



MARIANA BORGES OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES IL1A, IL1B e TNFA EM
PACIENTES COM GLAUCOMA PRIMÁRIO DE ÂNGULO ABERTO**

CAMPINAS

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

Mariana Borges Oliveira

**AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES *IL1A*, *IL1B* e *TNFA* EM
PACIENTES COM GLAUCOMA PRIMÁRIO DE ÂNGULO ABERTO**

Orientadora: Profa. Dra. Mônica Barbosa de Melo

Co-orientador: Prof. Dr. José Paulo Cabral de Vasconcellos

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP - para obtenção do título de Mestra em Ciências Médicas, área de concentração em Oftalmologia.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA
DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA MARIANA BORGES
OLIVEIRA.

Assinatura do Orientador

Campinas, 2014

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

OL4a Oliveira, Mariana Borges, 1978-
Associação de polimorfismos nos genes IL1A, IL1B e TNFA em pacientes portadores de glaucoma primário de ângulo aberto / Mariana Borges Oliveira. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

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

1. Glaucoma. 2. Genética médica. 3. Inflamação. 4. Disco Óptico. 5. Malha trabecular. I. Melo, Mônica Barbosa de. II. Vasconcellos, José Paulo Cabral de. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Association of IL1A, IL1B and TNFA gene polymorphisms in primary open angle glaucoma patients

Palavras-chave em inglês:

Glaucoma
Genetics, Medical
Inflammation
Optic disc
Trabecular meshwork

Área de concentração: Oftalmologia

Titulação: Mestra em Ciências Médicas

Banca examinadora:

Mônica Barbosa de Melo [Orientador]
Sebastião Cronemberger Sobrinho
Vera Lúcia Gil da Silva Lopes

Data de defesa: 27-01-2014

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

MARIANA BORGES OLIVEIRA

Orientador (a) PROF(A). DR(A). MONICA BARBOSA DE MELO

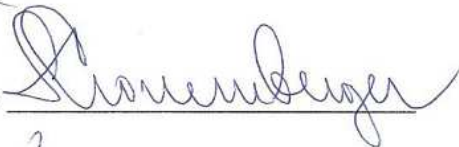
CoOrientador(a) PROF(A). DR(A). JOSÉ PAULO CABRAL DE VASCONCELLOS

MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). MONICA BARBOSA DE MELO



2. PROF(A). DR(A). SEBASTIÃO CRONEMBERGER SOBRINHO



3. PROF(A). DR(A). VERA LUCIA GIL DA SILVA LOPES



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

Data: 27 de janeiro de 2014

Aos meus pais, Tania e Dário, meus irmãos, meus padrinhos, Ana Maria e Filipe e meus primos-irmãos, por serem minha referência, meu refúgio e meu amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

À Profª. Dra. Mônica Barbosa de Melo e ao Prof. Dr. José Paulo Cabral de Vasconcellos. Não tenho palavras pra descrever o quanto sou grata. São muito mais que orientadores e estão além das contribuições para esse trabalho. São meus exemplos de dedicação, amizade, respeito, de amor ao próximo e ao trabalho.

Ao Prof. Dr. Vital Paulino, pelas valiosas contribuições durante a realização deste trabalho e no aprendizado da oftalmologia e pesquisa.

Ao Prof. Dr. Riuitiro Yamane, por encorajar e estimular o desenvolvimento da ciência e da oftalmologia, pela confiança e apoio.

Aos amigos. São muito especiais.

Às amigas Daniela Stancato e à Galina, que estão incluídas acima, mas tornaram possível a minha chegada até aqui. Minha eterna gratidão.

Ao Dr. Castelo Branco, pelo suporte.

À vida, por me mostrar que nem todas as pessoas são boas e verdadeiras.

À minha família. “Só se vê bem com o coração, o essencial é invisível aos olhos”.
Antoine de Saint-Exupéry.

Aos pacientes, uma das razões da minha existência.

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

*I'm bulletproof, nothing to lose
Fire away, fire away
Ricochet, you take your aim
Fire away, fire away
You shoot me down but I won't fall
I am titanium
You shoot me down but I won't fall
I am titanium*

**“O acaso vai me proteger
Enquanto eu andar distraído...”**

(Sergio Britto)

RESUMO

O glaucoma engloba um grupo de doenças que têm como característica comum a atrofia progressiva do disco óptico com alteração correspondente de campo visual, decorrente da perda de células ganglionares da retina. O aumento da pressão intraocular (PIO) é o principal fator de risco para o desenvolvimento do glaucoma, mas tem sido sugerida a existência de outros aspectos relevantes, tais como alterações no metabolismo do óxido nítrico, na regulação do fluxo vascular, sinais de estresse oxidativo e alterações no sistema imunológico. O glaucoma primário de ângulo aberto (GPAA), a forma mais prevalente entre os glaucomas, está associado a uma série de fatores de risco para sua instalação e desenvolvimento, além da PIO. Os demais fatores de risco são: idade (relação direta), raça (mais frequente e grave em indivíduos da raça negra), miopia e história familiar de glaucoma. A maioria dos casos de GPAA apresenta um padrão complexo de hereditariedade, em que variantes de suscetibilidade contribuem para a gravidade da doença. O objetivo deste estudo do tipo caso-controle foi avaliar o papel de polimorfismos nos genes da interleucina alfa (IL1A), interleucina beta (IL1B) e fator de necrose tumoral alfa (TNFA) em relação à suscetibilidade ao GPAA. Após avaliação oftalmológica, foram recrutados 214 indivíduos não relacionados portadores de GPAA. A análise molecular foi realizada por meio de técnicas de PCR e sequenciamento direto. Neste estudo observou-se que o alelo C do polimorfismo -31 C/T, presente na região promotora do gene *IL1B*, confere risco para o glaucoma ($p=0,002$). Este alelo está contido em um “TATA” box, influenciando na transcrição deste gene. Existe um desequilíbrio de ligação entre os SNPs -31 C/T e -511 T/C do gene *IL1B* e este último também está associado a um risco aumentado para o glaucoma ($p=0,006$). Com relação aos demais SNPs estudados (+3954 C/T do gene *IL1B*, -889 C/T e +4845 G/T do gene

IL1A e -238 G/A e -308 G/A do gene *TNFA*), não houve associação com o glaucoma. Este estudo sugere que há relação das variantes “C” do SNP -31 C/T e “T” do SNP -511 T/C do gene *IL1B* com a etiologia do GPAA em uma amostra da população brasileira.

ABSTRACT

Glaucoma comprises a group of diseases characterized by progressive atrophy of the optic disc and corresponding visual field loss, as consequence of retinal ganglion cells death. Augmented intraocular pressure (IOP) is the main risk factor for glaucoma development, but it has been suggested that there are other relevant aspects that may lead to neuronal and trabecular meshwork (TM) damage and contribute to the development of glaucoma, including alterations in nitric oxide metabolism, oxidative stress and vascular and immune system dysregulations. Primary open angle glaucoma (POAG), the most prevalent form of glaucoma, is associated with several risk factors to its initiation and progression besides IOP. The additional risk factors are: age (direct correlation), race (more frequent in black subjects), myopia and family history of glaucoma. The majority of POAG cases presents a complex pattern of heritability, in which susceptibility variants contribute to disease severity. The aim of this case-control study was to evaluate the role of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the interleukin alpha (*IL1A*), interleukin beta (*IL1B*) and tumor necrosis factor alpha (*TNFA*) genes in relation to POAG susceptibility. After ophthalmologic evaluation, 214 unrelated subjects with POAG were recruited. The molecular analysis was performed by PCR and direct sequencing techniques. In this study it was observed that the C allele of the -31 C/T promoter polymorphism of the *IL1B* gene confers risk for glaucoma (p=0.002). This allele disrupts a “TATA” box, influencing the transcription of the *IL1B* gene. There is linkage disequilibrium between the -31 C/T e -511 T/C SNPs, and the latter is also associated with an increased risk for glaucoma (p=0.006). Regarding the others studied SNPs (+3954 C/T of the *IL1B* gene, -889 C/T and +4845 G/T of the *IL1A* gene and -238 G/A and -308 G/A of the *TNFA* gene), there is no association with glaucoma. This

study suggests the relationship of the “C” variant of -31C/T and “T” variant of -511T/C of *IL1B* gene with POAG etiology in a sample of the Brazilian population.

SUMÁRIO

PÁG.

LISTA DE FIGURAS.....	xv
LISTA DE TABELAS.....	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xviii
1- INTRODUÇÃO.....	23
1.1- Revisão da literatura.....	23
1.1.1- Glaucoma.....	23
1.1.2- Classificação do Glaucoma.....	24
1.1.3- Epidemiologia do Glaucoma.....	26
1.1.4- Glaucoma Primário de Ângulo Aberto.....	27
1.1.5- Fatores de risco para o glaucoma.....	28
1.1.5-1. Importância da pressão intraocular como fator de risco para o glaucoma.....	29
1.1.5-2. Importância da história familiar como fator de risco para o glaucoma.....	30
1.1.6- Conceitos Genéticos.....	31
1.1.7- Genética do Glaucoma.....	34
1.1.8- Associação entre polimorfismos nos genes IL1A, IL1B e TNFA na suscetibilidade ao glaucoma.....	37
1.1.8-1. Os genes IL1A e IL1B.....	38
1.1.8-2. O gene <i>TNFA</i>	39
1.2. Justificativa.....	44
2- OBJETIVOS.....	46
3- CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	47
3.1- Casuística.....	47
3.1.1 - Pacientes.....	47
3.1.2 - Grupo caso - Critérios de inclusão.....	47
3.1.2 - Grupo caso - Critérios de exclusão.....	48
3.1.4- Grupo Controle – Critérios de Inclusão.....	48

3.1.4- Grupo Controle – Critérios de Exclusão.....	49
3.2- Métodos.....	49
3.2.1 - Exame Oftalmológico.....	49
3.2.2 - Obtenção das amostras de sangue e extração de DNA.....	50
3.7.1- Reação em Cadeia da Polimerase.....	50
3.7.2 - Sequenciamento Automático.....	52
3.7.2 – Análise Estatística.....	53
4- RESULTADOS.....	55
4.1- Pacientes.....	55
4.2 – Distribuição de lelos e genótipos.....	56
4.2.1- IL1A.....	56
4.1.2- IL1B.....	59
4.1.3- TNFA.....	66
5- DISCUSSÃO.....	69
6- CONCLUSÕES.....	77
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78
8 - FONTES CONSULTADAS.....	89
Anexo 1 (Termo de consentimento livre e esclarecido).....	90
Anexo 2 (Parecer Técnico do Comitê de Ética).....	93
Anexo 3 (Extração de DNA a partir de sangue periférico).....	95
Anexo 4 (Purificação da reação de sequenciamento).....	97

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Em A, está representado um disco óptico com escavação aumentada, decorrente da morte das células ganglionares da retina. Em B está representado o campo visual correspondente, com perda visual periférica e ilhas de visão central e temporal. Em C está representado um disco óptico intacto. Em D, está representado um campo visual normal, com mancha cega a 15o temporalmente da área de fixação. (modificado de Janssen et al., 2013).

Figura 2 - Glaucoma contínuo. O glaucoma inicia-se como doença não detectável, com alterações em nível celular. Conforme a ocorre perda axonal, a doença passa por um período assintomático, porém detectável pelos métodos diagnósticos disponíveis; Finalmente ocorre o prejuízo funcional em estágios mais avançados, podendo levar a cegueira. CV = campo visual. (Choplin, 2007; Weinreb et al., 2004).

Figura 3 - Em A, diagrama esquemático das estruturas do seio camerular. Em B imagem vista durante a gonioscopia, mostrando ângulo aberto e observação de todas as estruturas do seio camerular. Imagens expostas em http://sboportal.org.br/rbo_descr.aspx?id=15.

