nas formas inicial e tardia da doença. Já Klein et al. (2010)⁽¹⁷⁴⁾ encontraram associação na forma seca da doença, mas não com DMRI exsudativa ou inicial. Ainda, há referência de maior risco de DMRI tardia (OR 2,35 - IC 95%; 1,27 - 4,34) em indivíduos com obesidade (IMC de pelo menos 30 kg/m²), em comparação àqueles com IMC <25kg/m².⁽²²⁴⁻²²⁵⁾ Postula-se que a ingestão calórica excessiva induz a danos oxidativos e, ainda, o aumento da circunferência da cintura também está relacionado com processo inflamatório, mecanismos envolvidos no desenvolvimento da DMRI.⁽²²⁶⁾

Expressão Gênica

Ao comparar a expressão gênica nos pacientes com DMRI seca e exsudativa, não foi observada diferença nos genes *APOE*, *ABCA4*, *CFH* e *VEGF*, destacando-se entre eles o envolvimento no metabolismo de lipídios, angiogênese e processo inflamatório. Porém, notou-se acréscimo na expressão de todos, particularmente, na DMRI exsudativa, a forma mais grave da doença. Ressalta-se a ausência de estudos semelhantes na literatura especializada avaliando a expressão dos referidos genes em sangue periférico, como realizado neste estudo, e possível contribuição e associação com a doença.

Estudos de associação de genoma identificaram vários genes relacionados com DMRI e examinaram seus níveis de expressão. Dos genes previamente associados com DMRI, *APOE* mostrou medianas semelhantes entre caso e controles, mas *VEGF* e *CFH* mostraram associação com a doença.⁽²²⁷⁾ Em nosso estudo, para *ABCA4*, notou-se semelhança entre os grupos para expressão de RNA em sangue periférico. Estudo com ratos albinos analisou a expressão do gene *ABCA4*, sugerindo que o acúmulo de A2E ocasionaria o estresse oxidativo e ativação do complemento.⁽²²⁸⁾ Assim, doença de Stargardt e DMRI podem apresentar componente inflamatório em sua fisiopatogenia.⁽²²⁹⁾

Uma das limitações deste estudo foi a inacessibilidade ao tecido ocular para a realização das análises de expressão gênica, tratando-se de uma via invasiva para pacientes com DMRI exsudativa e seca. Desse modo, realizamos análise do sangue periférico com resultados ainda inexistentes na literatura consultada, tornando inédito. Nesse contexto, o estudo de subgrupos de pacientes, com delineamento prospectivo,

considerando tipo e tempo de tratamento poderia esclarecer mecanismos moleculares relacionados a ambas as formas da doença.

Dosagens Séricas

Este estudo mostrou níveis séricos de apo E reduzidos na forma seca em relação aos demais grupos, discordante de Abalain et al. (2002)⁽²³⁰⁾ que encontraram concentração aumentada de apoE em DMRI, comparado ao controle. Nosso estudo incluiu todos os tipos de DMRI, enquanto Klaver et al. (1998)⁽⁹²⁾ consideraram apenas pacientes com a forma exsudativa da doença. De acordo com Utermann et al. (1980),⁽²³¹⁾ o alelo APOE*4 de *APOE* está relacionado com redução da concentração sérica de apo E, enquanto o alelo APOE*2 com níveis séricos elevados de apo E em comparação com o alelo APOE*3. Tal relação não foi demonstrada em nesta casuística, indicando que os alelos de *APOE* não influenciaram nos níveis séricos.

Em relação aos níveis séricos de ABCR valores mais elevados foram observados no grupo com DMRI exsudativa, comparado aos demais grupos. Ainda, na sua relação com genótipos notou-se aumento de níveis séricos e genótipo heterozito A/G em DMRI exsudativa, comparado aos demais grupos. O mesmo ocorreu para genótipo selvagem A/A, sugerindo o envolvimento de outros fatores nos níveis séricos de ABCR.

Este estudo encontrou níveis séricos aumentados de CFH em DMRI exsudativa e seca em relação aos controles, o que era esperado, uma vez que existe a possibilidade de um componente inflamatório na DMRI.⁽³⁵⁾ Esses resultados corroboram o estudo de Scholl et al. (2008).⁽²³²⁾ Outro estudo na população Norte da Índia mostrou níveis séricos de CFH semelhantes entre DMRI seca e exsudativa e, ainda, ambos tinham níveis reduzidos comparado aos controles,⁽²³³⁾ o que foi observado também por Dhillon

et al. (2010).⁽²³⁴⁾ A relação entre níveis séricos de CFH e genótipos, mostrou acréscimo em pacientes com DMRI exsudativa e genótipo de risco (*C/C*), em relação à DMRI seca, o mesmo ocorreu na presença do genótipo selvagem (*T/T*), sugerindo a contribuição de outros fatores para níveis séricos de CFH.

Níveis séricos de VEGF mostraram-se semelhantes entre os grupos, de acordo com estudo da população europeia,⁽²³⁵⁾ e em contraste com os resultados apresentados para a população asiática.⁽²³⁶⁾ No estudo de Haas et al. (2011)⁽²³⁷⁾ níveis séricos de VEGF165 não mostraram diferenças significantes entre DMRI exsudativa e controles. Enquanto outro estudo demonstrou níveis plasmáticos mais elevados de VEGF165 em pacientes com DMRI neovascular em relação a controles,⁽²³⁸⁾ enquanto Tsai et al. (2006)⁽²³⁶⁾ mostraram-fracas associação.

Nesse contexto, torna-se necessário enfatizar os procedimentos terapêuticos utilizados na tentativa de retardar a progressão da deficiência visual por DMRI, embora com sucesso comprovado. Destacam-se os medicamentos com efeito inibidor sobre VEGF, incluindo o bevacizumab, um anticorpo monoclonal da classe IgG1 contra VEGF humano, um intra-vitreo aplicado para o tratamento de DMRI, que pode penetrar na circulação sanguínea, com consequente redução dos níveis séricos de VEGF.⁽²³⁹⁾ No presente estudo, todos os pacientes com DMRI já estavam em tratamento para a doença, recebendo injeções intravítreas de bevacizumab ou ranibizumab, que se destacam como tratamento farmacológico de sucesso, mantendo os níveis de VEGF nos limites de referência.

Em nosso estudo no cálculo de sensibilidade e especificidade, notou-se diferença entre DMRI seca e o grupo controle. Nesse caso, nível sérico de apo E destacou-se com sensibilidade de 67% e especificidade de 71%, com valor de corte 208,8 pg/mL. Assim,

como para nível sérico de CFH, com diferenças entre os grupos com DMRI exsudativa e seca, apresentando sensibilidade de 59% e especificidade de 82%, com valor de corte de 1.014,19 pg/mL. O estudo de Martínez-Barricarte et al. (2012)⁽²⁴⁰⁾ mostrou valores de sensibilidade e especificidade de CFH aproximadamente 70%, assim como o estudo de Seddon et al., 2009⁽⁸⁹⁾ com sensibilidade de 83% e especificidade de 68%. Esses resultados indicam que o desenvolvimento da DMRI pode ser detectado a partir do aumento dos níveis séricos de apo E e CFH. Essa análise estatística resume a validade clínica de um teste diagnóstico ou prognóstico.⁽²⁴¹⁾

5. CONCLUSÕES

Este estudo permite concluir que:

1. DMRI associa-se com perfil genético relacionado com metabolismo de lipídios, inflamação e angiogênese representado por genótipos de risco para *ABCA4*(rs472908), *CFH* (rs1061170) e *VEGF* (rs1570360), mais evidente na DMRI na forma seca, enquanto *CFH* (homozigoto selvagem) parece ser fator de proteção contra DMRI.
2. Tabagismo e HAS associam-se particularmente com DMRI exsudativa e este risco pode ser potencializado quando estes fatores estão relacionados com alelo mutante de *APOE* (rs429358/rs7412), *ABCA4* (rs472908) ou *VEGF* (rs3025039/rs570360).
3. Expressão gênica de *APOE*, *ABCA4*, *CFH* e *VEGF* no sangue periférico não diferencia as formas seca e exsudativa da DMRI.
4. Nível sérico elevado de apo E, ABCR e CFH, particularmente na presença do alelo mutante, associa-se com DMRI, destacando-se apoE e CFH, cujos valores de especificidade e sensibilidade parecem conferir relevância clínica.
5. Perfil lipídico não se relaciona com genótipos de risco para as variantes analisadas (*APOE* e *ABCA4*), entretanto níveis reduzidos de HDLc parecem conferir maior risco para DMRI exsudativa, particularmente em mulheres, enquanto níveis elevados de HDLc podem representar proteção para a doença.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kadosono K, Yazama F, Itoh N, Uchio E, Nakamura S, Akura J, et al. Treatment of retinal detachment resulting from myopic macular hole with internal limiting membrane removal. *Am J Ophthalmol* 2001 131:203-7.
2. Tang PH, Kono M, Koutalos Y, Ablonczy Z, Crouch RK. New insights into retinoid metabolism and cycling within the retina. *Prog Retin Eye Res* 2013;32:48-63.
3. Fritsche LG, Fariss RN, Stambolian D, Abecasis GR, Curcio CA, Swaroop A. Age-related macular degeneration: genetics and biology coming together. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2014;15:151-71.
4. Mochizuki M, Sugita S, Kamoi K. Immunological homeostasis of the eye. *Prog Retin Eye Res* 2013; 33:10-27.
5. Dwyer MA, Kazmin D, Hu P, McDonnell DP, Malek G. Research resource: nuclear receptor atlas of human retinal pigment epithelial cells: potential relevance to age-related macular degeneration. *Mol Endocrinol* 2011; 25:360-72.
6. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE– 2010.
7. Hayflick L. Biological aging is no longer an unsolved problem. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1100:1-13.
8. Cascella R, Ragazzo M, Straffella C, Missiroli F, Borgiani P, Angelucci F, et al. Age-related macular degeneration: insights into inflammatory genes. *J Ophthalmol* 2014;2014:582842.

-
9. Veleri S, Lazar CH, Chang B, Sieving PA, Banin E, Swaroop A. Biology and therapy of inherited retinal degenerative disease: insights from mouse models. *Dis Model Mech* 2015;8:109-29.
 10. Akuffo KO, Nolan J, Stack J, Moran R, Feeney J, Kenny RA, et al. Prevalence of age-related macular degeneration in the Republic of Ireland. *Br J Ophthalmol* 2015 Feb 23. pii: bjophthalmol-2014-305768. doi: 10.1136/bjophthalmol
 11. Khan M, Agarwal K, Loutfi M, Kamal A. Present and possible therapies for age-related macular degeneration. *ISRN Ophthalmol* 2014 Apr 16;2014:608390. doi: 10.1155/2014/608390. eCollection 2014.
 12. Mavija M, Alimanovic E, Jaksic V, Kasumovic SS, Cekic S, Stamenkovic M. Therapeutic Modalities of Exudative Age-related Macular Degeneration. *Med Arch* 2014;68:204-208.
 13. Wong WL, Su X, Li X, Cheung CM, Klein R, Cheng CY, et al. Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health* 2014;2(2):e106-16.
 14. Medina NH. *Epidemiologia do envelhecimento: estudo oftalmológico populacional de idosos [tese]*. São Paulo (SP): Universidade Federal de São Paulo; 1997.
 15. Klein R, Klein BE, Knudtson MD, Meuer SM, Swift M, Gangnon RE. Fifteen-year cumulative incidence of age-related macular degeneration: the Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology* 2007;114:253-62.