Figura 4 - Organização do cluster da IL1 e localização dos polimorfismos nos genes IL1A, IL1B e IL1RN. As regiões promotoras dos genes e as regiões codificantes estão marcadas em cinza e preto, respectivamente. Modificado de Mookherjee et al., 2010.

Figura 5 - Localização dos polimorfismos no gene TNFA, inserido no complexo de histocompatibilidade de classe III. A região promotoras do gene está detalhada acima, mostrando os SNPs mais comuns já descritos neste gene. Modificado de: Al-Gayyar and Elsherbiny, 2013.

Figura 6 - Representação esquemática do mecanismo de ação do TNF- α e suas vias de transdução de sinal, a partir da ligação ao receptor TNFR1, levando à apoptose, e ao receptor TNFR2, determinando neuroproteção em CGRs. Modificado de: Al-Gayyar and Elsherbiny, 2013.

Figura 7 - Representação do sequenciamento direto do polimorfismo -889C/T no gene IL1A. Em A, a seta indica o alelo selvagem C, em homozigose, em B alelos C e T em heterozigose e em C o alelo T em homozigose.

Figura 8 - Representação do sequenciamento direto do polimorfismo +4845G/T no gene IL1A. Em A, a seta indica o alelo selvagem G, em homozigose, em B alelos G e T em heterozigose e em C o alelo T em homozigose.

Figura 9 - Representação do sequenciamento direto do polimorfismo -31C/T no gene IL1B. Em A, a seta indica o alelo selvagem C, em homozigose, em B alelos C e T em heterozigose e em C o alelo T em homozigose.

Figura 10 - Representação do sequenciamento direto do polimorfismo -511C/T no gene IL1B. Em A, a seta indica o alelo selvagem C, em homozigose, em B alelos C e T em heterozigose e em C o alelo T em homozigose.

Figura 11 - Representação do sequenciamento direto do polimorfismo +3954C/T no gene IL1B. Em A, a seta indica o alelo selvagem C, em homozigose, em B alelos C e T em heterozigose e em C o alelo T em homozigose.

Figura 12 - Estrutura haplotípica dos SNPs nos genes *IL1A* and *IL1B*. O desequilíbrio de ligação (LD) foi estimado calculando-se D' e r^2 , baseado na D' entre os marcadores de 0,80 e $r^2 > 0,80$. A imagem foi gerada pelo programa Haploview 4.2.

Figura 13 - Representação do sequenciamento direto do polimorfismo -238G/A no gene TNFA. Em A, a seta indica o alelo selvagem G, em homozigose, em B alelos G e A em heterozigose e em C o alelo A em homozigose.

Figura 14 - Representação do sequenciamento direto do polimorfismo -308G/A no gene TNFA. Em A, a seta indica o alelo selvagem G, em homozigose, em B alelos G e A em heterozigose e em C o alelo A em homozigose.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - *Loci* gênicos associados ao GPAA.

Tabela 2 - Sequências de oligonucleotídeos utilizados como “primers” na reação em cadeia da polimerase (PCR), tamanho do fragmento e temperatura de anelamento.

Tabela 3 - Características Clínicas e demográficas dos indivíduos do estudo

Tabela 4 - Frequência genotípica e alélica dos polimorfismos da *IL1A* em uma amostra da população brasileira

Tabela 5 - Frequência genotípica e alélica dos polimorfismos do gene *IL1B* numa amostra da população Brasileira de indivíduos glaucomatosos e saudáveis.

Tabela 6 - Frequência of haplótipos do IL1B com valores de qui-quadrado e p-valor

Tabela 7 - Frequência genotípica e alélica dos polimorfismos do gene TNFA em uma amostra da população brasileira de pacientes glaucoma todos e indivíduos saudáveis

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

®	Marca registrada
°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
AD	Autossômico dominante
APOE	Apolipoprotein E
AR	Autossômico recessivo
ARIC	<i>Atherosclerosis Risk in Communities study</i>
ASB10	<i>Ankyrin repeat and SOCS box containing 10</i>
C/EBP	<i>CCAAT/enhancer-binding protein β</i>
CBMEG	Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética
CGR	Células ganglionares da retina
CYP1B1	Gene citocromo P450, família 1, subfamília B, polipeptídeo 1
D	Direto
DA	Doença de Alzheimer
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
dCTP	Desoxicitosina trifosfato
dGTP	Desoxiguanosina trifosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Didesoxinucleotídeos
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético

ELAM-1	Molécula de adesão de leucócito-endotelial 1
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GCP	Glaucoma congênito primário
GLC1A	Primeiro locus associado ao GPAA
GLC1B	Segundo locus associado ao GPAA
GLC1C	Terceiro locus associado ao GPAA
GLC1D	Quarto locus associado ao GPAA
GLC1E	Quinto locus associado ao GPAA
GLC1F	Sexto locus associado ao GPAA
GLC1G	Sétimo locus associado ao GPAA
GLC1H	Oitavo locus associado ao GPAA
GLC1I	Nono locus associado ao GPAA
GLC1J	Décimo locus associado ao GPAA
GLC1K	Décimo primeiro locus associado ao GPAA
GLC1L	Décimo segundo locus associado ao GPAA
GLC1M	Décimo terceiro locus associado ao GPAA
GLC1N	Décimo quarto locus associado ao GPAA
GLC1O	Décimo quinto locus associado ao GPAA
GLC1P	Décimo sexto locus associado ao GPAA
GPAA	Glaucoma primário de ângulo aberto
GPAA-J	Glaucoma primário de ângulo aberto do tipo juvenil
H2O	Água
HCl	Ácido clorídrico
IL-1	Interleucina 1
IL1A	Gene da interleucina 1 alfa

IL1B	Gene da interleucina 1 beta
IL1RN	Gene do antagonista do receptor do IL-1 β
IL-1α	Interleucina 1-alfa
IL-1β	Interleucina 1-beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-ra	Antagonista do receptor de IL-1 β
kb	Quilobases
KCl	Cloreto de potássio
kDa	Quilodaltons
LD	Desequilíbrio de ligação
M	Molar
mg	Miligrama
MgCl₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mmHg	Milímetro de mercúrio
MMPs	Metaloproteinases de matriz
mRNA	RNA mensageiro
MYOC	Gene Miocilina
NaCl	Cloreto de sódio
NF-kB	Fator nuclear kappa B
NTF4	<i>neutrophin-4</i>
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde

OPTN	<i>Optineurin</i>
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PIO	Pressão intraocular
PIO	Pressão intraocular
pmol	Picomol
POAG	<i>Primary open angle glaucoma</i>
q.s.q.	Quantidade suficiente para
R	Reverso
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
rs	<i>assigned reference SNP</i>
RSB	<i>reaction stop buffer</i>
SASP	<i>Senescence associated secretory phenotype</i>
SA-β-gal	SA-beta-galactosidase
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SITA	<i>Swedish Interactive Threshold Algorithm</i>
SNP	Polimorfismo de base única
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris/Borato/EDTA
TE	Tampão de eluição (Tris/EDTA)
TGF-β2	Fator de crescimento tumoral beta 2
TIGR	<i>Trabecular meshwork glucocorticoid response</i>
TM	Malha trabecular

TNFA	Gene do fator de necrose tumoral alfa
U	Unidades
U/μl	Unidades por microlitro
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
v:v	Relação volume por volume
WDR36	<i>WD repeat domain 36</i>
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
nM	Nanomolar

1. INTRODUÇÃO

1.1 - REVISÃO DA LITERATURA

1.1.1 – Glaucoma

O glaucoma engloba um grupo de doenças que têm como característica comum a atrofia progressiva do disco óptico com alteração correspondente de campo visual, decorrente da perda de células ganglionares da retina (CGR) (Figura 1), cujo principal fator de risco é o aumento da pressão intraocular (PIO) (Shields et al., 1996).

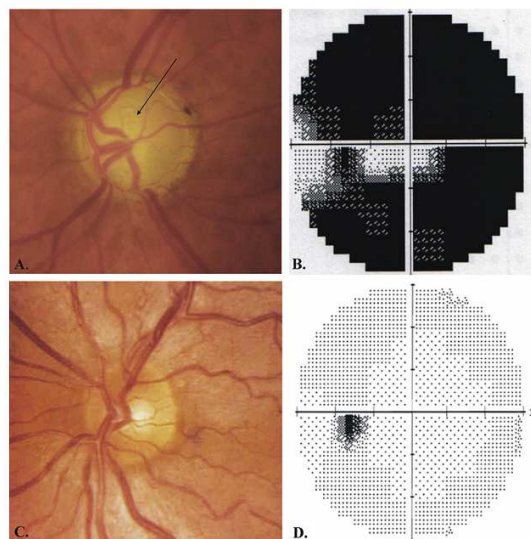


Figura 1. Em A, está representado um disco óptico com escavação aumentada, decorrente da morte das células ganglionares da retina. Em B está representado o campo visual correspondente, com perda visual periférica e ilhas de visão central e temporal. Em C está representado um disco óptico normal. Em D, está representado um campo visual normal, com mancha cega a 15° temporalmente da área de fixação (modificado de Janssen et al., 2013).

Os efeitos da perda de visão no glaucoma são detectados apenas após a perda de cerca 40% dos axônios (Quigley, 1999). Sendo assim, o caráter crônico e assintomático em estágios iniciais da doença tem como consequência diagnósticos tardios, levando à perda irreversível de campo visual e à cegueira. O diagnóstico precoce é fundamental para tentar limitar a baixa visual observada nos estágios mais avançados da doença (Figura 2).

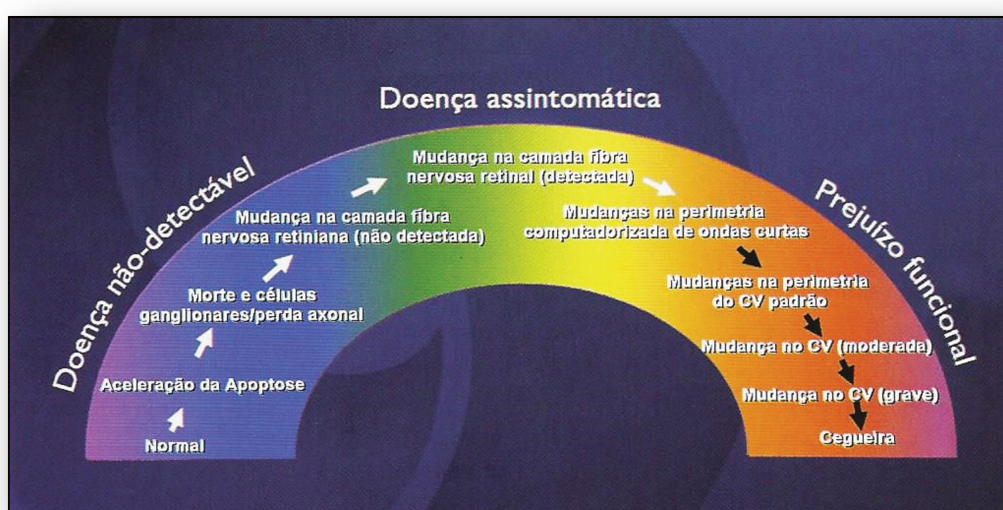


Figura 2. Glaucoma contínuo. O glaucoma inicia-se como doença não detectável, com alterações em nível celular. Conforme a ocorre perda axonal, a doença passa por um período assintomático, porém detectável pelos métodos diagnósticos disponíveis; Finalmente ocorre a perda funcional em estágios mais avançados, podendo levar a cegueira. CV = campo visual. (Choplin, 2007; Weinreb et al., 2004).