16. Resnikoff S, Pascolini D, Etya'ale D, Kocur I, Pararajasegaram R, Pokharel GP, et al. Global Data On Visual Impairment In The Year. *Bulletin Of The World Health Organization* 2002;82:844–851.
17. Almeida LNF, Carolino RM, Sperandio DC, Nehemy MB, de Marco LA. The role of molecular genetic factors in age-related macular degeneration. *Arq Bras Oftalmol* 2006;69:665-9.
18. Colak E, Majkic-Singh N, Zoric L, Radosavljevic A, Kosanovic-Jakovic N. The role of CRP and inflammation in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Biochem Med (Zagreb)* 2012;22:39-48.
19. Friedman DS, Katz J, Bressler NM, Rahmani B, Tielsch JM. Racial differences in the prevalence of age-related macular degeneration: the Baltimore Eye Survey. *Ophthalmology* 1999;106:1049-55.
20. Furtado JM, Lansingh VC, Carter MJ, Milanese MF, Peña BN, Ghersi HA, et al. Causes of blindness and visual impairment in Latin America. *Surv Ophthalmol* 2012;57:149-77.
21. Bird AC, Bressler NM., Bressler SB, Chisholm IH, Coscas G, Davis MD et al. An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. The International ARM epidemiological study group. *Surv. Ophthalmol* 1995;39:367–374.
22. Age-Related Eye Disease Study Research Group. Risk factors associated with age-related macular degeneration. A case-control study in the age-related eye disease study: Age-Related Eye Disease Study Report Number 3. *Ophthalmology* 2000;107:2224-32.

-
23. Queiroz JM; Queiroz JM; Queiroz FJC. Age-related macular degeneration: histopathological considerations. *Rev. bras.oftalmol* 2010;69 doi.org/10.1590/S0034-72802010000600010.
 24. Cougnard-Grégoire A, Delyfer MN, Korobelnik JF, Rougier MB, Le Goff M, Dartigues JF, et al. Elevated high-density lipoprotein cholesterol and age-related macular degeneration: the Alienor study. *PLoS One* 2014 7;9(3):e90973. doi: 10.1371/journal.pone.0090973.
 25. Saksens NT, Fleckenstein M, Schmitz-Valckenberg S, Holz FG, den Hollander AI, Keunen JE, et al. Macular dystrophies mimicking age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res* 2014;39:23-57.
 26. van Lookeren Campagne M, LeCouter J, Yaspan BL, Ye W. Mechanisms of age-related macular degeneration and therapeutic opportunities. *J Pathol* 2014;232:151-64.
 27. Nowak SP, van den Bergh H, Sickenberg M, Koh AH. Photodynamic therapy for polypoidal choroidal vasculopathy. *Prog Retin Eye Res* 2013;37:182-99.
 28. Whitmore SS, Wagner AH, DeLuca AP, Drack AV, Stone EM, Tucker BA, et al. Transcriptomic analysis across nasal, temporal, and macular regions of human neural retina and RPE/choroid by RNA-Seq. *Exp Eye Res* 2014;129:93-106.
 29. Maeda A, Palczewska G, Golczak M, Kohno H, Dong Z, Maeda T, et al. Two-photon microscopy reveals early rod photoreceptor cell damage in light-exposed mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:1428-37.

-
30. Kawa MP, Machalinska A, Roginska D, Machalinski B. Complement system in pathogenesis of AMD: dual player in degeneration and protection of retinal tissue. *J Immunol Res* 2014;483960.
 31. Ferris FL 3rd, Wilkinson CP, Bird A, Chakravarthy U, Chew E, Csaky K, et al. Beckman Initiative for Macular Research Classification Committee. Clinical classification of age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2013; 120:844-51.
 32. Liang XY, Chen LJ, Ng TK, Tuo J, Gao JL, Tam PO, et al. FPR1 interacts with CFH, HTRA1 and smoking in exudative age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy. *Eye (Lond)* 2014; 28:1502-10.
 33. Levy O, Calippe B, Lavalette S, Hu SJ, Raoul W, Dominguez E, et al. Apolipoprotein E promotes subretinal mononuclear phagocyte survival and chronic inflammation in age-related macular degeneration. *EMBO Mol Med* 2015; 20;7:211-26.
 34. Obata R, Yanagi Y. Quantitative analysis of cone photoreceptor distribution and its relationship with axial length, age, and early age-related macular degeneration. *PLoS One* 2014;9(3):e91873. doi: 10.1371/journal.pone.0091873.
 35. Smailhodzic D, van Asten F, Blom AM, Mohlin FC, den Hollander AI, van de Ven JP, et al. Zinc supplementation inhibits complement activation in age-related macular degeneration. *PLoS One* 2014;9(11):e112682. doi: 10.1371/journal.pone.0112682.
 36. Kaneko H, Dridi S, Tarallo V, Gelfand BD, Fowler BJ, Cho WG, et al. DICER1 deficit induces Alu RNA toxicity in age-related macular degeneration. *Nature* 2011;471(7338):325-30.

-
37. Marsiglia M, Boddu S, Bearely S, Xu L, Breaux BE Jr, Freund KB, et al. Association between geographic atrophy progression and reticular pseudodrusen in eyes with dry age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54:7362-9.
 38. Tokarz P, Kaarniranta K, Blasiak J. Role of antioxidant enzymes and small molecular weight antioxidants in the pathogenesis of age-related macular degeneration (AMD). *Biogerontology* 2013;14:461-82.
 39. Gopinath B, Liew G, Burlutsky G, Mitchell P. Age-related macular degeneration and 5-year incidence of impaired activities of daily living. *Maturitas* 2014;77:263-6.
 40. Yaylali SA, Akcakaya AA, Erbil HH, Candemir B, Mesci C, Acar H. The relationship between optical coherence tomography patterns, angiographic parameters and visual acuity in age-related macular degeneration. *Int Ophthalmol* 2012;32:25-30.
 41. Bellini LP, Freitas AM. Highlights on age-related macular degeneration diagnosis and treatment. *Revista da AMRIGS* 2008;52:204-208.
 42. Heier JS, Brown DM, Chong V, Korobelnik JF, Kaiser PK, Nguyen QD, et al. Intravitreal aflibercept (VEGF trap-eye) in wet age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2012;119(12):2537-48.
 43. Chakravarthy U, Harding SP, Rogers CA, Downes SM, Lotery AJ, Culliford LA, et al. Alternative treatments to inhibit VEGF in age-related choroidal neovascularisation: 2-year findings of the IVAN randomised controlled trial. *Lancet* 2013;382:1258-67.

-
44. Ferrone PJ, Anwar F, Naysan J, Chaudhary K, Fastenberg D, Graham K, et al. Early initial clinical experience with intravitreal aflibercept for wet age-related macular degeneration. *Br J Ophthalmol* 2014;1:17-21.
 45. Solomon SD, Lindsley K, Vedula SS, Krzystolik MG, Hawkins BS. Anti-vascular endothelial growth factor for neovascular age-related macular degeneration. *Cochrane Database Syst Rev* 2014; 29;8:CD005139. doi: 10.1002/14651858.CD005139.pub3.
 46. Rosenfeld PJ. New treatments for age-related macular degeneration. *Lancet* 2007;370:1479.
 47. Casaroli-Marano RP, Alforja S, Giralt J, Farah ME. Epimacular brachytherapy for wet AMD: current perspectives. *Clin Ophthalmol* 2014;8:1661-70.
 48. Ferrara N, Damico L, Shams N, Lowman H, Kim R. Development of ranibizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antigen binding fragment, as therapy for neovascular age-related macular degeneration. *Retina* 2006;26:859-70.
 49. Trichonas G, Kaiser PK. Aflibercept for the Treatment of Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmol Ther* 2013;2:89–98.
 50. Mansour AM, Ghadban SA, Yunis MH, Sabban M. Ziv-aflibercept in macular disease. *Br J Ophthalmol* doi:10.1136/bjophthalmol-2014-306319.
 51. Chew EY, Clemons TE, Agrón E, Sperduto RD, Sangiovanni JP, Kurinij N, et al. Age-Related Eye Disease Study Research Group. Long-term effects of vitamins C and E, β -carotene, and zinc on age-related macular degeneration: AREDS report no. 35. *Ophthalmology* 2013;120:1604-11.

-
52. Katta S, Kaur I, Chakrabarti S. The molecular genetic basis of age-related macular degeneration: an overview. *J Genet* 2009;88:425-49.
 53. Pons M, Marin-Castaño ME. Nicotine increases the VEGF/PEDF ratio in retinal pigment epithelium: a possible mechanism for CNV in passive smokers with AMD. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011; 52:3842-53.
 54. Chakravarthy U, Wong TY, Fletcher A, Piau E, Evans C, Zlateva G, et al. Clinical risk factors for age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. *BMC Ophthalmol* 2010;10:31.
 55. Butt AL, Lee ET, Klein R, Russell D, Ogola G, Warn A, et al. Prevalence and risks factors of age-related macular degeneration in Oklahoma Indians: the Vision Keepers Study. *Ophthalmology* 2011;118:1380-5.
 56. Sigler EJ, Randolph JC, Calzada JI, Charles S. Smoking and choroidal thickness in patients over 65 with early-atrophic age-related macular degeneration and normals. *Eye (Lond)* 2014;28:838-46.
 57. Seddon JM, Reynolds R, Yu Y, Rosner B. Three new genetic loci (R1210C in CFH, variants in COL8A1 and RAD51B) are independently related to progression to advanced macular degeneration. *PLoS One* 2014;9:e87047.
 58. Cheung CM, Wong TY. Is age-related macular degeneration a manifestation of systemic disease? New prospects for early intervention and treatment. *J Intern Med* 2014;276:140-53.
 59. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Priority Eye Diseases. 2014; <http://www.who.int/blindness/causes/priority/en/index1.html>.
 60. National Eye Institute. Age-Related Macular Degeneration (AMD) National Eye Institute; 2014.

-
61. Muñoz B, Klein R, Rodriguez J, Snyder R, West SK. Prevalence of age-related macular degeneration in a population-based sample of Hispanic people in Arizona: Proyecto VER. *Arch Ophthalmol* 2005;123:1575-80.
 62. Lesnefsky EJ, Hoppel CL. Oxidative phosphorylation and aging. *Ageing Res Rev* 2006;5:402-33.
 63. Hoeijmakers JH. DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med* 2009;361:1475-85.
 64. Curcio CA, Owsley C, Jackson GR. Spare the rods, save the cones in aging and age-related maculopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:2015-8.
 65. Kishan AU, Modjtahedi BS, Martins EN, Modjtahedi SP, Morse LS: Lipids and age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol* 2011; 56:195–213.
 66. Torres RJ, Noronha Ld, Casella AM, Torres RR, Martins Ide C, Zotz R, et al. Increased VEGFR-1 immunoreactivity in the choroid-scleral complex in hypercholesterolemia experimental model. *Arq Bras Oftalmol* 2013;76:1-5.
 67. Curcio CA, Johnson M, Rudolf M, Huang DJ. The oil spill in ageing Bruch membrane. *Br J Ophthalmol* 2011;95:1638–1645.
 68. Tomany SC, Wang JJ, Van Leeuwen R, Klein R, Mitchell P, Vingerling JR, et al. Risk factors for incident age-related macular degeneration: pooled findings from 3 continents. *Ophthalmology* 2004;111:1280-7.
 69. Esfandiary H, Chakravarthy U, Patterson C, Young I, Hughes AE. Association study of detoxification genes in age related macular degeneration. *Br J Ophthalmol* 2005;89:470-4.
 70. Lechanteur YT, van de Camp PL, Smailhodzic D, van de Ven JP, Buitendijk GH, Klaver CC, et al. Association of Smoking and CFH and ARMS2 Risk

-
- Variants With Younger Age at Onset of Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *JAMA Ophthalmol* 2015 Feb 19. doi: 10.1001/jamaophthalmol.2015.18.
71. Klein R, Knudtson MD, Cruickshanks KJ, Klein BE. Further observations on the association between smoking and the long-term incidence and progression of age-related macular degeneration: the Beaver Dam Eye Study. *Arch Ophthalmol* 2008;126:115-21.
72. Smith W, Assink J, Klein R, Mitchell P, Klaver CC, Klein BE, et al. Risk factors for age-related macular degeneration: Pooled findings from three continents. *Ophthalmology* 2001;108:697-704.
73. Bertram KM, Baglolle CJ, Phipps RP, Libby RT. Molecular regulation of cigarette smoke induced-oxidative stress in human retinal pigment epithelial cells: implications for age-related macular degeneration. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009;297:200-10.
74. Vingerling JR, Hofman A, Grobbee DE, de Jong PT. Age-related macular degeneration and smoking. The Rotterdam Study. *Arch Ophthalmol* 1996;114:1193-6.
75. Yu AL, Birke K, Burger J, Welge-Lussen U. Biological effects of cigarette smoke in cultured human retinal pigment epithelial cells. *PLoS One* 2012;7(11):e48501.
76. Cai J, Nelson KC, Wu M, Sternberg P Jr, Jones DP. Oxidative damage and protection of the RPE. *Prog Retin Eye Res* 2000;19:205-21.
77. Roth F, Bindewald A, Holz FG. Key pathophysiologic pathways in age-related macular disease. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2004;242:710-6.

-
78. Yu M, Liu Q, Sun J, Yi K, Wu L, Tan X. Nicotine improves the functional activity of late endothelial progenitor cells via nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem Cell Biol* 2011;89:405-10.
79. Velilla S, García-Medina JJ, García-Layana A, Dolz-Marco R, Pons-Vázquez S, Pinazo-Durán MD, et al. Smoking and age-related macular degeneration: review and update. *J Ophthalmol* 2013;89:147. doi: 10.1155/2013/895147.
80. Sancho-Tello M, Muriach M, Barcia J, Bosch-Morell F, Genovés JM, Johnsen-Soriano S, et al. Chronic alcohol feeding induces biochemical, histological, and functional alterations in rat retina. *Alcohol Alcohol* 2008;43:254-60.
81. Adams MK, Chong EW, Williamson E, Aung KZ, Makeyeva GA, Giles GG, et al. 20/20--Alcohol and age-related macular degeneration: the Melbourne Collaborative Cohort Study. *Am J Epidemiol* 2012;176:289-98.
82. Klein R, Klein BE, Tomany SC, Moss SE. Ten-year incidence of age-related maculopathy and smoking and drinking: the Beaver Dam Eye Study. *Am J Epidemiol* 2002;156:589-98.
83. Ersoy L, Ristau T, Lechanteur YT, Hahn M, Hoyng CB, Kirchhof B, et al. Nutritional risk factors for age-related macular degeneration. *Biomed Res Int* 2014;2014:413150.
84. Obisesan TO, Hirsch R, Kosoko O, Carlson L, Parrott M. Moderate wine consumption is associated with decreased odds of developing age-related macular degeneration in NHANES-1. *J Am Geriatr Soc* 1998;46:1-7.
85. Keenan TD, Goldacre R, Goldacre MJ. Associations between age-related macular degeneration, Alzheimer disease, and dementia: record linkage study of hospital admissions. *JAMA Ophthalmol* 2014;132:63-8.

-
86. Torres RJ, Luchini A, Torres Rdo R, Oliveira LR, Torres CL, Torres RA, et al. Effect of candesartan on the expression of sclera-choroidal intercellular adhesion molecule-1 in hypercholesterolemic models. *Clinics (Sao Paulo)* 2014;69:145-9.
 87. Torres RJ, Maia M, Noronha L, Farah ME, Luchini A, Brik D, et al. Evaluation of choroid and sclera early alterations in hypercholesterolemic rabbits: histologic and histomorphometric study. *Arq Bras Oftalmol* 2009;72:68-74.
 88. Schmidt-Erfurth U, Rudolf M, Funk M, Hofmann-Rummelt C, Franz-Haas NS, Aherrahrou Z, et al. Ultrastructural changes in a murine model of graded Bruch membrane lipoidal degeneration and corresponding VEGF164 detection. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:390-8.
 89. 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* 2009a;50:2044–2053.
 90. Spencer KL, Olson LM, Schnetz-Boutaud N, Gallins P, Agarwal A, Iannaccone A, et al. Using genetic variation and environmental risk factor data to identify individuals at high risk for age-related macular degeneration. *PLoS ONE* 2011;6(3):e17784.
 91. Gorin MB. Genetic insights into age-related macular degeneration: controversies addressing risk, causality, and therapeutics. *Mol Aspects Med* 2012;33:467-86.
 92. Klaver CC, Wolfs RC, Assink JJ, van Duijn CM, Hofman A, de Jong PT. Genetic risk of age-related maculopathy. Population-based familial aggregation study. *Archives of Ophthalmology* 1998;116:1646–1651.

-
93. Omarova S, Charvet CD, Reem RE, Mast N, Zheng W, Huang S, et al. Abnormal vascularization in mouse retina with dysregulated retinal cholesterol homeostasis. *J Clin Invest* 2012;122:3012-23.
94. Horie-Inoue K, Inoue S. Genomic aspects of age-related macular degeneration. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Aug 8. pii: S0006-291X(14)01419-3. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.08.013.
95. Sun E, Lim A, Liu X, Snelling T, Wang N, Liu N. Apolipoprotein E gene and age-related macular degeneration in a Chinese population. *Mol Vis* 2011;17:997-1002.
96. Siest G, Pillot T, Regis-Bailly A, Leininger-Muller B, Steinmetz J, Galteau MM, et al. Apolipoprotein E: an important gene and protein to follow in laboratory medicine. *Clin Chem* 1995; 41:1068–1086.
97. Rohn TT, Day RJ, Catlin LW, Brown RJ, Rajic AJ, Poon WW. Immunolocalization of an amino-terminal fragment of apolipoprotein E in the Pick's disease brain. *PLoS One* 2013 Dec 2;8(12):e80180. doi: 10.1371/journal.pone.0080180.
98. McKay GJ, Patterson CC, Chakravarthy U, Dasari S, Klaver CC, Vingerling JR, et al. Evidence of association of APOE with age-related macular degeneration: a pooled analysis of 15 studies. *Hum Mutat*. 2011;32:1407-16.
99. Zarbin MA. Current concepts in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol*. 2004;122:598–614.
100. Anderson DH, Ozaki S, Nealon M, Neitz J, Mullins RF, Hageman GS, Johnson LV. Local cellular sources of apolipoprotein E in the human retina and retinal

-
- pigmented epithelium: implications for the process of drusen formation. *Am J Ophthalmol* 2001;131:767–781
101. Crabb JW, Miyagi M, Gu X, et al. Drusen proteome analysis: an approach to the etiology of age-related macular degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002;99:14682–14687.
102. 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;45:1311-5.
103. Kan M, Weng X, Wang T, Liu F, Ye J, Zhang H, et al. No evidence of association between variant rs2075650 in lipid metabolism-related locus APOE/TOMM40 and advanced age-related macular degeneration in Han Chinese population. *Exp Biol Med (Maywood)* 2015;240:230-4.
104. Tan JS, Mitchell P, Smith W, Wang JJ. Cardiovascular risk factors and the long-term incidence of age-related macular degeneration: the Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology* 2007;114:1143–1150.
105. Paulusma da A, Stambolian D, Chen W, Curcio CA, Abecasis GR, Swaroop A. Age-related macular degeneration-associated variants at chromosome 10q26 do not significantly alter ARMS2 and HTRA1 transcript levels in the human retina. *Mol Vis* 2010;16:1317-23.
106. Borst P, Elferink RO. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem* 2002;71:537-92.

-
107. Quazi F, Lenevich S, Molday RS. ABCA4 is an N-retinylidene-phosphatidylethanolamine and phosphatidylethanolamine importer. *Nature Communications* 2012; doi:10.1038/ncomms1927 .
108. Piehler AP, Ozcürümez M, Kaminski WE. A-Subclass ATP-Binding Cassette Proteins in Brain Lipid Homeostasis and Neurodegeneration. *Front Psychiatry* 2012;3:17
109. Cideciyan AV, Swider M, Aleman TS, Tsybovsky Y, Schwartz SB, Windsor EA, et al. ABCA4 disease progression and a proposed strategy for gene therapy. *Hum Mol Genet* 2009;18:931-41.
110. Kjellström U. Association between genotype and phenotype in families with mutations in the ABCA4 gene. *Mol Vis* 2014;20:89-104.
111. Charbel Issa P, Barnard AR, Singh MS, Carter E, Jiang Z, Radu RA, et al. Fundus autofluorescence in the Abca4(-/-) mouse model of Stargardt disease--correlation with accumulation of A2E, retinal function, and histology. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54:5602-12.
112. Beit-Ya'acov A, Mizrahi-Meissonnier L, Obolensky A, Landau C, Blumenfeld A, Rosenmann A, et al. Homozygosity for a novel ABCA4 founder splicing mutation is associated with progressive and severe Stargardt-like disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:4308-14..
113. Anderson DH, Radeke MJ, Gallo NB, Chapin EA, Johnson PT, Curletti CR, et al. The pivotal role of the complement system in aging and age-related macular degeneration: hypothesis re-visited. *Prog Retin Eye Res* 2010;29:95-112.
114. Bhutto I, Luttj G. Understanding age-related macular degeneration (AMD): relationships between the photoreceptor/retinal pigment epithelium/Bruch's

-
- membrane/choriocapillaris complex. *Molecular Aspects of Medicine* 2012;33:295–317.
- 115.Cummings M, Cunha-Vaz J. Treatment of neovascular age-related macular degeneration in patients with diabetes. *Clin Ophthalmol* 2008;2:369-75.
- 116.Gautier EL, Shay T, Miller J, Greter M, Jakubzick C, Ivanov S, et al. Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nat Immunol* 2012;13:1118-28.
- 117.Luo C, Chen M, Xu H. Complement gene expression and regulation in mouse retina and retinal pigment epithelium/choroid. *Mol Vis* 2011;17:1588-97.
- 118.Ma W, Qin LX, Liu FT, Gu Z, Wang J, Pan ZG, et al. Ubiquinone-quantum dot bioconjugates for in vitro and intracellular complex I sensing. *Sci Rep* 2013;3:1537.
- 119.Calippea B, Guillonneau X, Sennlauba F. Complement factor H and related proteins in age-related macular degeneration. *Comptes Rendus Biologies* 2014;178–184.
- 120.Zipfel PF, Lauer N, Skerka C. The role of complement in AMD. *Adv Exp Med Biol* 2010;703:9-24.
- 121.Li T, Hu A, Li S, Luo Y, Huang J, Yu H, et al. KH906, a recombinant human VEGF receptor fusion protein, is a new effective topical treatment for corneal neovascularization. *Mol Vis* 2011;17:797-803.
- 122.Lee HS, Jun JH, Jung EH, Koo BA, Kim YS. Epigallocatechin-3-gallate inhibits ocular neovascularization and vascular permeability in human retinal