1.1.2 – Classificação do Glaucoma

Para a classificação dos glaucomas, consideram-se três aspectos: o fator inicial para o desenvolvimento da lesão glaucomatosa, ou seja, a etiologia, o aspecto anatômico do seio

camerular e a idade de seu aparecimento. Quando a etiologia é desconhecida o glaucoma é denominado primário; se o fator desencadeante do glaucoma pode ser determinado, como por exemplo, trauma ocular, inflamação ou catarata, o glaucoma é denominado secundário. O seio camerular estende-se da linha de Schwalbe até a íris periférica. (Figura 3). De acordo com a observação das estruturas do seio camerular durante a gonioscopia, o glaucoma é classificado em aberto ou fechado (Leske, 1983). Finalmente, o glaucoma pode ser classificado também de acordo com a idade do diagnóstico em congênito (até 3 anos de idade), juvenil (antes de 35 anos de idade) e adulto (acima de 35 anos de idade) (Johnson et al., 1996).

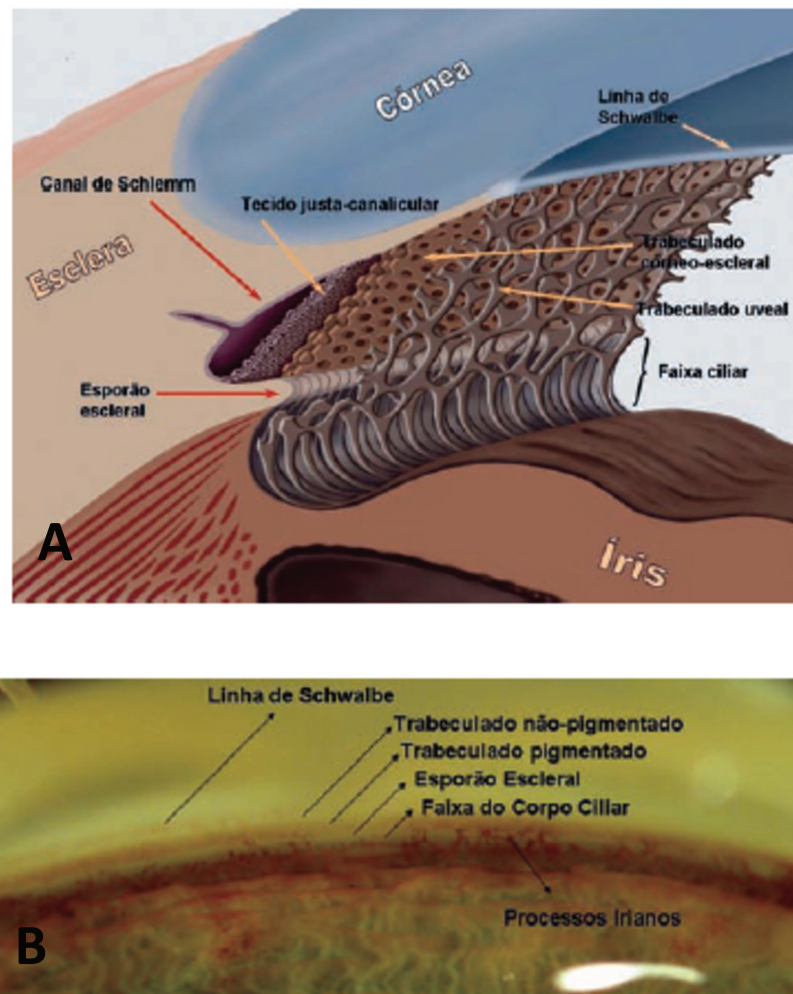


Figura 3. Em A, desenho esquemático das estruturas do seio cameralar. Em B imagem vista durante a gonioscopia, mostrando ângulo aberto e observação de todas as estruturas do seio cameralar. Imagens expostas em http://sboportal.org.br/rbo_descr.aspx?id=15.

1.1.3 – Epidemiologia do Glaucoma

As doenças oculares degenerativas são as principais causas de perda visual na população. De acordo com o boletim da Organização Mundial de Saúde (OMS) publicado

em 2004, a estimativa do número de pessoas com deficiência visual em 2002 foi de 161 milhões, sendo que destas, 37 milhões eram cegos. (Quigley, 1996; Resnikoff et al., 2004). Além disso, a prevalência de cegueira e baixa visão aumentam com a idade, principalmente em indivíduos com mais de 50 anos, faixa etária que corresponde a 82% dos casos de cegueira. Estima-se ainda que haja um aumento de 1 a 2 milhões de cegos a cada ano (West and Sommer, 2001). Considerando as estatísticas, existe uma forte associação entre deficiência visual e envelhecimento da população (Resnikoff et al., 2004).

Estudos recentes estimaram 60,5 milhões de pessoas com diagnóstico de glaucoma primário para o ano de 2010 e 79, 6 milhões para o ano de 2020, resultando em cegueira bilateral em 8,4 e 11,2 milhões de indivíduos, respectivamente (Quigley & Broman, 2006). Outros autores sugeriram que as probabilidades de desenvolvimento de cegueira unilateral e bilateral (definida como acuidade visual menor do que 20/200 e/ou campo visual com 20° de constrição ou menos) por paciente com glaucoma primário de ângulo aberto (GPAA) no decorrer de 15 anos seriam de 27% e 9%, respectivamente. (Hattenhauer et al., 1998). No Brasil, Gullo et al., 1996 avaliaram, retrospectivamente, pacientes atendidos pela primeira vez no Setor de Glaucoma do Hospital das Clínicas da UNICAMP e constataram elevada taxa de cegueira unilateral (51,8%) e bilateral (33,3%). O risco de perda de visão no glaucoma é maior nos indivíduos da raça negra (Sommer et al., 1991), com idade acima de 60 anos (Perkins, 1978) e nos países em desenvolvimento (Thylefors, 1995).

1.1.4 – Glaucoma Primário de Ângulo Aberto (GPAA)

O GPAA recebe esta denominação devido a sua etiologia desconhecida (glaucoma primário) e pelo fato das estruturas do seio camerular serem visíveis ao exame gonioscópico, permitindo acesso do humor aquoso (ângulo aberto) (Leske, 1983). A prevalência do GPAA varia de acordo com a região estudada, com estudos revelando valores de 1 a 5% nos Estados Unidos, 1 a 3% na Europa, 1 a 4% na Ásia e 2 a 3% na Austrália (Quigley and Broman, 2006; Rudnicka et al., 2006). Taxas maiores são encontradas na África, variando aproximadamente de 1% na Nigéria (Murdoch et al., 2001) a 8% em Gana (Ntim-Amponsah et al., 2004).

A informação sobre a incidência de GPAA é mais limitada, cerca de 0,1 a 0,2% por ano nas principais populações européias após cinco anos de acompanhamento (Mukesh et al., 2002) e 0,5% por ano em indivíduos negros acompanhados por nove anos no Barbados Eye Study (Leske et al., 2001). As diferenças encontradas nas incidências entre populações caucasianas e negras estão em acordo com as taxas de prevalências correspondentes.

No Brasil, Sakata et al. (2007) examinaram 1636 indivíduos maiores que 40 anos para avaliar a prevalência de glaucoma em uma população brasileira. Foi observado glaucoma em 3,4% (IC 95% 2,5 – 4,3), GPAA em 2,4% (IC 95% 1,7–3,2), e glaucoma primário de ângulo fechado em 0,7% (IC 95% 0,3–1,1) dos casos. Doze por cento dos indivíduos apresentavam diagnóstico prévio da doença. Cegueira unilateral devido a glaucoma primário foi observada em 7 indivíduos. Negros apresentaram uma taxa maior de cegueira unilateral que brancos (cinco versus dois casos, respectivamente, $p=0,014$).

1.1.5 – Fatores de risco para o glaucoma

O GPAA está associado a uma série de fatores de risco para sua instalação e desenvolvimento. Entre eles, o principal é o aumento da PIO, sendo o único modificável. Os outros fatores de risco são: idade (aumento da prevalência do GPAA com o aumento da idade), raça (mais frequente e geralmente mais grave em indivíduos da raça negra), miopia e história familiar de glaucoma (Leske, 2007; Sommer et al., 1991).

1.1.5.1 – Importância da pressão intraocular como fator de risco para o glaucoma

O glaucoma é uma doença multifatorial na qual a PIO representa um dos componentes envolvidos na fisiopatologia do dano glaucomatoso ao disco óptico. O mecanismo proposto segundo o qual a elevação da PIO leva ao desenvolvimento da lesão glaucomatosa baseia-se na suscetibilidade do disco óptico ao aumento da PIO. A perda de células ganglionares da retina ocorreria por meio de alterações metabólicas causadas pela compressão dos feixes axonais em nível da lâmina cribrosa devido ao seu deslocamento posterior induzido pelo aumento da PIO. Os distúrbios metabólicos secundários a esta compressão incluem a alteração do transporte axonal (anterógrado e retrógrado) de neurotrofinas do colículo superior para o corpo celular das células ganglionares da retina, desencadeando o processo de apoptose nestas células (Quigley, 1999; Quigley et al., 1995).

Entretanto, observa-se que o glaucoma pode surgir a despeito de níveis pressóricos normais e que a PIO elevada não necessariamente causa glaucoma, o que evidencia a existência de outros fatores subjacentes importantes para o desenvolvimento da doença (Anderson, 2003; Armaly et al., 1980; Quigley et al., 1994). Outros aspectos relevantes que podem causar danos à malha trabecular (MT) e ao disco óptico, contribuindo para o

desenvolvimento do glaucoma, incluem alterações no metabolismo do óxido nítrico (Galassi et al., 2004; Nathanson and McKee, 1995), estresse oxidativo (Grieshaber et al., 2007; Liu et al., 2007) e desequilíbrio na regulação do sistema vascular (Grieshaber et al., 2007; Nicolela, 2008; Prünke et al., 1998) e imune (Stasi et al., 2006).

O tratamento indicado para o glaucoma é a diminuição da pressão intraocular, a qual é o fator de risco mais facilmente identificável e modificável.

Esta é obtida por meio de medicação tópica e/ou sistêmica, ou mesmo de procedimento cirúrgico quando o controle clínico é insatisfatório. Deve-se lembrar que o valor seguro da PIO é dependente de uma série de fatores individuais tais como suscetibilidade do nervo óptico, idade, raça, história familiar, espessura corneana e estadiamento da lesão glaucomatosa. No entanto, em casos mais avançados da doença nos quais o tratamento clínico não reduz a PIO para valores seguros, o método mais eficiente de diminuí-la é através de procedimento cirúrgico, particularmente da trabeculectomia (Zalish et al., 2004).

1.1.5.2 – Importância da história familiar como fator de risco para o glaucoma

Estudos com família portadoras de GPAA são consistentes com a existência de um componente genético importante desta doença (Carbonaro et al., 2008; Charlesworth et al., 2010; Klein et al., 2004; van Koolwijk et al., 2007; Pärssinen et al., 2007; Rosenthal and Perkins, 1985). Abordagens têm sido utilizadas para investigar a associação do glaucoma com a história familiar, como a avaliação de parentes de pacientes com GPAA, estudos do tipo caso-controle, estudos observacionais de prevalência e estudos de avaliação de gêmeos. Parentes de primeiro grau de indivíduos afetados tem um aumento de cerca de

9 vezes no risco de desenvolver glaucoma (Wolfs RW et al., 1998). Outro estudo, realizado com 3222 indivíduos Africano-descendentes do *Barbados Eye Study* sem glaucoma foram acompanhados durante 9 anos, mostrando uma incidência de 4,4% de GPAA, com um risco relativo de 2,4 para história familiar de glaucoma (Leske et al., 2008).