- pigment epithelial and human retinal microvascular endothelial cells via suppression of MMP-9 and VEGF activation. *Molecules* 2014;19:12150-72.
123. Bird AC. The Bowman lecture. Towards an understanding of age-related macular disease. *Eye (Lond)* 2003;17:457-66.
124. Damico FM. Angiogenesis and retinal diseases. *Arq. Bras. Oftalmol* 2007; <http://dx.doi.org/10.1590/S0004-27492007000300030>.
125. Tamary H, Offret H, Dgany O, Foliguet B, Wickramasinghe SN, Krasnov T, et al. Congenital dyserythropoietic anaemia, type I, in a Caucasian patient with retinal angioid streaks (homozygous Arg1042Trp mutation in codanin-1). *Eur J Haematol* 2008;80:271-4.
126. Owen LA, Morrison MA, Ahn J, Woo SJ, Sato H, Robinson R, et al. FLT1 genetic variation predisposes to neovascular AMD in ethnically diverse populations and alters systemic FLT1 expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55:3543-54.
127. Hagstrom SA, Ying GS, Pauer GJ, Sturgill-Short GM, Huang J, Maguire MG, et al. VEGFA and VEGFR2 gene polymorphisms and response to anti-vascular endothelial growth factor therapy: comparison of age-related macular degeneration treatments trials (CATT). *JAMA Ophthalmol* 2014;132:521-7.
128. Zhu D, Yang DY, Guo YY, Zheng YF, Li JL, Wang B, et al. Intracameral interleukin 1 β , 6, 8, 10, 12p, tumor necrosis factor α and vascular endothelial growth factor and axial length in patients with cataract. *PLoS One* 2015;10(2):e0117777.

-
- 129.Lu Y, Shi Y, Xue C, Yin J, Huang Z. Pooled-analysis of the associations between three polymorphisms in the VEGF gene and age-related macular degeneration. *Mol Biol Rep.*2012;39:6547-53.
- 130.Dehghanian F, Hojati Z, Kay M. New Insights into VEGF-A Alternative Splicing: Key Regulatory Switching in the Pathological Process. *Avicenna J Med Biotechnol* 2014;6:192-9.
- 131.Tomao F, Papa A, Rossi L, Zaccarelli E, Caruso D, Zoratto F, et al. Angiogenesis and antiangiogenic agents in cervical cancer. *Onco Targets Ther* 2014;7:2237-48.
- 132.Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000;407:249-57.
- 133.Churchill AJ, Carter JG, Lovell HC, Ramsden C, Turner SJ, Yeung A, et al. VEGF polymorphisms are associated with neovascular age-related macular degeneration. *Human Molecular Genetics* 2006;15:2955–2961.
- 134.Jiang Y, Liang G, Wang L, Jiang J, Du G, Huang Y. Association between vascular endothelial growth factor +936 C/T gene polymorphism and age-related macular degeneration. *J Int Med Res* 2013;41:317-24.
- 135.Mowatt G, Hernández R, Castillo M, Lois N, Elders A, Fraser C, et al. Optical coherence tomography for the diagnosis, monitoring and guiding of treatment for neovascular age-related macular degeneration: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess* 2014;18:1-254.
- 136.Kanda A, Stambolian D, Chen W, Curcio CA, Abecasis GR, Swaroop A. Age-related macular degeneration-associated variants at chromosome 10q26 do not

-
- significantly alter ARMS2 and HTRA1 transcript levels in the human retina. *Mol Vis* 2010;16:1317-23.
- 137.Rocha-Martins M, Njaine B, Silveira MS. Avoiding pitfalls of internal controls: validation of reference genes for analysis by qRT-PCR and Western blot throughout rat retinal development. *PLoS One* 2012;7:e43028.
- 138.Yuan JS, Reed A, Chen F, Stewart CN Jr. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics* 2006;7:85.
- 139.Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002; 18;3.
- 140.V Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Doença Aterosclerótica. Sociedade brasileira de cardiologia. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia* 2013; 88: 4-36.
- 141.Gan CL, Ng EK, Chan BL, Hashim U, Classe FC. Technical Barriers and Development of Cu Wirebonding in Nanoelectronics Device Packaging. *Journal of Nanomaterials* 2012; doi.org/10.1155/2012/173025.
- 142.Protocolos do Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional – SISVAN 2008; 1-33.
- 143.De Angelis 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 Ophthalmologic* 2007;125:49-54.

-
144. Utheim ØA, Ritland JS, Utheim TP, Espeseth T, Lydersen S, Rootwelt H, Semb SO, Elsas T. Apolipoprotein e genotype and risk for development of cataract and age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmol* 2008;86:401–3.
145. Losonczy G, Fekete Á, Vokó Z, Takács L, Káldi I, Ajzner É, et al. Analysis of complement factor H Y402H, LOC387715, HTRA1 polymorphisms and ApoE alleles with susceptibility to age-related macular degeneration in Hungarian patients. *Acta Ophthalmol* 2011;89:255-62.
146. Huang C, Xu Y, Li X, Wang W. Vascular endothelial growth factor A polymorphisms and age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. *Mol Vis* 2013;19:1211-21.
147. Fritsche LG, Freitag-Wolf S, Bettecken T, Meitinger T, Keilhauer CN, Krawczak M, et al. Age-related macular degeneration and functional promoter and coding variants of the apolipoprotein E gene. *Hum Mutat.* 2009;30:1048-53.
148. Wickremasinghe SS, Xie J, Lim J, Chauhan DS, Robman L, Richardson AJ, et al. Variants in the APOE gene are associated with improved outcome after anti-VEGF treatment for neovascular AMD. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52:4072-9.
149. Huang Y. Apolipoprotein E and Alzheimer disease. *Neurology* 2006;66:79-85.
150. Donix M, Ercoli LM, Siddarth P, Brown JA, Martin-Harris L, Burggren AC, et al. Influence of Alzheimer disease family history and genetic risk on cognitive performance in healthy middle-aged and older people. *Am J Geriatr Psychiatry* 2012;20:565-73.

-
- 151.Santos RV, Fry PH, Monteiro S, Maio MC, Rodrigues JC, Bastos-Rodrigues L, et al. Color, race, and genomic ancestry in Brazil: dialogues between anthropology and genetics. *Curr Anthropol*. 2009;50: 787-819.
- 152.Thakkinstian A, Bowe S, McEvoy M, Smith W, Attia J. Association between apolipoprotein E polymorphisms and age-related macular degeneration: A HuGE review and meta-analysis. *Am J Epidemiol* 2006;164:813-22.
- 153.Zarepari S, Reddick AC, Branham KE, Moore KB, Jessup L, Thoms S, et al. Association of apolipoprotein E alleles with susceptibility to age-related macular degeneration in a large cohort from a single center. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004 45:1306-10.
- 154.Bojanowski CM, Shen D, Chew EY, Ning B, Csaky KG, Green WR, et al. An apolipoprotein E variant may protect against age-related macular degeneration through cytokine regulation. *Environ Mol Mutagen* 2006;47:594-602.
- 155.Bergeron-Sawitzke J, Gold B, Olsh A, Schlotterbeck S, Lemon K, Visvanathan K, et al. Multilocus analysis of age-related macular degeneration. *Eur J Hum Genet* 2009;17:1190–1199.
- 156.Francis PJ, Hamon SC, Ott J, Weleber RG, Klein ML. Polymorphisms in C2, CFB and C3 are associated with progression to advanced age r elated macular degeneration associated with visual loss. *J Med Genet* 2009;46:300–307.
- 157.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; 125:353-9.

-
- 158.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;16:174-82.
- 159.Cremers FP, van de Pol DJ, van Driel M, den Hollander AI, van Haren FJ, Knoers NV, et al. Autosomal recessive retinitis pigmentosa and cone-rod dystrophy caused by splice site mutations in the Stargardt's disease gene ABCR. *Hum Mol Genet* 1998;7:355-62.
- 160.Allikmets R, Singh N, Sun H, Shroyer NF, Hutchinson A, Chidambaram A, et al. A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (ABCR) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy. *Nat Genet* 1997;15:236-46.
- 161.Maugeri A, Klevering BJ, Rohrschneider K, Blankenagel A, Brunner HG, Deutman AF, et al. Mutations in the ABCA4 (ABCR) gene are the major cause of autosomal recessive cone-rod dystrophy. *Am J Hum Genet* 2000;67:960-6.
- 162.Allikmets, R. and The International ABCR Screening Consortium. Further evidence for an association of ABCR alleles with age-related macular degeneration. *Am. J. Hum. Genet* 2000;67:487-491.
- 163.Stone EM, Webster AR, Vandenburg K, Streb LM, Hockey RR, Lotery AJ, et al. Allelic variation in ABCR associated with Stargardt disease but not age-related macular degeneration. *Nat Genet* 1998;20:328-9.
- 164.Leveziel N, Tilleul J, Puche N, Zerbib J, Laloum F, Querques G, et al. Genetic Factors Associated with Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmologica* 2011;226:87-102.

-
165. Fisher SA, Abecasis GR, Yashar BM, Zarepari S, Swaroop A, Iyengar SK, et al. Meta-analysis of genome scans of age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet* 2005;14:2257-64.
166. 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;308:385-9.
167. Chen W, Stambolian D, Edwards AO, Branham KE, Othman M, Jakobsdottir J, et al. Genetic variants near TIMP3 and high-density lipoprotein-associated loci influence susceptibility to age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:7401-6.
168. Lauer N, Mihlan M, Hartmann A, Schlötzer-Schrehardt U, Keilhauer C, Scholl HP, et al. Complement regulation at necrotic cell lesions is impaired by the age-related macular degeneration-associated factor-H His402 risk variant. *J Immunol* 2011;187:4374-83.
169. Sepp T, Khan JC, Thurlby DA, Shahid H, Clayton DG, Moore AT, et al. Complement factor H variant Y402H is a major risk determinant for geographic atrophy and choroidal neovascularization in smokers and nonsmokers. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:536-40.
170. Edwards AO, Ritter R 3rd, Abel KJ, Manning A, Panhuysen C, Farrer LA. Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science* 2005;308:421-4.
171. 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;308:419-21.

-
172. 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;77:149-53.
173. 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* 2005;102:7227-32.
174. Souied EH, Leveziel N, Richard F, Dragon-Durey MA, Coscas G, Soubrane G, et al. Y402H complement factor H polymorphism associated with exudative age-related macular degeneration in the French population. *Mol Vis*. 2005;11:1135-40.
175. Klein R, Cruickshanks KJ, Nash SD, Krantz EM, Nieto FJ, Huang GH, et al. The prevalence of age-related macular degeneration and associated risk factors. *Arch Ophthalmol* 2010;128:750-8.
176. Chen JH, Yang Y, Zheng Y, Qiu M, Xie M, Lin W, et al. No association of age-related maculopathy susceptibility protein 2/HtrA serine peptidase 1 or complement factor H polymorphisms with early age-related maculopathy in a Chinese cohort. *Mol Vis* 2013;19:944-54.
177. Gotoh N, Yamada R, Hiratani H, Renault V, Kuroiwa S, Monet M, et al. No association between complement factor H gene polymorphism and exudative age-related macular degeneration in Japanese. *Hum. Genet* 2006;120:139-143.