O glaucoma é uma doença heterogênea. Sendo assim, o estudo de fenótipos intermediários ou endofenótipos, se torna uma ferramenta importante na pesquisa de genes que contribuem para doenças humanas multifatoriais, visto que eles podem ter uma contribuição genética no fenótipo final resultante da doença. Herdabilidade é a proporção de variação fenotípica numa população que pode ser atribuída à variação genética entre os indivíduos (Sanfilippo et al., 2010). No caso do glaucoma, marcadores quantitativos como a PIO apresentam herdabilidade em estudos de famílias e com gêmeos que variam de 0,29 a 0,50 e para razão escavação-disco de 0,48 a 0,80. (van Koolwijk et al., 2007). Isto é consistente com a hipótese de que a PIO e características anatômicas do disco óptico têm forte influência genética.

1.1.6 – Conceitos Genéticos

A identificação de variantes genéticas que contribuem para o surgimento de uma doença é o escopo central da genética humana. As células somáticas têm 23 pares de cromossomos e na grande maioria dos sítios genômicos, em torno de 99%, a sequência genética é a mesma em ambos os cromossomos homólogos. Sendo assim, cerca de 1% está associada às variantes responsáveis pela diversidade humana, o que inclui susceptibilidade a doenças (LaFramboise, 2009).

Diferentes versões de uma sequência de DNA em um determinado local cromossômico (locus) são chamados de alelos. A coexistência de alelos múltiplos em um locus é chamada de polimorfismo genético. Qualquer sítio no qual existam alelos múltiplos como componentes estáveis da população é, por definição, polimórfico. Um alelo é geralmente definido como polimórfico se ele estiver presente em uma frequência maior que 1% na população (Lewin, 2008).

Existem vários tipos de polimorfismos que podem ser constituídos desde variações como deleções, duplicações, triplicações de centenas a milhares de pares de bases de DNA até alterações de uma ou poucas bases no DNA localizadas entre genes, íntrons, e exons de um determinado gene e em regiões reguladoras. Os polimorfismos de nucleotídeos únicos ou “*Single Nucleotide Polymorphism*” (SNPs) surgem a partir de mudanças em nucleotídeos únicos (A, T, C ou G) de uma determinada sequência de DNA. Para uma variação ser considerada um SNP, sua distribuição deve ocorrer em pelo menos 1% na população, além disso, são mais frequentes que os polimorfismos de microssatélites e estão uniformemente distribuídos por todo o genoma.

Estas variações normalmente não estão associadas a qualquer fenótipo de doença, entretanto, os polimorfismos são elementos-chave na pesquisa e na prática da genética humana pois muitos SNPs, embora não sejam responsáveis por causar uma doença, podem atuar como marcadores genéticos quando estão localizados próximos ao gene associado à doença. De acordo com o projeto HapMap há aproximadamente 10 milhões de SNPs presentes no genoma humano (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>).

Embora os SNPs possam ser usados no mapeamento genético, alguns têm efeito em nível fenotípico, podendo alterar a sequência de aminoácidos de uma proteína ou interferir

na expressão da mesma. Além disso, os SNPs podem contribuir para a variação na intensidade ou na suscetibilidade para determinado fenótipo (Griffiths, 2008).

Quando uma variação genética está associada a uma doença (fenótipo) e esta característica é herdada, o padrão de herança pode ser monogênico (um único gene alterado causa a doença) ou complexo, que envolve mais de um gene, com contribuições menores e possíveis fatores ambientais na determinação etiológica da doença (herança poligênica multifatorial). O padrão monogênico inclui os tipos autossômico dominante (AD), autossômico recessivo (AR), ligado ao sexo (ligado ao X) e mitocondrial. No padrão AD de herança, a presença de um alelo alterado é suficiente para a manifestação do fenótipo, ao passo que no padrão AR, existe a necessidade dos dois alelos estarem modificados para o desenvolvimento da doença. Na herança mitocondrial, a transmissão genética ocorre através do DNA mitocondrial, presente somente nas células germinativas femininas, de modo que nenhum homem afetado transmite a doença (Thompson, 2002).

A determinação exata do padrão de herança é dificultado pela variabilidade da penetrância e expressividade da doença. Penetrância é um conceito que se refere à expressão de um genótipo mutante, aplicado a caracteres dominantes em heterozigose. A penetrância de um alelo mutante pode variar de acordo com a porcentagem de indivíduos portadores deste que manifestem seu fenótipo correspondente. Expressividade corresponde ao grau de severidade de uma doença associada a uma alteração genética. Se uma condição apresentar uma expressividade variável, o fenótipo (manifestação clínica) determinado por esta alteração genética variará em grau de intensidade (leve a intenso), mas sempre presente entre os indivíduos que possuírem o genótipo correspondente (Thompson, 2002).

1.1.7 – Genética do Glaucoma

O glaucoma também pode ser definido como um grupo de neuropatias ópticas cujo padrão de hereditariedade é complexo. Para identificação e classificação de *loci* candidatos que poderiam estar envolvidos com o desenvolvimento do glaucoma, a Organização Mundial do Genoma Humano propôs a sigla “GLC” para os genes associados ao glaucoma. Os números “1”, “2” e “3”, que seguem a sigla geral para os glaucomas, representam ângulo aberto, ângulo fechado e glaucoma congênito, respectivamente. Finalmente, as letras “A”, “B”, “C” e assim por diante, indicam o primeiro e os subsequentes *loci* identificados para determinado tipo de glaucoma (Raymond, 1997). Baseado em estudos de ligação, foram mapeados até o momento 17 *loci* (*GLC1A* a *GLC1Q*) associados ao GPAA e destes, apenas cinco genes foram identificados, os genes *myocilin* (*MYOC/GLC1A*), *optineurin* (*OPTN/GLC1E*), *WD repeat domain 36* (*WDR36/GLC1G*), *neurotrophin-4* (*NTF4/GLC1O*) e *Ankyrin repeat and SOCS Box containing 10* (*ASB10/GLC1F*) (Stone et al., 1997; Rezaie et al., 2002; Monemi et al., 2005; Pasutto et al., 2009; Pasutto et al., 2011) **(Tabela I)**. As variantes descritas para GPAA nos genes *WDR36*, *NTF4* e *ASB10* não foram replicadas em algumas populações (Gemenetzi et al., 2012).

Tabela 1. *Loci* gênicos associados ao GPAA.

Locus	Localização Cromossômica	Gene	Referência
GLC1A	1q24.3-q25.2	<i>MYOC</i>	Sheffield et al., 1993
GLC1B	2cen-q13		Stoilova et al., 1996
GLC1C	3q21-24		Wirtz et al., 1997
GLC1D	8p23		Trifan et al., 1998
GLC1E	10p15-14	<i>OPTN</i>	Sarfarazi et al., 1998; Rezaie et al., 2002
GLC1F	7q35-q36	<i>ASB10</i>	Wirtz et al., 1999
GLC1G	5q22.1	<i>WDR36</i>	Monemi et al., 2005
GLC1H	2p16.3-p15		Suriyapperuma et al., 2007; Lin et al., 2008
GLC1I	15q11-q13		Allingham et al., 2005
GLC1J	9q22		Wiggs et l., 2004
GLC1K	20p12		Wiggs et l., 2004
GLC1L	3p21-p22		Baird et al., 2005
GLC1M	5q22.1-q32		Pang et al., 2006
GLC1N	15q22-q24		Wang et al., 2006
GLC1O	19q13.33	<i>NTF4</i>	Ip et al., 1992; Pasutto et al., 2009
GLC1P	12q14		Fingert et al., 2011
GLC1Q	4q35.1-q35.2		Porter et al., 2011

O primeiro gene associado ao GPAA foi o gene *MYOC*, em 1997, por Stone et al. que encontraram mutações em 3,9% dos pacientes com glaucoma. Posteriormente, diversos estudos relataram a presença de mutações no gene *MYOC* em pacientes glaucomatosos em diferentes populações, representando de 2 a 5% dos casos de GPAA no mundo (Gong et al., 2004).

Mais de 70 mutações no gene *MYOC* já foram relatadas, sendo a Q368X a mais comum em diversas populações estudadas, exceto pelos japoneses (Fingert et al., 1999). Na população indiana, a mutação Q48H mostrou-se predominante em GPAA adulto e juvenil. Algumas mutações também foram identificadas na região promotora do gene, sendo -1000 C>G relatada como a mais frequente com graus variáveis de associação com a doença (Polansky et al., 2003). No Brasil, a frequência de mutações no gene *MYOC* em 28

pacientes com GPAA-J e GPAA-A foi de 35,7% e 3,85% respectivamente. A mutação (Cys433Arg) foi identificada apenas na nossa população por Vasconcellos et al. em 2003, e está associada a um início precoce do glaucoma, PIOs elevadas e necessidade frequente de procedimento cirúrgico.

Mutações no gene *OPTN*, o segundo gene associado ao desenvolvimento do GPAA, foram encontradas na frequência de 16,7% em famílias com GPAA, das quais os afetados pela doença apresentavam, em sua maioria, PIOs normais ou moderadamente elevadas (Rezaie et al., 2002). Posteriormente, outros grupos de pesquisa realizaram busca de mutações no gene *OPTN* em pacientes com GPAA em outras populações, mas as frequências da distribuição de mutações neste gene entre indivíduos glaucomatosos e normais se mostraram similares, exceto pelas alterações E50K e M98K (Libby et al., 2005). A mutação E50K foi associada a uma maior progressão e gravidade da doença (Aung et al., 2005).

Monemi et al. (2005) associaram, pela primeira vez, mutações no gene *WDR36* com o desenvolvimento do GPAA. Outros estudos revelaram a presença de variantes raras encontradas no gene *WDR36* em pacientes com GPAA, sugerindo seu envolvimento na fisiopatologia da doença. (Pasutto et al., 2008; Weisschuh et al., 2005) Contudo, em estudo realizado por Hauser et al. (2006), as variantes encontradas no gene *WDR36* não foram associadas à doença. Porém, a presença destas variantes em indivíduos com maior severidade da doença, levaram os autores a sugerir a possível ação moduladora do gene no fenótipo do glaucoma.

Modelos animais já mostraram que o aumento da PIO pode prejudicar a sinalização das neurotrofinas, levando à morte de células ganglionares da retina (Pease et al., 2000).

Estudos de Pasutto et al. (2009) revelaram que mutações no gene *NTF4* podem prejudicar a sinalização das neurotrofinas no GPAA. Além disso, os autores encontraram em 1,7% dos pacientes glaucomatosos de origem europeia, mutações neste gene, associando-o, portanto, à doença. Entretanto, estudos posteriores mostraram a ausência da associação do gene *NTF4* com o glaucoma em pacientes indianos e caucasianos (Liu et al., 2010; Rao et al., 2010).

Mais recentemente, um novo gene foi associado ao GPAA, o ankyrin repeat and SOCS box containing 10 (ASB10/GLC1F) em um estudo realizado com coortes dos Estados Unidos e da Alemanha, para análise de busca de mutações relacionadas ao desenvolvimento do GPAA, bem como análises funcionais da proteína. (Pasutto et al, 2011) Neste estudo, a variante T255T foi encontrada em uma família com GPAA. Esta variante, presente em região de *splicing*, provavelmente está afetando a formação do RNA mensageiro (mRNA). Adicionalmente, 26 alterações que levam à mudança de aminoácidos foram encontradas em 70 pacientes com GPAA.