-
178. Mori K, Horie-Inoue K, Gehlbach PL, Takita H, Kabasawa S, Kawasaki I, et al. Phenotype and genotype characteristics of age-related macular degeneration in a Japanese population. *Ophthalmology* 2010;117:928-38.
179. Li M, Atmaca-Sonmez P, Othman M, Branham KEH, Khanna R, et al. CFH haplotypes without the Y402H coding variant show strong association with susceptibility to age-related macular degeneration. *Nat. Genet* 2006;38:1049–1054.
180. Zhang H, Morrison MA, Dewan A, Adams S, Andreoli M, Huynh N, et al. The NEI/NCBI dbGAP database: genotypes and haplotypes that may specifically predispose to risk of neovascular age-related macular degeneration. *BMC Med Genet* 2008;9:51.
181. Qu Y, Dai H, Zhou F, Zhang X, Xu X, Bi H, et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and risk of neovascular age-related macular degeneration in a Chinese cohort. *Ophthalmic Res* 2011;45:142–148.
182. Galan A, Ferlin A, Caretti L, Buson G, Sato G, Frigo AC, et al. Association of age-related macular degeneration with polymorphisms in vascular endothelial growth factor and its receptor. *Ophthalmology* 2010; 117:1769-74.
183. Lin JM, Wan L, Tsai YY, Lin HJ, Tsai Y, Lee CC, et al. Vascular Endothelial Growth Factor Gene Polymorphisms in Age-related Macular Degeneration. *Am J Ophthalmol* 2008;1045–1051.
184. Despret DD, Klaver CC, Witteman JC, Bergen AA, Kardys I, de Maat MP, et al. Complement factor H polymorphism, complement activators, and risk of age-related macular degeneration. *JAMA* 2006;296:301-9.

-
- 185.Papazoglou D, Galazios G, Papatheodorou K, Liberis V, Papanas N, Maltezos E, et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and idiopathic recurrent pregnancy loss, *Fertility and Sterility* 2005;83:959-963.
- 186.Renner W, Kotschan S, Hoffmann C, Obermayer-Pietsch B, Pilger E. A common 936 C/T mutation in the gene for vascular endothelial growth factor is associated with vascular endothelial growth factor plasma levels. *J Vasc Res.* 2000;37:443-8.
- 187.Kataoka N, Cai Q, Wen W, Shu X, Jin, F, Gao YT, et al. Population-Based Case-Control Study of VEGF Gene Polymorphisms and Breast Cancer Risk among chinese Women, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 6:1148-1152.
- 188.Lazzeri S, Figus M, Orlandi P, Fioravanti A, Di Desidero T, Agosta E, et al. VEGF-A polymorphisms predict short-term functional response to intravitreal ranibizumab in exudative age-related macular degeneration. *Pharmacogenomics* 2013;14:623-30.
- 189.Boekhoorn SS, Isaacs A, Uitterlinden AG, van Duijn CM, Hofman A, Jong,Johannes R. Vingerling. Polymorphisms in the Vascular Endothelial Growth Factor Gene and Risk of Agerelated Macular degeneration. *Ophthalmology* 2008; 115:1899–1903.
- 190.Xu J, Turner A, Little J, Bleecker ER, Meyers DA. Positive results in association studies are associated with departure from Hardy-Weinberg equilibrium: hint for genotyping error? *Hum Genet* 2002;111:573-4.
- 191.Wittke-Thompson JK, Pluzhnikov A, Cox NJ. Rational inferences about departures from Hardy-Weinberg equilibrium.*Am J Hum Genet* 2005;76:967-86.

-
192. Carvalho F, Junior RT, Machado JCMS. An anthropological investigation of old age and concepts concerning arterial hypertension. *Cad. Saúde Pública* 1998; 14:617-621.
193. Magnabosco P, Teraoka EC, Oliveira EM, Felipe EA, Freitas D, Marchi-Alves LM. Comparative analysis of non-adherence to medication treatment for systemic arterial hypertension in urban and rural populations. *Rev Lat Am Enfermagem* 2015;23:20-7.
194. Ratnapriya R, Chew EY. Age-related macular degeneration-clinical review and genetics update. *Clin Genet* 2013;84:160-6.
195. Prokofyeva E, Zrenner E. Epidemiology of major eye diseases leading to blindness in Europe: a literature review. *Ophthalmic Res* 2012;47:171-88.
196. Spanish Eyes Epidemiological (SEE) Study Group. Prevalence of age-related macular degeneration in Spain. *Br J Ophthalmol* 2011;95:931-6.
197. Rudnicka AR, Jarrar Z, Wormald R, Cook DG, Fletcher A, Owen CG. Age and gender variations in age-related macular degeneration prevalence in populations of European ancestry: a meta-analysis. *Ophthalmology* 2012;119:571-80.
198. Edwards DR, Gallins P, Polk M, Ayala-Haedo J, Schwartz SG, Kovach JL, et al. Inverse association of female hormone replacement therapy with age-related macular degeneration and interactions with ARMS2 polymorphisms. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:1873-9.
199. Cho BJ, Heo JW, Shin JP, Ahn J, Kim TW, Chung H. Association between reproductive factors and age-related macular degeneration in postmenopausal women: the Korea National Health and Nutrition Examination Survey 2010-2012. *PLoS One* 2014;9:e102816.

-
- 200.Rudnicka AR, Kapetanakis VV, Jarrar Z, Wathern AK, Wormald R, Fletcher AE, et al. Incidence of late stage age related macular degeneration in American whites: systematic review and meta-analysis. *Am J Ophthalmol* 2015;02:9394-9.
- 201.Mitchell P, Wang JJ, Foran S, Smith W. Five-year incidence of age-related maculopathy lesions: the Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology*. 2002 Jun;109:1092-7.
- 202.Wang JJ, Rochtchina E, Lee AJ, Chia EM, Smith W, Cumming RG, et al. Ten-year incidence and progression of age-related maculopathy: the blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology* 2007;114:92-8.
- 203.Smith, W, Mitchell, P, Wang, J. Gender, oestrogen, hormone replacement and age-related macular degeneration: Results from the Blue Mountains Eye Study. *Australian and New Zealand Journal of Ophthalmology* 1997;25:13–15.
- 204.Harrison RA, Buchan I, Kelly SP. Smoking and age-related macular degeneration: a review of association. *Eye* 2005;19:935- 44.
- 205.Coleman AL, Seitzman RL, Cummings SR, Yu F, Cauley JA, Ensrud KE, et al. Study Of Osteoporotic Fractures Research Group. The association of smoking and alcohol use with age-related macular degeneration in the oldest old: the Study of Osteoporotic Fractures. *Am J Ophthalmol* 2010;149:160-9.
- 206.Lawrenson JG, Evans JR. Advice about diet and smoking for people with or at risk of age-related macular degeneration: a cross-sectional survey of eye care professionals in the UK. *BMC Public Health* 2013;10;13:564.
- 207.Bora PS, Kaliappan S, Xu Q, Kumar S, Wang Y, Kaplan HJ, et al. Alcohol linked to enhanced angiogenesis in rat model of choroidal neovascularization. *FEBS J* 2006;273:1403-14.

-
- 208.Hogg RE, Woodside JV, Gilchrist SE, Graydon R, Fletcher AE, Chan W, et al. Cardiovascular disease and hypertension are strong risk factors for choroidal neovascularization. *Ophthalmology* 2008;115:1046-1052.
- 209.Shroyer NF, Lewis RA, Yatsenko AN, Wensel TG, Lupski JR. Cosegregation and functional analysis of mutant ABCR (ABCA4) alleles in families that manifest both Stargardt disease and age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet* 2001;10:2671–2678.
- 210.Curcio CA, Johnson M, Huang JD, Rudolf M. Apolipoprotein B-containing lipoproteins in retinal aging and age-related macular degeneration. *J Lipid Res* 2010;51:451-67.
- 211.Nowak M, Swietochowska E, Marek B, Szapska B, Wielkoszynski T, Kos-Kudla B, et al. Changes in lipid metabolism in women with age-related macular degeneration. *Clin Exp Med* 2005;4:183-7.
- 212.Ulaş F, Balbaba M, Özmen S, Çelebi S, Doğan Ü. Association of dehydroepiandrosterone sulfate, serum lipids, C-reactive protein and body mass index with age-related macular degeneration. *Int Ophthalmol* 2013;33:485-91.
- 213.Cackett P, Wong TY, Aung T, Saw SM, Tay WT, Rochtchina E, et al. Smoking, cardiovascular risk factors, and age-related macular degeneration in Asians: the Singapore Malay Eye Study. *Am J Ophthalmol* 2008;146:960-7.
- 214.Klein R, Klein BE, Tomany SC, Cruickshanks KJ. The association of cardiovascular disease with the long-term incidence of age-related maculopathy: the Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology* 2003;110:1273–1280.

-
215. van Leeuwen R, Klaver CC, Vingerling JR, Hofman A, van Duijn CM, Stricker BH, et al. Cholesterol and age-related macular degeneration: is there a link?. *Am J Ophthalmol* 2004;137:750-2.
216. Yeum KJ, Russell RM. Carotenoid bioavailability and bioconversion. *Annu Rev Nutr* 2002;22:483–504.
217. Moeller SM, Parekh N, Tinker L, Ritenbaugh C, Blodi B, Wallace RB, et al. Associations between intermediate age-related macular degeneration and lutein and zeaxanthin in the Carotenoids in Age-Related Eye Disease Study (CAREDS): ancillary study of the Women's Health Initiative. *Arch Ophthalmol* 2006; 124:1151-62.
218. Trieschmann M, Beatty S, Nolan JM, Hense HW, Heimes B, Austermann U, et al. Changes in macular pigment optical density and serum concentrations of its constituent carotenoids following supplemental lutein and zeaxanthin: the LUNA study. *Exp Eye Res* 2007;84:718-28.
219. Kijlstra A, Tian Y, Kelly ER, Berendschot TT. Lutein: more than just a filter for blue light. *Prog Retin Eye Res* 2012;31:303-315.
220. Albert AD, Boesze-Battaglia K. The role of cholesterol in rod outer segment membranes. *Prog Lipid Res* 2005;44:99-124.
221. Stefanick ML, Mackey S, Sheehan M, Ellsworth N, Haskell WL, Wood PD. Effects of diet and exercise in men and postmenopausal women with low levels of HDL cholesterol and high levels of LDL cholesterol. *N Engl J Med* 1998;339:12-20.