1.1.8– Associação entre polimorfismos nos genes *IL1A*, *IL1B* e *TNFA* na suscetibilidade ao glaucoma

Polimorfismos localizados no *cluster* da *IL1*, mais especificamente os SNPs da *IL1A* (-889C/T, rs1800587:C>T, +4845G/T, rs17561G>T), *IL1B* (-31C/T, rs1143627:T>C, -511C/T, rs16944C>T e +3954C/T, rs1143634:C>T) e na região promotora do gene *TNFA* (-238G/A, rs361525:G>A e -308G/A, rs1800629G>A) têm sido investigados em relação ao seu papel na suscetibilidade ao GPAA. Estas variantes alélicas,

principalmente, as localizadas nas regiões promotoras dos genes, tendem a modificar sua expressão, levando a um aumento ou diminuição da proteína em questão. Há poucos estudos, em diferentes populações, que mostraram resultados díspares em relação à presença destes polimorfismos e o maior risco de GPAA (Fan et al., 2010; Lin et al., 2003a, 2003b; Mookherjee et al., 2010; Mossböck et al., 2006; Ray and Mookherjee, 2009; Wang et al., 2006, 2007a, 2007b).

1.1.8.1 – Os genes *IL1A* e *IL1B*

As citocinas inflamatórias são potenciais alvos de interesse, uma vez que as evidências indicam que elas têm um importante papel na patogênese do glaucoma e podem regular a sobrevivência ou morte das CGRs (Tezel and Wax, 2004). Estas também já foram estudadas como genes modificadores ou de suscetibilidade ao glaucoma.

O desenvolvimento do glaucoma envolve alterações teciduais tanto da MT como no disco óptico e retina. A MT tem papel importante na regulação da PIO e de fato foram observadas alterações morfológicas e funcionais em pacientes glaucomatosos, assim como nas células ganglionares da retina e células da glia, incluindo astrócitos, micrógli e oligodendrócitos. Vários mecanismos são propostos para explicar a perda das CGRs no glaucoma. Entre eles está o aumento da PIO que levaria ao estresse mecânico das fibras nervosas (conjunto de axônios das CGR) com privação de fatores neurotróficos, alterações da qualidade e da quantidade do fluxo sanguíneo no disco óptico e na camada de fibras nervosas da retina, degeneração secundária por toxicidade ao glutamato, estresse

oxidativo, disfunção mitocondrial, alterações das células da glia e autoimunidade (Ray and Mookherjee, 2009). Tantas alterações envolvem a participação de múltiplos genes.

A IL1 tem sido amplamente implicada em respostas protetoras e na patogênese do glaucoma nesses tecidos (Wang et al., 2006, 2001, 2003). O *cluster* da IL1 compreende as IL1- α (gene *IL1A*) (OMIM 147760), IL1- β (gene *IL1B*) (OMIM 147720) e o antagonista do receptor de IL1 (gene *IL1RN*) (OMIM 147679). Os genes que as codificam localizam-se no cromossomo 2q14.2, compreendendo uma região de 430 Kb (Nicklin et al., 1994). Na Figura 4 observam-se a organização do *cluster* da IL1 e a localização dos principais polimorfismos investigados na literatura.

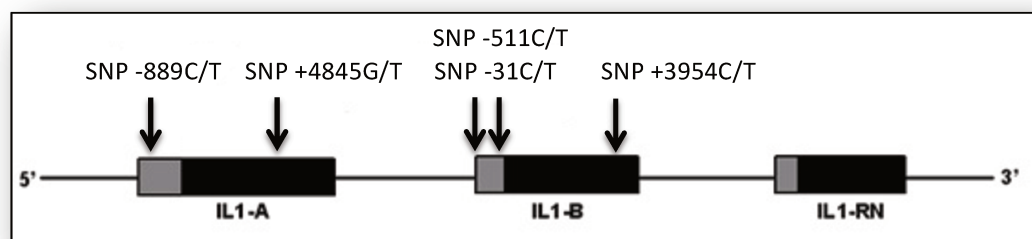


Figura 4. Organização do *cluster* da IL1 e localização dos polimorfismos nos genes *IL1A*, *IL1B* e *IL1RN*. As regiões promotoras dos genes e as regiões codificantes estão marcadas em cinza e preto, respectivamente. Modificado de Mookherjee et al., 2010.

Wang e colaboradores em 2001 observaram uma resposta de estresse específica da via de escoamento do humor aquoso. Demonstrou-se que a molécula de adesão *endothelial leucocyte adhesion molecule* ou ELAM-1, um marcador de placa aterosclerótica na vasculatura, estava presente nas células da MT nas vias de escoamento de olhos com

glaucomas de diferentes etiologias. Determinou-se que a expressão da ELAM-1 é controlada por um *feedback* autócrino da interleucina IL1 através do fator de transcrição NF-kappaB. O grupo demonstrou que a ativação desta via de sinalização protege as células da MT contra o estresse oxidativo (Hall et al., 2004; Kee and Seo, 1997; Wang et al., 2001).

Por outro lado, sugerem-se que exista um componente autoimune na patofisiologia da lesão observada no disco óptico no GPAA, que poderia incluir citocinas como a IL1, envolvidas na resposta imune. Em modelos experimentais de glaucoma a IL1 é induzida localmente e promove lesão do nervo óptico, via aumento da síntese da metaloproteinase de matriz 9 ou MMP-9. Observou-se que a IL1 também estava envolvida no aumento de geração de espécies reativas ao oxigênio (ROS) e na síntese de óxido nítrico, implicadas nas lesões das CGRs, levando à neurodegeneração (Mookherjee et al., 2010; Wang et al., 2006).

Há ainda a similaridade do glaucoma com a Doença de Alzheimer (DA) em relação à neurodegeneração. Shaftel e colaboradores demonstraram que a IL1 leva ao desenvolvimento de depósitos beta-amilóides em pacientes portadores de DA. Essas placas também são observadas nas CGRs de camundongos utilizados como modelo experimental de glaucoma. Tanto a DA como o glaucoma apresentam degeneração neuronal semelhante. Pacientes com DA apresentam alto nível de degeneração axonal do nervo óptico e lesão de células da retina, especialmente as ganglionares (Hinton et al., 1986; Mookherjee et al., 2010; Shaftel et al., 2008).

1.1.8.2 – O gene *TNFA*

O fator de necrose tumoral alfa ou TNF- α é uma outra citocina que tem sido avaliada em relação à fisiopatologia do glaucoma. Esta é uma citocina pró-inflamatória que encontra-se superexpressa em várias desordens neurodegenerativas, que incluem a doença de Alzheimer e em astrócitos, micróglia, oligodendrócitos e nervo óptico de pacientes glaucomatosos. Esta proteína é codificada pelo gene de mesmo nome, localizado no cromossomo 6p21.3, dentro de uma região altamente polimórfica do complexo de histocompatibilidade maior de classe III (OMIM 191160) (Figura 5). O TNF- α exerce suas funções biológicas por meio da interação com dois receptores de membrana: os receptores de TNF- α tipo 1 (TNFR1 ou p55) e o tipo 2 (TNF-R2 ou p75), apresentando respostas completamente diferentes com o mesmo ligante (Figura 6).

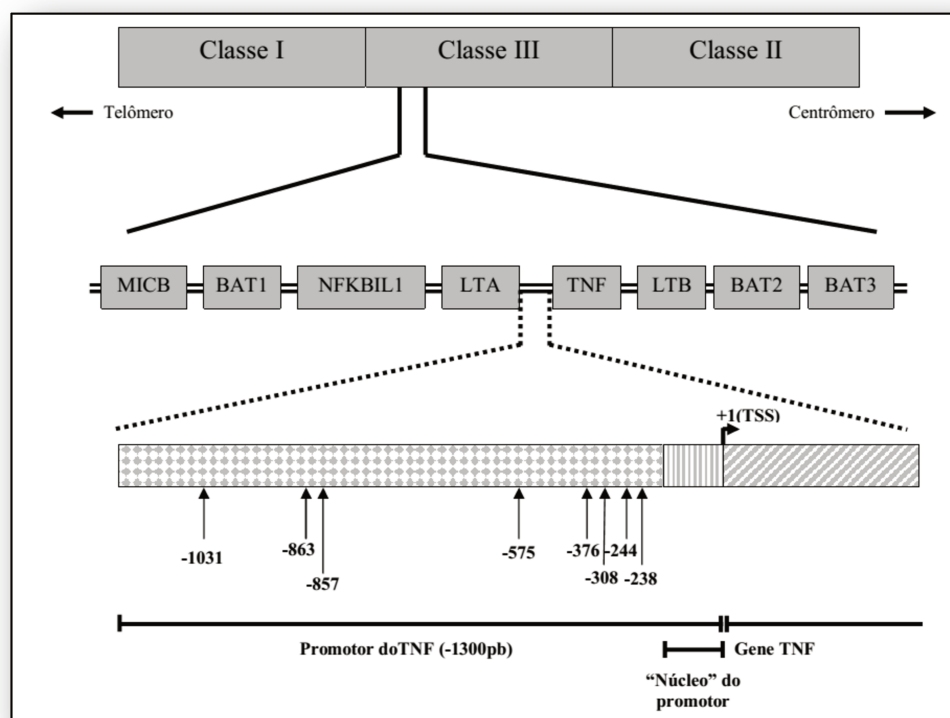


Figura 5. Localização dos polimorfismos no gene *TNFA*, inserido no complexo de histocompatibilidade de classe III. A região promotora do gene está detalhada acima, mostrando os SNPs mais comuns já descritos neste gene. Modificado de: Al-Gayyar and Elsherbiny, 2013.

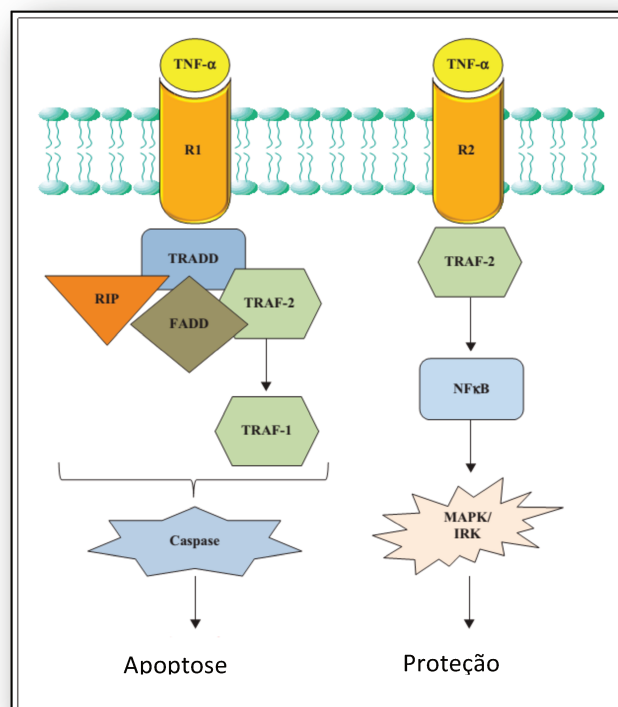


Figura 6. Representação esquemática do mecanismo de ação do TNF- α e suas vias de transdução de sinal, a partir da ligação ao receptor TNFR1, levando à apoptose, e ao receptor TNFR2, determinando neuroproteção em CGRs. Modificado de: Al-Gayyar and Elsherbiny, 2013.

Foi observado que tanto o RNAm como os níveis proteicos do TNF- α e receptor de TNF- α estão aumentados na retina, cabeça do disco óptico e humor aquoso de olhos glaucomatosos quando comparados a olhos normais, sendo sugerido, portanto, que a morte celular mediada pelo TNF- α seja um fator que contribui para a neurodegeneração no glaucoma (Tezel et al., 2001; Xin et al., 2013; Yan et al., 2000; Yuan and Neufeld, 2000, 2001). Além disso, um estudo com cultura de células mostrou que células ganglionares

expostas à pressão hidrostática elevada ou estímulo isquêmico secreta quantidades aumentadas de TNF- α , levando posteriormente à apoptose destas CGRs co-cultivadas. Este efeito foi atenuado por anticorpos contra TNF- α (Tezel and Wax, 2000), fato confirmado em alguns estudos *in vivo*. Entretanto, outro estudo demonstrou proteção mediada pelo TNF- α após axotomia, via TNF-R1 e através do receptor TNF-R2 em um modelo de aumento de PIO. Finalmente, o TNF- α não induz a morte das CGRs em uma cultura mista com outras células da retina, enquanto que em uma cultura pura com CGRs houve claramente apoptose das células com o mesmo estímulo (Fuchs et al., 2005). Isto mostra que o mecanismo que define morte ou sobrevivência das CGRs é complexo e estudos adicionais devem ser realizados para investigar o papel do TNF- α no glaucoma.

O polimorfismo do gene *TNFA* na posição -308 é caracterizado por uma substituição de G para A (-308G/A, rs1800629), o que poderia aumentar a transcrição deste gene em 6 a 7 vezes (Xin et al., 2013). Outros polimorfismos têm sido estudados como o -238G/A (rs361525), -863C/A (rs645836), e -857C/T (rs1799724), porém com resultados inconsistentes (Xin et al., 2013).

1.2 – Justificativa

Conforme mencionado anteriormente, o glaucoma é considerado a segunda maior causa de cegueira mundial, ficando atrás apenas da catarata e, a primeira causa de cegueira irreversível. Portanto, o conhecimento de possíveis variantes de suscetibilidade nos genes *IL1A*, *IL1B* e *TNFA* auxiliariam na condução de diagnósticos mais precoces e no conhecimento da fisiopatologia da lesão glaucomatosa. Finalmente, avaliar na população

brasileira o papel de polimorfismos nesses genes como fator de risco para o GPAA tem sua importância, devido ao fato de existirem poucos estudos e com resultados conflitantes, além da ausência de dados na população brasileira.

2.OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi avaliar a distribuição da frequência dos polimorfismos nos genes *IL1A* (-889C/T, +4845G/A), *IL1B* (-31C/T, -511C/T, +3953C/T) e *TNFA* (-308G/A, -238G/A) em pacientes com GPAA e indivíduos controle na população brasileira.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

3.1.1 – Pacientes

Trata-se de um estudo caso-controle, envolvendo 401 indivíduos, divididos em dois grupos: 214 pacientes com GPAA, atendidos no Ambulatório de Glaucoma, do Hospital de Clínicas da UNICAMP e 187 pacientes avaliados no Serviço de Oftalmologia Geral (SOG), perfazendo o grupo controle.

Os pacientes selecionados para o estudo foram informados sobre os objetivos e métodos da pesquisa, podendo ou não aceitar participar da mesma, sem constrangimento ou modificação de sua assistência médica. O protocolo de pesquisa seguiu os princípios enunciados na Declaração de Helsinque. Todos os participantes do estudo assinaram termo de consentimento livre e esclarecido, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (Anexo 1).

3.1.2 – Grupo caso - Critérios de Inclusão

Os seguintes critérios permitiram a inclusão dos pacientes com glaucoma no estudo:

- Ângulo aberto no exame de gonioscopia, definido como observação de pelo menos 270 graus, sem indentação, da MT pigmentada, com pigmentação da MT até grau 2;
- Lesão característica de disco óptico, definida como a presença de pelo menos dois dos seguintes critérios: razão escavação/disco $>0,6$, perda localizada da rima neural, hemorragia de disco óptico ou assimetria da razão escavação/disco $>0,2$ entre os dois olhos;

- Presença de pelo menos dois exames de campo visual confiáveis revelando perda glaucomatosa característica, definida pelos critérios propostos por Hodapp-Parrish-Anderson (Hodapp et al., 1993): agrupamento de três ou mais pontos não periféricos no gráfico do Pattern Deviation, todos deprimidos a $p < 5\%$, com pelo menos um ponto a $p < 1\%$ ou pior, Glaucoma Hemifield Test Outside Normal Limits e corrected pattern standard deviation (CPSD) ocorrendo em menos de 5% dos exames perimétricos normais;
- Os valores de PIO não foram considerados nos critérios de inclusão, pois os pacientes estavam em uso de medicação anti-glaucomatosa.

3.1.3 – Grupo caso - Critérios de Exclusão

Os pacientes que apresentaram as seguintes características foram excluídos do estudo:

- Pacientes que apresentaram alterações de segmento anterior compatíveis com glaucomas secundários (ou de desenvolvimento) e/ou alterações de disco óptico e campo visual que mimetizassem lesões glaucomatosas;
- Pacientes com glaucoma primário de ângulo fechado;
- Afecções oculares ou sistêmicas de caráter inflamatório ou auto-imune, incluindo uveíte, olho seco grave, diabetes, doenças reumatológicas;

3.1.4 – Grupo Controle – Critérios de inclusão

- Indivíduos acima de 50 anos de idade;
- Razão escavação/disco menor ou igual a 0,6 em ambos os olhos;
- PIOs menores do que 16 mmHg em ambos os olhos.

3.1.5 – Grupo Controle – Critérios de exclusão

- História familiar de glaucoma;
- História familiar de cegueira;
- Afecções oculares ou sistêmicas de caráter inflamatório ou auto-imune incluindo uveíte, olho seco grave, diabetes, doenças reumatológicas.

3.2 – MÉTODOS

3.2.1 – Exame Oftalmológico

Os pacientes pertencentes a ambos os grupos (caso e controle) foram submetidos ao exame oftalmológico abaixo:

- Avaliação da acuidade visual corrigida, medida com a tabela de optotipos de Snellen;
- Biomicroscopia do segmento anterior realizada em lâmpada de fenda Haag-Streit, modelo 900 (Haag Streit, Berna, Suíça);
- Tonometria de aplanção com tonômetro calibrado de Goldmann (modelo R-500 – Haag Streit, Berna Suíça);
- Gonioscopia com lente de Posner (Ocular Instruments Inc., Bellevue, E.U.A.);
- Biomicroscopia de fundo de olho (retina, com a lente 2.2 (Volk Optical Inc., Mentor, E.U.A.) e disco óptico com a lente esférica Volk + 78 dioptrias (Volk Optical Inc., Mentor, E.U.A) após midríase obtida com a instilação de 1 gota de tropicamida 1%;
- Perimetria computadorizada branco no branco realizada no perímetro Humphrey Field Analyzer II, modelo 750, software versão A-10 (Zeiss Humphrey Systems,

Califórnia, E.U.A) estratégia 24.2 SITA Standard. Os indivíduos receberam orientações prévias de como proceder durante a realização do exame.

- Além do exame oftalmológico, foram coletados dados sobre sexo e idade de ambos os grupos.

3.2.2 – Obtenção das amostras de sangue e extração de DNA

Foram obtidos 5 a 10 ml de sangue periférico da veia antecubital de todos os participantes, colocados em frasco estéril contendo EDTA 10% como anticoagulante. As amostras de DNA foram extraídas utilizando a metodologia de fenol/clorofórmio (Sambrook et al., 1989), lise das células com proteinase K (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e precipitação do DNA em etanol absoluto (**Anexo 3**).

3.2.3 – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As regiões que contêm os polimorfismos *IL1A* (-889C/T e +4845G/T), *IL1B* (-31C/T, -511C/T, *IL1B* +3953C/T) e *TNFA* (-308G/A, -238G/A) foram amplificadas com a utilização de *primers* escolhidos a partir das sequências dos genes (OMIM 147760, OMIM 147720 e OMIM 191160, respectivamente). A PCR foi realizada utilizando-se os seguintes reagentes: 0,7 µl de cada iniciador na concentração de 20 pmoles, 5 µl do tampão da enzima 10X (Tris-HCl 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM, gelatina 0,01%), 2,0 µl de MgCl₂ 50 mM, 1 µl da mistura de nucleotídeos 10X (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) e 2 unidades de Taq DNA polimerase (Invitrogen™•Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), somados a 0,5 µg de DNA genômico. As amostras foram amplificadas por meio de aparelho ciclador de temperatura sob condições padronizadas de acordo com a **Tabela 2**.

Ao final da reação, 5 μ L do produto da PCR foram misturados a 1 μ L do tampão de corrida 10X “Blue Juice•Gel Loading Buffer” (Invitrogen™•Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo e visualizados sob iluminação ultra-violeta (UV). Os fragmentos amplificados foram comparados ao marcador de peso molecular “1Kb DNA Ladder” (Invitrogen™•Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e, para a realização da reação de sequenciamento, a concentração do DNA da amostra purificada foi estimada a partir da comparação com a intensidade da banda do marcador de peso e massa molecular “Low DNA Mass Ladder” (Invitrogen™•Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). As imagens foram digitalizadas por meio de equipamento para captura de imagens.

Tabela 2: Sequências de oligonucleotídeos utilizados como “primers” na reação em cadeia da polimerase (PCR), tamanho do fragmento e temperatura de anelamento.

Gene	Polimorfismo	Sequências	Tamanho	TA (°C)
<i>IL1B</i>	+3954 C/T	S 5' - TGTTCTTAGCCACCCCACTC -3' AS 5' - AGCGTGCAGTTCAGTGATCG -3'	239pb	63°C
	-511 C/T	S 5' - GAGCTTATCTCCAGGGTTGC -3' AS 5' - TGGGACAAAGTGAAGACAC -3'	309pb	63°C
	-31 C/T	S 5' - GAGCTTATCTCCAGGGTTGC -3' AS 5' TGAAGAGAATCCCAGAGCAG -3'	410pb	63°C
<i>IL1A</i>	+4845 G/T	S 5' - TCTGCTGACTGGGTGATTTC -3' AS 5' - CATCCTCCCCTCCTTTCATT -3'	379pb	63°C
	-889 C/T	S 5' - ATGGGGGCTTCACTATGTTG -3' AS 5' - GACACACCTTGGGCATATCC -3'	418pb	63°C
<i>TNFA</i>	-308 G/A	S 5' - GCCCCTCCCAGTTCTAGTTC -3' AS 5' - TCATCTGGAGGAAGCGGTAG -3'	319bp	63°C
	-238 G/A	S 5' - GCCCCTCCCAGTTCTAGTTC -3' AS 5' - TCATCTGGAGGAAGCGGTAG -3'	319bp	63°C

bp = pares de *base*; S = sense; AS = Anti-sense; TA = temperatura de anelamento

3.2.4 – Sequenciamento Automático

Para a reação de sequenciamento, adicionou-se a cada poço da placa específica para o sequenciador (96 – *well ultraplate*, Natural, SorensonTM, Sollentuna, Sweden) 1,0 µl do produto da PCR e 1,0 µl do “primer” sense ou anti-sense a ser utilizado na concentração de 5 pmol, completando-se o volume final de 20,0 µl em cada poço da placa com 18,0 µl da mistura, que se segue: 1350,0 µl de água deionizada estéril, 400,0 µl de tampão de sequenciamento 5X e 50,0 µl de *Big Dye* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

As placas foram levadas ao termociclador sob as seguintes condições: ciclo único de 1 minuto e 30 segundos a 96°C, seguido por 24 ciclos de 15 segundos a 96°C, 15 segundos a 50°C e 4 minutos a 60°C. Após essa reação, as amostras foram purificadas a fim de eliminar nucleotídeos não incorporados (Anexo 4).

As amostras foram ressuspensas em 10,0 µl de Formamida Hi-Di (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), desnaturadas por 5 minutos a 96°C, colocadas imediatamente no gelo e submetidas à eletroforese no sequenciador automático “ABI PRISM 3700 Genetic Analyser” (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Foi realizado o alinhamento da sequência de aminoácidos para confirmação da região genômica analisada; as sequências foram submetidas a buscas por similaridade, utilizando-se o “algoritmo de buscas” Blast ([HTTP://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)).