-
- 222.Souza DRS, Nakachima L, Biagioni RB, Nakazone MA, Pinhel MAS,Trindade DM, et al. Relevance of apolipoprotein E4 for the lipid profile of Brazilian patients with coronary artery disease. *Braz. J. Med. Biol. Res* 2007;2: 189-197.
- 223.Davignon J, Gregg RE, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 1988;8:1-21.
- 224.Seddon JM, Cote J, Davis N, Rosner B. Progression of age-related macular degeneration: association with body mass index, waist circumference, and waist-hip ratio. *Arch Ophthalmol* 2003;121:785-92.
- 225.Seddon JM, Chen CA. Epidemiology of age-related macular degeneration. In: Ryan SJ, Hinton DR, Schachat AP, et al., editors. *Retina* 2006;1017–1027.
- 226.Hirvelä H, Luukinen H, Läärä E, Sc L, Laatikainen L. Risk factors of age-related maculopathy in a population 70 years of age or older. *Ophthalmology* 1996; 103:871-7.
- 227.Whitmore SS, Braun TA, Skeie JM, Haas CM, Sohn EH, Stone EM, et al. Altered gene expression in dry age-related macular degeneration suggests early loss of choroidal endothelial cells. *Mol Vis* 2013;19:2274-97.
- 228.Radu RA, Hu J, Yuan Q, Welch DL, Makshanoff J, Lloyd M, et al. Complement system dysregulation and inflammation in the retinal pigment epithelium of a mouse model for Stargardt macular degeneration. *J Biol Chem* 2011;286:18593-601.
- 229.Hollyfield JG, Bonilha VL, Rayborn ME, Yang X, Shadrach KG, Lu L, et al. Oxidative damage-induced inflammation initiates age-related macular degeneration. *Nat Med* 2008;14:194-8.

-
230. Abalain JH, Carre JL, Leglise D, Robinet A, Legall F, Meskar A, et al. Is age-related macular degeneration associated with serum lipoprotein and lipoparticle levels? *Clin Chim Acta* 2002;326:97-104.
231. Utermann G, Langenbeck U, Beisiegel U, Weber W. Genetics of the apolipoprotein E system in man. *Am J Hum Genet* 1980;32:339-347.
232. Scholl HP, Charbel Issa P, Walier M, Janzer S, Pollok-Kopp B, Börncke F, et al. Systemic complement activation in age-related macular degeneration. *PLoS One* 2008;2;3(7):e2593.
233. Sharma NK, Gupta A, Prabhakar S, Singh R, Sharma SK, Chen W, et al. Association between CFH Y402H polymorphism and age related macular degeneration in North Indian cohort. *PLoS One* 2013;29;8(7):e70193.
234. Dhillon B; Wright AF, Tufail A, Pappworth I, Hayward C; Moore I, et al. Complement factor h autoantibodies and age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:5858-63.
235. Carneiro AM, Costa R, Falcão MS, Barthelmes D, Mendonça LS, Fonseca SL, et al. Vascular endothelial growth factor plasma levels before and after treatment of neovascular age-related macular degeneration with bevacizumab or ranibizumab. *Acta Ophthalmol* 2012;90:25-30.
236. Tsai DC, Charng MJ, Lee FL, Hsu WM, Chen SJ. Different plasma levels of vascular endothelial growth factor and nitric oxide between patients with choroidal and retinal neovascularization. *Ophthalmologica* 2006;220:246-51.
237. Haas P, Steindl K, Aggermann T, Schmid-Kubista K, Krugluger W, Hageman GS, et al. Serum VEGF and CFH in exudative age-related macular degeneration. *Curr Eye Res* 2011;36:143-8.

-
238. Lip PL, Blann AD, Hope-Ross M, Gibson JM, Lip GY. Age-related macular degeneration is associated with increased vascular endothelial growth factor, hemorheology and endothelial dysfunction. *Ophthalmology* 2001;108:705-10.
239. Matsuyama K, Ogata N, Matsuoka M, Wada M, Takahashi K, Nishimura T. Plasma levels of vascular endothelial growth factor and pigment epithelium-derived factor before and after intravitreal injection of bevacizumab. *Br J Ophthalmol.* 2010;94:1215-8.
240. Martínez-Barricarte R, Recalde S, Fernández-Robredo P, Millán I, Olavarrieta L, Viñuela A, et al. Spanish Multicenter Group on AMD. Relevance of complement factor H-related 1 (CFHR1) genotypes in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;1;53:1087-94.
241. Wray NR, Yang J, Goddard ME, Visscher PM. The genetic interpretation of area under the ROC curve in genomic profiling. *PLoS Genet* 2010; 26;6(2):e1000864. doi:10.1371/journal.pgen.1000864.

7. ANEXOS



FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

Autarquia Estadual - Lei n.º 8899 de 27/09/94

Parecer n.º 57375

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O projeto de pesquisa CAAE n.º 02711112.0.0000.5415 sob a responsabilidade de Rubens Camargo Siqueira, com o título "Influência da expressão gênica e de variantes genéticas envolvidas com a vasculatura e metabolismo lipídico na degeneração macular relacionada à idade" está de acordo com a resolução do CNS 196/96 e foi aprovado por esse CEP.

Lembramos ao senhor(a) pesquisador(a) que, no cumprimento da Resolução 251/97, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) deverá receber relatórios semestrais sobre o andamento do Estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, com certeza para conhecimento deste Comitê. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do Estudo.

São José do Rio Preto, 17 de julho de 2012.


Prof. Dr. Fernando Batigália
Presidente do CEP/FAMERP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Dados de identificação do paciente

Amostra _____

Nome: _____ Sexo _____ Data de nascimento ____/____/____

Prontuário _____ Telefone _____

Dados sobre a pesquisa científica:

Título do projeto: "Fatores Genéticos Relacionados a Lipídios, Angiogênese e Inflamação na Degeneração Macular Relacionada à Idade"

Pesquisador: Prof Dr. Rubens Camargo Siqueira

Instituição: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

Endereço: Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa intitulada "Influência da expressão gênica e de variantes genéticas envolvidas com a vasculatura e metabolismo lipídico na degeneração macular relacionada à idade". Essa pesquisa inclui pacientes com diagnóstico de degeneração macular relacionada à idade (doença do olho) e também paciente sem a doença, e é importante para verificar se existem substâncias alteradas nas suas células relacionadas com o olho. Sua participação consiste em autorizar e permitir que seja realizada uma coleta de uma pequena amostra de sangue feito através de uma veia periférica (punção venosa), para fazer exames bioquímicos e genéticos. Os testes genéticos serão para identificar os seguintes genes: VEGF, APOE, CFH e ABCA4 os quais podem auxiliar na identificação de pacientes com suscetibilidade a desenvolver a degeneração macular relacionada à idade. Além disso, será também analisado o perfil lipídico do paciente (dosagem de gordura no sangue, como o colesterol total e suas frações assim como triglicérides) para verificar a existência de associação entre essas gorduras e os genes acima citados no desenvolvimento da degeneração macular relacionada à idade(DMRI). O seu nome nunca será divulgado, o(s) pesquisador(es) irá(ão) tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados dos seus exames são confidenciais e a análise não é realizada individualmente e sim em um grupo de pacientes com a mesma doença. Você não será identificado(a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Durante a coleta do sangue, sentirá uma discreta dor de picada de agulha (punção venosa) e, às vezes, uma mancha arroxeada no local (hematoma) poderá aparecer que desaparecerá em poucos dias. A coleta de sangue pode ter algumas complicações que são raras, principalmente quando não é injetado medicação e sim somente coletado o sangue. Uma das complicações é a flebite, que consiste em uma inflamação na veia e outro muito menos frequente é a trombose da veia (obstrução da veia). Nestes casos serão necessários uso de medicamentos anti-inflamatórios que serão devidamente prescritos pelo pesquisador responsável Dr Rubens Siqueira. Geralmente estas complicações ficam limitadas na área da veia que foi submetida à coleta do sangue e resolvem em aproximadamente 7 dias. **GARANTIA DE ESCLARECIMENTO, LIBERDADE DE RECUSA E GARANTIA DE SIGILO:** Você será esclarecido(a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios. Queremos deixar claro que será garantido o sigilo da sua identidade e a privacidade de todas informações do seu prontuário e dos dados, identificando as amostras por meio de números. Apenas os pesquisadores autorizados e ativamente participantes do estudo terão acesso às suas informações. Você será devidamente acompanhado durante todo o período do estudo e poderá desistir de participar a qualquer momento, sem que isto prejudique seu atendimento e acompanhamento habitual. **CUSTOS DA PARTICIPAÇÃO, RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO POR EVENTUAIS DANOS.** Se decidir não participar ou interromper a sua participação, em qualquer época, você não terá nenhum tipo de prejuízo, não perderá nenhum benefício e não precisará dar justificativas da sua atitude. É importante saber que sua participação não trará qualquer prejuízo financeiro, mas que também não terá qualquer tipo de remuneração/custos. Os sujeitos de pesquisa que sofrerem danos (previstos ou não no protocolo do estudo) têm o direito à indenização, segundo a Resolução do Conselho Nacional de Saúde CNS 466/2012". Os riscos e danos na realização dos exames oftalmológicos, devido a dilatação da pupila, aplicação de anestésico e contraste endovenoso no paciente, são visão turva, fotofobia, reações alérgicas, desconforto com os flashes das fotografias, para esses exames há a necessidade de aplicações de colírios. **FORMA DE ASSISTÊNCIA:** Você poderá comunicar em nosso serviço através do endereço ou telefone descrito abaixo a qualquer hora, caso apresente algum efeito adverso e será prontamente atendido. Uma cópia deste consentimento informado será arquivada no laboratório do Núcleo de Pesquisa e em bioquímica e biologia molecular da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto e outra será fornecida a você (2 vias do documento). Este projeto é coordenado pelo Prof. Dr. Rubens Camargo Siqueira e durante a pesquisa você poderá tirar qualquer dúvida a respeito do trabalho e se necessário, entrar em contato pelo telefone (17) 3201-5864, na Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP.. Caso você não aceite ou desista de participar da nossa pesquisa, isto não influenciará em hipótese alguma no seu atendimento e tratamento. Se você tiver alguma dúvida sobre esse acordo ou sobre seus direitos, você poderá ainda entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416 - Vila São Pedro - 15090-000 São José do Rio Preto-SP ou pelo telefone (17) 3201-5813 www.cep.famerp.br/

() EU QUERO SER INFORMADO SOBRE RESULTADOS DE MEUS EXAMES

() EU NÃO QUERO SER INFORMADO SOBRE RESULTADOS DE MEUS EXAMES

Data: ____/____/____

Pesquisador responsável

Assinatura do paciente ou responsável

Questionário

() Exsudativa () Seca Amostra: _____

1. IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____ Prontuário: _____
Data de Nascimento e Idade: _____ Sexo _____ Naturalidade: _____
Endereço: _____ Telefone: _____
Bairro _____ Cidade: _____ CEP: _____

2. HISTÓRICO MÉDICO

() Hipertensão () Etilismo () Dislipidemia () Tabagismo () Diabete melito

Outras doenças: _____

Medicamentos em Uso: _____

Idade diagnóstico para DMRI: _____

- I. () Responsivos () não responsivos ao tratamento (resolução da lesão);
- II. Tipo de neovascularização: () clássica () oculta () vasculopatia polipoidal () RAP
- III. Resposta funcional ao tratamento: () melhor que 20/50 () pior que 20/50
- IV. () Presença de deslocamento do epitélio pigmentado () Ausência de descolamento do epitélio pigmentado da retina.