3.2.5 – Análise Estatística

Realizou-se a coleta e análise dos dados epidemiológicos, clínicos, diagnósticos e moleculares dos pacientes. Foi feita a comparação da frequência dos polimorfismos nos genes *IL1A*, *IL1B* e *TNFA* entre os grupos de pacientes com GPAA e controle. Para variáveis quantitativas foi utilizado o teste *t de Student* não pareado ou Mann-whitney (dependendo da distribuição, se gaussiana ou não, respectivamente) e para variáveis qualitativas, o teste qui-quadrado ou o teste exato de *Fisher*. Os valores de *p* foram corrigidos para testes múltiplos pelo método de Bonferroni. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$. O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testado para todos os polimorfismos na amostra avaliada. Os blocos haplotípicos foram estimados segundo

protocolo padrão do programa *Haploview*, versão 4.2, baseado na definição de bloco haplotípico por Gabriel et al., 2002.

4. RESULTADOS

4.1 – Pacientes

Um total de 214 pacientes não-relacionados portadores de GPAA e 187 indivíduos saudáveis foram recrutados para o estudo. As características clínicas e demográficas dos indivíduos incluídos no estudo encontram-se na **Tabela 3**. Não encontramos diferenças estatísticas com relação à idade e gênero entre os grupos estudados. Como esperado, a PIO média e a razão escavação-disco foram significativamente maiores no grupo caso.

Tabela 3: Características clínicas e demográficas dos indivíduos do estudo

	GPAA	Controles	P-valor
Gênero (M/F)%	(47,6/52,4)	(42,5/57,5)	0,314
Idade (média $\pm$ DP)	66,46 $\pm$ 12,80	67,41 $\pm$ 8,97	0,422
Pressão Intraocular (olho com glaucoma mais avançado)			
Faixa	12-60 mmHg	9-16 mmHg	
Média $\pm$ DP	24,39 $\pm$ 8,17	12,19 $\pm$ 1,65	<0,001*
Razão escavação-disco vertical			
Faixa	0,5-1,0	0,1-0,6	
Média $\pm$ DP	0,87 $\pm$ 0,12	0,31 $\pm$ 0,13	<0,001*

M=masculino; F=feminino; DP=desvio padrão; *valores significativos = $p < 0,05$;

4.2 – Distribuição dos alelos e genótipos

As distribuições de alelos e genótipos para os sete polimorfismos são mostrados na **Tabela 4** (*IL1A*), na **Tabela 5** (*IL1B*) e na **Tabela 7** (*TNFA*). A distribuição dos genótipos estava de acordo com equilíbrio de Hardy-Weinberg em todos os grupos para todos os polimorfismos.

4.2.1 – Gene *IL1A*

Não houve diferença estatisticamente significativa entre pacientes glaucomatosos e controles com relação aos polimorfismos -889C/T e +4845G/T do gene *IL1A*. Além disso, na análise de haplótipos foi observado um $D'=0,86$ (medida de associação alélica) (Gabriel et al., 2002) entre os polimorfismos -889C/T e +4845G/T, porém não houve diferença estatisticamente significativa entre casos e controles e não houve formação de bloco haplotípico (Figura 7).

Tabela 4: Frequência genotípica e alélica dos polimorfismos da *IL1A* em uma amostra da população brasileira

<i>Gene</i>	<i>Polimorfismo</i>	<i>GPAA Casos (n,%)</i>	<i>Controles (n,%)</i>	<i>OR (95%CI)</i>	<i>p-valor</i>
<i>IL1A</i>	-889 C/T				
	Genótipos				
	CC	58 (45,67)	72 (51,43)	1	REF
	CT	58 (45,67)	58 (41,43)	1,023 (0,613-1,709)	0,398
	TT	11 (8,66)	10 (7,14)	0,732 (0,291-1,844)	0,507
	CC x (CT+TT)	69 (54,33)	68 (48,57)	0,794 (0,491-1,285)	0,347
	Alelos				
	C	174 (68,50)	202 (72,14)	1	REF
	T	80 (31,50)	78 (27,86)	0,840 (0,579-1,218)	0,358
<i>IL1A</i>	+4845 G/T				
	Genótipos				
	GG	70 (57,38)	64 (56,14)	1	REF
	GT	49 (40,16)	45 (39,47)	1,004 (0,593-1,703)	0,987
	TT	3 (2,46)	5 (4,39)	1,823 (0,419-7,935)	0,418
	GG x (GT+TT)	52 (42,62)	50 (43,86)	1,052 (0,628-1,761)	0,848
	Alelos				
	C	189 (77,46)	173 (75,88)	1	REF
	T	55 (22,54)	55 (24,12)	1,053 (0,678-1,636)	0,685

OR = “odds ratio” (razão de chances); REF = referência; * valor significativo = $p < 0,05$

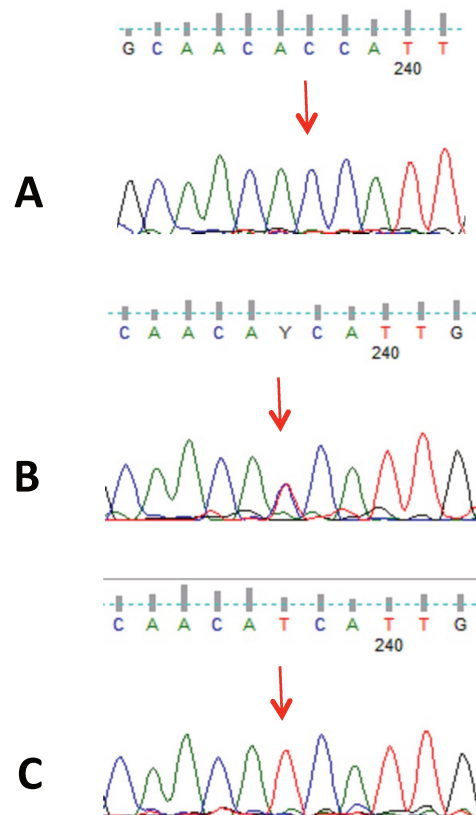


Figura 7. Representação do sequenciamento direto do polimorfismo -889C/T no gene *IL1A*. Em A, a seta indica o alelo selvagem C, em homozigose, em B alelos C e T em heterozigose e em C o alelo T em homozigose.

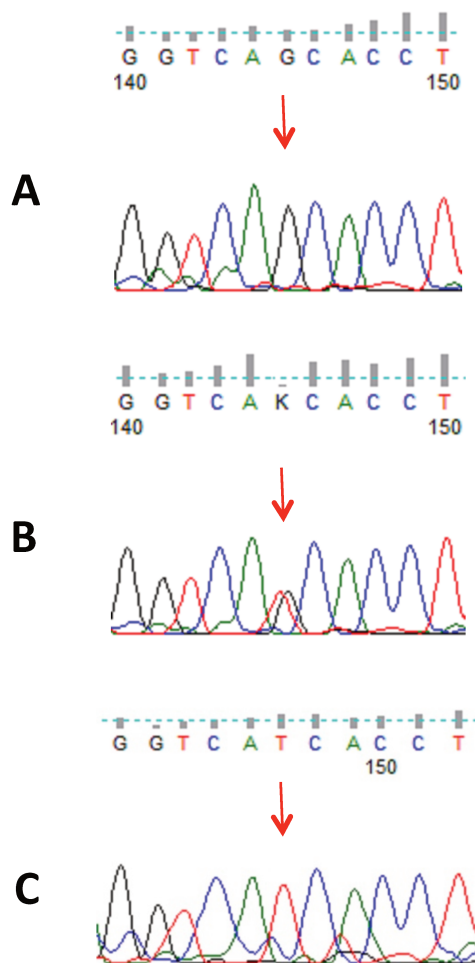


Figura 8. Representação do sequenciamento direto do polimorfismo +4845G/T no gene *IL1A*. Em A, a seta indica o alelo selvagem G, em homozigose, em B alelos G e T em heterozigose e em C o alelo T em homozigose.

4.2.2 – Gene *IL1B*

A combinação dos genótipos CC + CT do polimorfismo -31C/T do gene *IL1B* foi mais frequente em casos do que em controles, quando comparados com o genótipo TT, que foi mais frequente em controles (OR: 1,894; CI-95%: 1,239-2,91; $p=0,003$); o mesmo

ocorre quando comparamos CC x TT (OR: 2,23; CI-95%:1,273-3,945; (p=0,005). A significância foi mantida também quando foi realizada a comparação de alelos, com o alelo C mais frequente entre casos do que em controles (OR: 1,546; CI-95%: 1,168-2,05; p=0,002). O cálculo de poder amostral “pos-hoc” para esta associação foi de 84,3%, considerando um erro alfa de 0,05%. A significância dos p-valores foi mantida após correção para múltiplas comparações (correção de Bonferroni).

Com relação ao polimorfismo -511C/T no gene *IL1B* observou-se que o alelo C foi um fator de risco estatisticamente significativo para o glaucoma (p=0,009; OR:1,49; CI-95%: 1,121-1,983). Esta observação foi mantida com relação ao genótipo quando foi comparado o genótipo CC com o genótipo TT (p=0,005; OR: 2,23; CI-95%: 1,273-3,945). Esta significância foi mantida após a correção por Bonferroni. A comparação entre os genótipos do polimorfismo +3954C/T não mostrou diferença estatística entre casos e controles.

Na análise haplotípica entre os polimorfismos estudados do gene *IL1B*, observou-se um desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos -511C/T e -31C/T ($D'=0.97$). A Figura 8 foi gerada pelo programa Haploview 4.2 (Barrett et al., 2005). O desequilíbrio de ligação (LD) foi estimado de acordo com protocolo padrão e os blocos haplotípicos definidos como proposto por Gabriel et al., 2002. O haplótipo T/C (-31/-511) foi mais frequente em controles, e o haplótipo C/T (-31/-511) em pacientes com GPAA. Esta associação entre haplótipos e glaucoma foi estatisticamente significativa (p-valor = 0.011 e 0.018, respectivamente). Existe também um valor de D' de 0.66 entre os polimorfismos -511C/T e +3954C/T e um $D'=0.65$ entre os polimorfismos -31C/T and +3954C/T, mas não foi observado bloco haplotípico (**Tabela 6**).

Tabela 5: Frequência genotípica e alélica dos polimorfismos do gene *IL1B* em uma amostra da população brasileira de indivíduos glaucomatosos e saudáveis.