Exame Físico Geral

Peso: _____ kg. Altura: _____ m. IMC (peso/altura): _____ PAS: _____ PAD: _____

Perfil Bioquímico: CT: _____ HLDc: _____ LDLc: _____ VLDLc: _____ TG: _____ Glicemia: _____

3. HISTÓRIA FAMILIAR

Apresenta familiar em 1º grau (pais, irmãos) com

DMRI: _____

Outros tipos de doenças no olho: _____

4- HISTÓRIA DA DOENÇA

Fez tratamento prévio com antiangiogenico (avastin, lucentis)? _____

Quantas injeções? _____ Quanto tempo foi a ultima? _____

Faz uso de vitaminas (antioxidantes) para a degeneração macular? _____

Pesquisador responsável pela entrevista: _____

Data: _____

8. APÊNDICE

Apêndice - Artigo científico publicado durante o período de desenvolvimento do projeto de mestrado (2013 a 2015).

I - Association of high-density lipoprotein cholesterol with apolipoprotein E polymorphism with age-related macular degeneration.

Revista: Arquivos Brasileiros de Oftalmologia

**Association of high-density lipoprotein cholesterol with apolipoprotein E
polymorphism with age-related macular degeneration**

HDLc and apoE polymorphism in macular degeneration

Sabrina Mayara Cezario^{1*}, Maria Clara Jéssica Calastri¹, Camila Ive Ferreira Oliveira¹, Tayanne Silva Carmo¹, Marcela Augusta de Souza Pinhel², Moacir Fernandes de Godoy¹, Rodrigo Jorge³, Carina Costa Cotrim³, Dorotéia Rossi Silva Souza¹, Rubens Camargo Siqueira^{3,4}

- 1- Medical School of São José do Rio Preto - FAMERP, São José do Rio Preto/SP – Brazil.
- 2- Medical School of Ribeirão Preto - FMRP/USP, Ribeirão Preto/SP - Brazil.
- 3- Department of Ophthalmology, Medical School of Ribeirão Preto - FMRP/USP, Ribeirão Preto/SP – Brazil.
- 4- Thesis advisor for the Postgraduate Programme at the Faculty of Health Sciences, Medical School of São José do Rio Preto - FAMERP, São José do Rio Preto/SP – Brazil.

***Corresponding author:**

Sabrina Mayara Cezario

Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP, SP, Brasil.

Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416, São José do Rio Preto/SP, Brasil

Telephone: +55 17 3201 5864

FAX: +55 17 3234 5858

E-mail: sabrina-mayara@hotmail.com

Financial support: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo/FAPESP and Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto/FAMERP.

Research Ethics Committee: CAAE: 02711112.0.0000.5415 – CEP/FAMERP.

Disclosure of potential conflicts of interest: None of the authors have any potential conflicts of interest to disclose.

Abstract

Objective- This study aimed to evaluate the association of AMD with APOE variants and lipid profile, including levels of total serum cholesterol (TC) and fractions (LDLc and HDLc), and triglycerides (TG). **Methods-** Genotyping of APOE-*HhaI* was performed in 134 patients (Study Group - SG) and in 164 individuals without the disease (Control Group - CG), aged between 50 and 89 years. The lipid profile was analyzed in a subgroup of 30 subjects of both groups, matched according to age and sex. The significance level was set at $P < 0,05$. **Results-** APOE E3/E3 prevailed (SG=74.6%; CG=77.4%), with no difference between both groups ($P = 0.667$). The same occurred for risk genotypes (APOE E2/_: SG=7.4%; CG=10.3%, $P=0.624$). Serum levels of TC, LDLc and TG showed similar median value between SG (193.5; 116; 155mg/dL, respectively) and CG (207.5; 120; 123,5mg/dL, respectively; $P > 0.05$). For HDLc, a high median value was observed in G2 (53.3mg/dL) versus G1 (42.5mg/dL; $P=0.016$). The logistic regression analysis also showed the same value, and the HDLc / TC ratio was -11.423 ($P = 0.014$), which was also confirmed by increase in HDLc in G2. The relationship between lipid profile and APOE genotypes was similar between both groups ($P > 0.05$). **Conclusions -** APOE-*HhaI* is not associated with AMD. However, an increase in serum HDLc level seems to have a protector effect against the disease, regardless of genetic variants of apoE.

Keywords: Genetic polymorphism, Lipids, Cholesterol, Ophthalmology, Macular degeneration.

Resumo

Objetivo- Este estudo teve como objetivo avaliar a associação de DMRI com variantes de APOE e perfil lipídico, incluindo níveis séricos de colesterol total (CT) e frações (LDLc e HDLc), e triglicérides (TG). **Métodos** - Realizou-se genotipagem de APOE-*HhaI* em 134 pacientes (Grupo de Estudo – GE) e 164 indivíduos sem a doença (Grupo Controle – GC), na faixa etária entre 50-89 anos. O perfil lipídico foi analisado em um subgrupo de 30 indivíduos de ambos os grupos, pareados por idade e sexo. Admitiu-se nível de significância para valor- $P < 0,05$. **Resultados** – APOE E3/E3 prevaleceu (GE=74,6%; GC=77,4%), sem diferença entre os grupos ($P=0,667$), o mesmo ocorreu para genótipos de risco (APOE E2/_: GE=7,4%; GC=10,3%, $P=0,624$). Níveis séricos de CT, LDLc e TG mostraram medianas semelhantes entre GE (193,5; 116; 155mg/dL, respectivamente) e GC (207,5; 120; 123,5mg/dL, respectivamente; $P > 0,05$). Para HDLc notou-se valor de mediana elevado em G2 (53,3mg/dL) versus G1 (42,5mg/dL; $P=0,016$), constatado também na análise de regressão logística, cuja razão HDLc/CT mostrou coeficiente -11,423 ($P=0,014$), confirmando acréscimo de HDLc em G2. A relação entre perfil lipídico e genótipos de APOE mostrou semelhança entre os grupos ($P > 0,05$). **Conclusão** - APOE-*HhaI* não se associa a DMRI, no entanto, acréscimo no nível sérico de HDLc parece ter efeito protetor contra a doença, independente de variantes genéticas da apoE.

Palavras-chave: Polimorfismo genético, Lipídeos, Colesterol, Oftalmologia, Degeneração macular.

Introduction

Age-related macular degeneration (AMD) is an irreversible, progressive retinal disease, as well as one of the major causes of blindness in individuals over 55 years of age ⁽¹⁾.

AMD can be classified into early, intermediate and late, according to the presence of anomalies of the pigmented retinal epithelium (RPE), size of drusen (yellow pigments consisting of cholesterol and apolipoproteins)⁽²⁾, area of the atrophy of retinal pigment epithelium (geographic atrophy) and presence or absence of choroidal neovascularization (form exudative and atrophic) ⁽²⁻⁴⁾.

In addition to genetic predisposition, which corresponds to 70% of risk of developing the disease ⁽⁵⁾, advanced age is also considered a risk factor, which results in the deposition of lipid particles and formation of drusen in the retina (Bruch's membrane -BM), and compromises retinal function ⁽⁶⁾.

Apolipoprotein E (apoE) plays a role in the metabolism of triglyceride-rich lipoproteins (TG)⁽⁷⁾ and is also found in the retinal pigment epithelium (RPE) and MB⁽⁴⁾. This glycoprotein is encoded by a gene represented by three alleles, known as apoE2, apoE3 and apoE4; while apoE2 and apoE4 are respectively associated with increased and reduced risk of AMD⁽⁷⁾.

The carotenoids, lutein and zeaxanthin, are absorbed together with the fat in the intestines and transported to the retina due to low (LDL) and high density (HDL) lipoproteins⁽⁸⁾. These carotenoids act as antioxidants, limiting oxidative damage to the retina cells, thus with a protective effect against AMD⁽⁹⁾. In this context, it is necessary to evaluate the relationship between lipid profile and genetic variants of apo E, which may establish molecular mechanisms for the development and prevention of the disease. Therefore, this

study aimed to evaluate the association of *APOE-HhaI* polymorphism and its relationship with lipid profile in patients with AMD.

Methods

A total of 298 individuals were studied, including 134 patients (51 to 89 years old; 72 ± 9.3 years old; 50% male) with a diagnosis of AMD (Study Group - SG), and 164 individuals (50 to 81 years old; 59 ± 7.2 years old; 57% male) under ophthalmological treatment due to other causes except for AMD (Control Group - CG). The subjects were assisted and followed up by an ophthalmologist. A specific questionnaire with personal data and medical history was filled out. Exclusion criteria included age less than 50 years and/or diagnosis of diabetes mellitus.

The DNA was extracted from whole blood collected in EDTA, using salting-out method⁽¹⁰⁾. The *APOE* polymorphic fragments were amplified by polymerase chain reaction (PCR) (Mastercycler - Eppendorf), using 0.5 μL of each deoxynucleotide (0.8 mM), 2.5 μL of 10X PCR buffer, 2.5 μL of 10% dimethylsulfoxide, 2.5 μL of each primer (2.5 μM), 0.2 μL Taq polymerase (5 U/ μL), 11 μL of Milli Q water, and 2 μL of diluted genomic DNA (0.2 μg). The *APOE* (rs429358 and rs7412) polymorphism was analyzed using the set of primers: P1: 5'-ACAGAATTCGCCCCGGCCTGGTACAC-3; P2: 5'TAAGCTTGGCACGGCTGTCCAAGGA-3⁽¹¹⁾. Genomic DNA (50ng) amplification (ESCO Thermocycler) consisted of 30 cycles (94°C for 5 minutes, 94°C for 30 seconds, 65°C for 30 seconds and 72° for 30 seconds), followed by a cycle of 10 minutes at 72°C for a final chain extension. For the analysis of restriction fragment length polymorphism (RFLP) the *HhaI* enzyme was applied to the amplification product, followed by 5.0% agarose gel electrophoresis at 110V for 2 hour and 30 minutes, staining with GelRed® (Uniscience), and visualization of the DNA fragments under ultraviolet (UV) light⁽¹²⁾.

For the analysis of lipid profile (TC, HDL, LDL and TG), electronic medical records of the patients were assessed according to the standards of the V Brazilian Guidelines for Dyslipidemia and Prevention of Atherosclerosis (2013)⁽¹³⁾.

Statistical analysis was performed using Minitab and GraphPad statistical software. A descriptive analysis with mean, standard deviation, median and percentage was used. Qualitative variables were assessed with Fisher's Exact test or Chi-Square test. The genotype distribution analysis was performed with Hardy-Weinberg equilibrium testing. For quantitative variables without Gaussian distribution, the analysis of variance was applied to compare three or more groups. For the quantitative variables without Gaussian distribution, the Mann-Whitney test was used to compare two groups. Logistic regression analysis was applied to verify the probability of occurrence of the event (AMD) in the presence of the analyzed variables. The alpha error was set at 5% with significance level of $P < 0.05$.

This study was approved by the Ethics Research Committee of the Medical School of Sao Jose do Rio Preto (FAMERP). All subjects were informed about the study and confirmed their willingness to participate by signing an inf

Results

The distribution of genotype and allele frequencies of APOE-HhaI are presented in Table 1. The homozygous wild-type E3E3 genotype and allele E3 prevailed in patients (74.6%; 0.87, respectively) and controls (77.4%; 0.88, respectively), with no significant difference between both groups ($P = 0.667$; $P = 0.654$, respectively). The same occurred for genotypes with at least one E4 allele ($E_{-}/4$; $P = 0.328$) and one E2 ($E_{-}/2$; $P = 0.624$).

Table 2 shows similar for serum median levels of TC, LDLc and TG between SG (193.5; 116; 155mg/dL, respectively) and CG (207.5; 120; 123.5mg/dL, respectively, $P > 0.05$). For HDLc a higher median value could be observed in SG (53.3mg/dL) compared with

SG (42.5mg / dL; P=0.016). This finding was confirmed in the logistic regression analysis, whose HDLc/TC ratio was -11.423 (P=0.014). The lipid profile did not show an association with the genotypes of APOE-HhaI (P> 0.05; Table 3).

Discussion

In this study, like in other populations^(14,15), an association of APOE-*HhaI* polymorphism with AMD cannot be confirmed, which goes against other authors' findings⁽¹⁶⁾. The E3E3 genotype and the allele E3 prevailed in patients and controls, which is corroborated by other study⁽⁷⁾. There is also reference of higher frequency of allele E3, particularly in individuals without the disease⁽¹⁷⁾. In this study, the sample size plays an important role, as well as the very diverse ethnical background of the different populations, as the Brazilian population is composed especially of individuals of Amerindian, African and European descent⁽¹⁸⁾.

The meta-analysis clearly showed the protective effect of the E4 allele, even in heterozygotes⁽¹⁹⁾, which was not observed in this study. E2 allele, is considered a risk allele⁽¹⁶⁾, which was not observed between the groups. This finding is corroborated by other studies^(14,15).

The protective nature of apoE4 can be explained by the fact that this protein has no cysteine residues at position 112 and 158, unlike apo E2 and apo E3. This prevents the formation of disulfide bridges with other proteins, as found in the binding between apoE3 and apo A-II in HDL⁽²⁰⁾. The inability of apoE4 to form dimers with other proteins found in the HDL facilitates the transport of lipoproteins in the MB, given the small size of these particles, thereby enabling the prevention of drusen^(20,21). Therefore, this prevention could be optimized in the concomitant presence of apo E4 and high levels of HDL. Although this study has not confirmed an association between genetic variants of APOE, it has shown

higher levels of HDL, particularly in the control group, in accordance with other study⁽²²⁾, and therefore suggested increased HDLc as a protective factor for AMD. However, Chakravarthy et al. (2010)⁽²³⁾ did not confirm this association, while other report higher risk for the disease related to high serum levels of HDLc⁽²⁴⁾.

HDL particles are responsible for the transport of carotenoids lutein and zeaxanthin, which are found in dark green leafy vegetables, maize, squash, broccoli, peas and egg yolk⁽²⁵⁾. In addition to the antioxidant activity, these carotenoids hold great potential to improve macular pigment density⁽²⁶⁾, and therefore help filter and absorb blue light. Thus, HDL is being researched due to its possible key role in protecting against AMD⁽²⁷⁾.

In this context, changes in the metabolism of cholesterol, especially in HDL, may influence drusen accumulation, and consequently promote the development of AMD. This suggests that increasing levels of HDLc associated with a diet rich in carotenoids could interfere with disease progression, especially in patients currently under treatment, and therefore contribute to its prognosis. Thus, reduced levels of HDLc could offer risk for the disease, as described in this study.

Researches show that cholesterol can be obtained from systemic sources and recycled within the retina, whose process is completed by means of circulation of blood lipids. Thus, the retinal rod cells are capable of using both lipids from liver and lipids recycled from the RPE⁽²⁸⁾. This could explain the relationship between raised serum cholesterol level and AMD, which was not observed in this study. Some authors agree with this finding^(3,23), some other authors disagree with it^(22,29). In this case, sample size, age and sex, as well as lifestyle should be considered.

This study assessed the association of lipid profile with the *APOE-HhaI* polymorphism. The apo E plays a role in the metabolism of TG-rich lipoproteins (chylomicrons and very low density lipoprotein), as well as in its relationship with HDL^(3,30).

Importantly, apo E3 and especially apo E4 show affinity with the membrane receptor apoB/E, while apoE2 is resistant that connection, which influences serum levels of TC, LDLc and TG⁽¹⁹⁾. Thus, the APOE-HhaI genotypes could contribute to changes in the levels of serum lipids, and consequently cause greater deposition in the RPE and form drusen⁽²⁸⁾.

However, patients and controls showed similarities in relation to the distribution of CT, LDLc, HDLc and TG values, considering all genotypes of APOE-*HhaI*. In this case, it is worth mentioning that the small sample size is a limitation of this study. This study aimed to match both groups (patients and controls) according to sex and age, in order to minimize confounding factors in the statistical analysis involving the lipid profile associated with the genetic polymorphism. The findings should be confirmed in further studies with larger sample sizes and various populations.

Conclusion

APOE-*HhaI* has no association with AMD; however, increased serum levels of HDLc seems to offer protection against the disease, regardless of genetic variants of apoE. This should be confirmed in larger sample sizes and patient subgroups in different populations.

Acknowledgments: We wish to thank the following institutions: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo/FAPESP, FAEPA (Fundação de Apoio ao Ensino Pesquisa e Assistência do HCFMRP-USP).

Reference

1. Khan M, Agarwal K, Loutfi M, Kamal A. Present and possible therapies for age-related macular degeneration. *ISRN Ophthalmol*. 2014;608390.
2. F.L. Ferris 3rd, C.P. Wilkinson, A. Bird, U. Chakravarthy, E. Chew, K. Csaky, et al. Clinical classification of age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. 2013;120(4):844–51.
3. Cougnard-Grégoire A, Delyfer MN, Korobelnik JF, Rougier MB, Le Goff M, Dartigues JF, et al. Elevated high-density lipoprotein cholesterol and age-related macular degeneration: the Alienor study. *PLoS One*. 2014;9(3):e90973.
4. Horie-Inoue K, Inoue S. Genomic aspects of age-related macular degeneration. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;452(2):263-75.
5. Spencer KL, Olson LM, Schnetz-Boutaud N, Gallins P, Agarwal A, Iannaccone A, et al. Using genetic variation and environmental risk factor data to identify individuals at high risk for age-related macular degeneration. *PLoS One*. 2011;6(3):e17784.
6. Curcio CA, Johnson M, Rudolf M, Huang JD. The oil spill in ageing Bruch membrane. *Br J Ophthalmol*. 2011;95(12):1638–45.
7. Sun E, Lim A, Liu X, Snellings T, Wang N, Liu N. Apolipoprotein E gene and age-related macular degeneration in a Chinese population. *Mol Vis*. 2011; 17:997-1002.
8. Yeum KJ, Russell RM. Carotenoid bioavailability and bioconversion. *Annu Rev Nutr*. 2002;22:483–504.
9. Meyers KJ, Mares JA, Igo RP Jr, Truitt B, Liu Z, Millen AE, et al. Genetic evidence for role of carotenoids in age-related macular degeneration in the Carotenoids in Age-Related Eye Disease Study (CAREDS). *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55(1):587-99.
10. Salazar LA, Hirata MH, Cavalli SA, Machado MO, Hirata RD. Optimized procedure for DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. *Clin Chem*. 1998;44(8):1748-50.
11. Hixson JE, Vernier DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J Lipid Res*. 1990;31(3):545–548.
12. Rougeron V, Woods CM, Tiedje KE, Bodeau-Livinec F, Migot-Nabias F, Deloron P, et al. Epistatic Interactions between apolipoprotein E and hemoglobin S Genes in regulation of malaria parasitemia. *PLoS One*. 2013; 8(10):e76924.
13. Sociedade Brasileira de Cardiologia. V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose de 2013. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2013; 101:1-2

14. Losonczy G, Fekete Á, Vokó Z, Takács L, Káldi I, Ajzner É, et al. Analysis of complement factor H Y402H, LOC387715, HTRA1 polymorphisms and ApoE alleles with susceptibility to age-related macular degeneration in Hungarian patients. *Acta Ophthalmol.* 2011;89(3):255-62.
15. Huang H, Parlier R, Shen JK, Luttly GA, Viores SA. VEGF receptor blockade markedly reduces retinal microglia/macrophage infiltration into laser-induced CNV. *PLoS One.* 2013;8(8):e71808.
16. Wickremasinghe SS1, Xie J, Lim J, Chauhan DS, Robman L, Richardson AJ, et al. Variants in the APOE gene are associated with improved outcome after anti-VEGF treatment for neovascular AMD. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011; 52(7):4072-9.
17. Donix M, Ercoli LM, Siddarth P, Brown JA, Martin-Harris L, Burggren AC, et al. Influence of Alzheimer disease family history and genetic risk on cognitive performance in healthy middle-aged and older people. *Am J Geriatr Psychiatry.* 2012;20(7):565-73.
18. Santos RV, Fry PH, Monteiro S, Maio MC, Rodrigues JC, Bastos-Rodrigues L, et al. Color, race, and genomic ancestry in Brazil: dialogues between anthropology and genetics. *Curr Anthropol.* 2009;50(3):787-819.
19. Thakkinstian A1, Bowe S, McEvoy M, Smith W, Attia J: Association between apolipoprotein E polymorphisms and age-related macular degeneration: A HuGE review and meta-analysis. *Am J Epidemiol* 2006;164(9):813-22.
20. 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.
21. 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; 15;16 Spec No. 2:R174-82.
22. Reynolds R, Rosner B, Seddon JM. Serum lipid biomarkers and hepatic lipase gene associations with age-related macular degeneration. *Ophthalmology.* 2010; 117(10):1989-95.
23. Chakravarthy U, Wong TY, Fletcher A, Piau E, Evans C, Zlateva G, et al. Clinical risk factors for age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. *BMC Ophthalmol.* 2010;13;10:31.
24. Butt AL, Lee ET, Klein R, Russell D, Ogola G, Warn A, et al. Prevalence and risks factors of age-related macular degeneration in Oklahoma Indians: the Vision Keepers Study. *Ophthalmology.* 2011;118(7):1380-5.
25. Moeller SM, Parekh N, Tinker L, Ritenbaugh C, Blodi B, Wallace RB, et al. Associations between intermediate age-related macular degeneration and lutein and zeaxanthin in the Carotenoids in Age-related Eye Disease Study (CAREDS):

- ancillary study of the Women's Health Initiative. *Arch Ophthalmol.* 2006; 124(8):1151-62.
26. Trieschmann M, Beatty S, Nolan JM, Hense HW, Heimes B, Austermann U, et al. Changes in macular pigment optical density and serum concentrations of its constituent carotenoids following supplemental lutein and zeaxanthin: the LUNA study. *Exp Eye Res.* 2007;84(4):718-28.
 27. Kijlstra A, Tian Y, Kelly ER, Berendschot TT. Lutein: more than just a filter for blue light. *Prog Retin Eye Res.* 2012;31(4):303-15.
 28. Curcio CA, Johnson M, Rudolf M, Huang JD: The oil spill in ageing Bruch membrane. *Br J Ophthalmol.* 2011;95(12):1638-45.
 29. Ulas F, Balbaba M, Ozmen S, Celebi S, Dogan U. Association of dehydroepiandrosterone sulfate, serum lipids, C-reactive protein and body mass index with age-related macular degeneration. *Int Ophthalmol.* 2013;33(5) 485-91.
 30. Rohn TT, Day RJ, Catlin LW, Brown RJ, Rajic AJ, Poon WW. Immunolocalization of an amino-terminal fragment of apolipoprotein E in the Pick's disease brain. *PLoS One.* 2013;8(12):e80180.