<i>Gene</i>	<i>Polimorfismo</i>	<i>Casos GPAA (n. %)</i>	<i>Controles (n. %)</i>	<i>OR (95%CI)</i>	<i>p-valor</i>
<i>IL1B</i>	-31 T/C				
	Genótipos				
	TT	54 (25,23)	73 (39,04)	1	REF
	CT	107 (50)	82 (43,85)	1,761 (1,118-2,784)	0,014*
	CC	53 (24,77)	32 (17,11)	2,23 (1,273-3,945)	0,005*†
	CC+CT	160 (74,76)	114 (60,96)	1,894 (1,239-2,91)	0,003*†
	Alelos				
	T	215 (50,23)	228 (60,96)	1	REF
	C	213 (49,76)	146 (39,04)	1,546 (1,168-2,05)	0,002*†
<i>IL1B</i>	-511 C/T				
	Genótipos				
	CC	59 (27,96)	73 (39,67)	1	REF
	CT	106 (50,24)	85 (46,20)	1,541 (0,986-2,415)	0,056
	TT	46 (21,80)	26 (14,13)	2,181 (1,21-3,976)	0,009*†
	CT+TT	152 (72,04)	111 (82,32)	1,692 (1,11-2,586)	0,014*
	Alelos				
	C	224 (53,08)	231 (62,77)	1	REF
	T	198 (46,92)	137 (37,23)	1,49 (1,121-1,983)	0,006*†
<i>IL1B</i>	+3954 C/T				
	Genótipos				
	CC	83 (66,94)	93 (66,43)	1	REF
	CT	37 (29,84)	41 (29,28)	0,840 (0,579-1,218)	0,967
	TT	4 (3,22)	6 (4,29)	1,339 (0,365-4,908)	0,659
	CT+TT	41 (33,06)	47 (33,57)	1,023 (0,613-1,709)	0,931
	Alelos				
	C	203 (81,85)	227 (81,07)	1	REF
	T	45 (18,15)	53 (18,93)	1,053 (0,678-1,636)	0,8173

OR = “odds ratio” (razão de chances); REF = referência; *p<0,05; †p-valor significativo após ajuste para múltiplas comparações (Bonferroni)

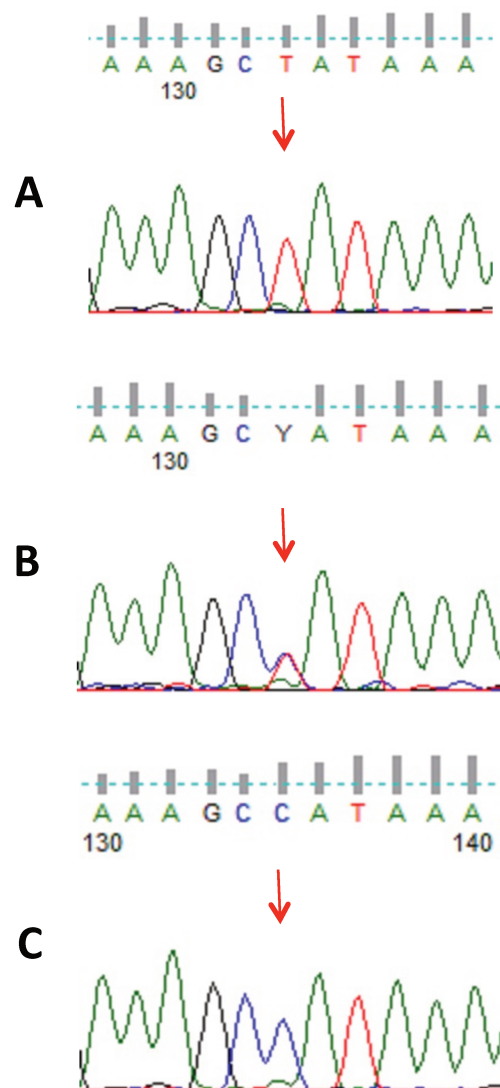


Figura 9. Representação do sequenciamento direto do polimorfismo -31C/T no gene *IL1B*. Em A, a seta indica o alelo selvagem C, em homozigose, em B alelos C e T em heterozigose e em C o alelo T em homozigose.

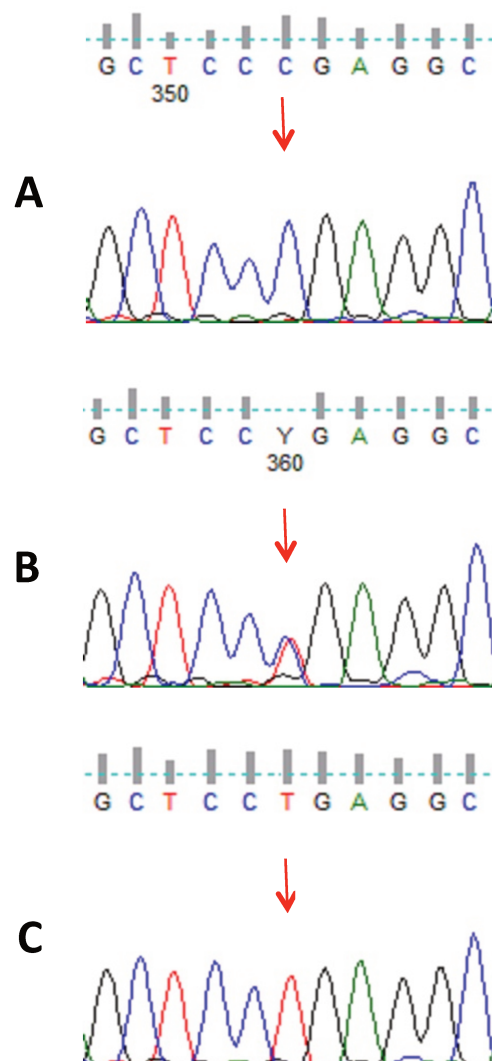


Figura 10. Representação do sequenciamento direto do polimorfismo -511C/T no gene *IL1B*. Em A, a seta indica o alelo selvagem C, em homozigose, em B alelos C e T em heterozigose e em C o alelo T em homozigose.

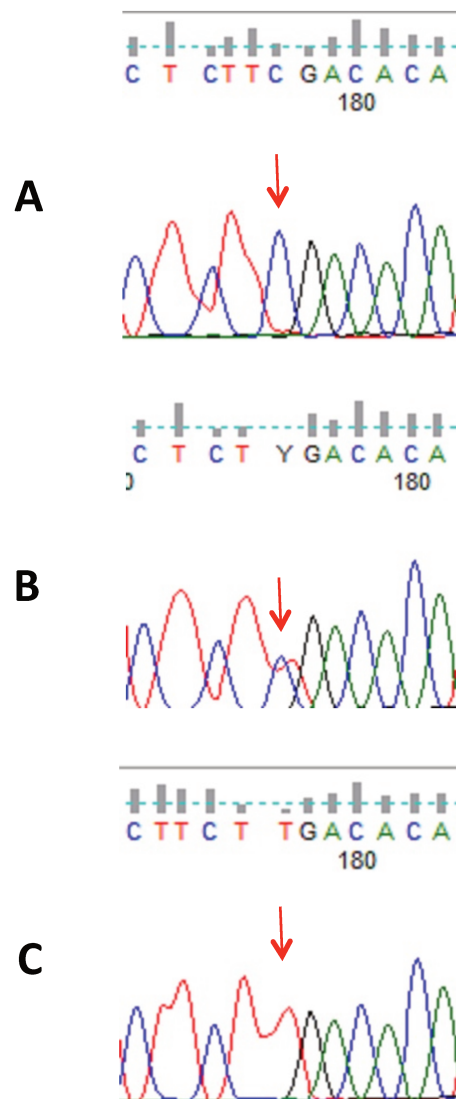


Figura 11. Representação do sequenciamento direto do polimorfismo +3954C/T no gene *IL1B*. Em A, a seta indica o alelo selvagem C, em homozigose, em B alelos C e T em heterozigose e em C o alelo T em homozigose.

Tabela 6: Frequência de haplótipos do gene *IL1B* com valores de qui-quadrado e p-valor

-31 T/C	511C/T	Frequência (casos)	Frequência (controles)	Qui-quadrado	p-valor
T	C	0,493	0,600	6,47	0,011*
C	T	0,468	0,370	5,55	0,019*
C	C	0,035	0,023	0,80	0,371
T	T	0,004	0,008	0,39	0,534

* valor significativo = $p < 0,05$

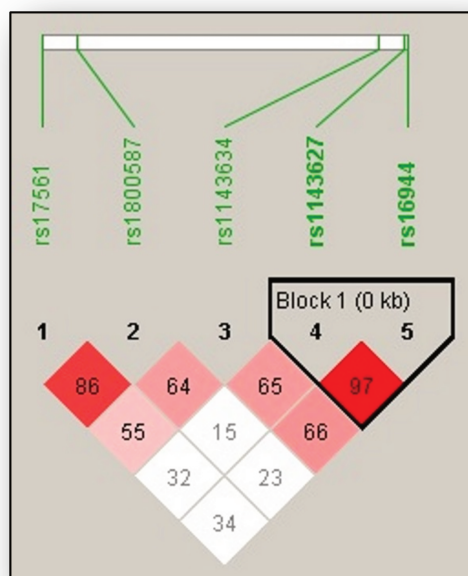


Figura 12: Estrutura haplotípica dos polimorfismos nos genes *IL1A* e *IL1B*. A imagem foi gerada pelo programa Haploview 4.2.

4.2.3 – Gene *TNFA*

Não houve diferença estatisticamente significativa entre pacientes glaucomatosos e controles com relação aos polimorfismos -308G/A e -238G/A do gene *TNFA*.

Tabela 7: Frequência genotípica e alélica dos polimorfismos do gene *TNFA* em uma amostra da população brasileira de pacientes glaucomatosos e indivíduos saudáveis.

<i>Gene</i>	<i>Polimorfismo</i>	<i>Casos GPAA (n,%)</i>	<i>Controles (n,%)</i>	<i>OR (95%CI)</i>	<i>p-valor</i>
<i>TNFA</i>	-238 G/A				
	Genótipos				
	GG	170 (89,01)	153 (91,07)	1	REF
	GA	20 (10,47)	15 (8,93)	0,834 (0,412-1,685)	0,612
	AA	1 (0,52)	- (0)	-	-
	GA+AA	21 (10,99)	15 (8,93)	0,794 (0,395-1,594)	0,516
	Alelos				
	G	360 (68,50)	321 (72,14)	1	REF
	A	22 (31,50)	15 (27,86)	0,765 (0,390- 1,499)	0,434
<i>TNFA</i>	-308 G/A				
	Genótipos				
	GG	154 (81,48)	134 (79,76)	1	REF
	GA	31 (16,40)	32 (19,05)	1,186 (0,688-2,047)	0,539
	AA	4 (2,12)	2 (1,19)	0,576 (0,051-4,089)	0,576
	GA+AA	35 (18,52)	34 (20,24)	1,116 (0,660-1,899)	0,681
	Alelos				
	G	339 (89,68)	300 (89,29)	1	REF
	A	39 (10,32)	36(10,71)	1,053 (0,678-1,636)	0,685

OR = “odds ratio” (razão de chances); REF = referência; * valor significativo = $p < 0,05$;

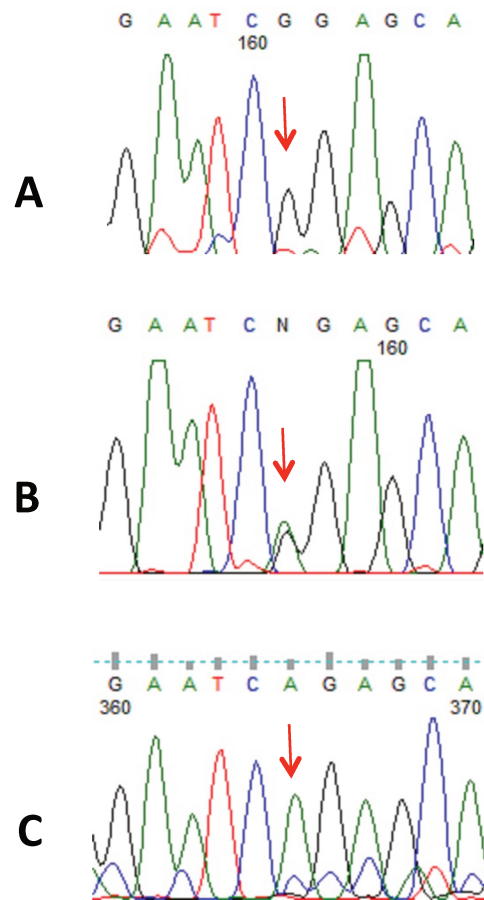


Figura 13. Representação do sequenciamento direto do polimorfismo -238G/A no gene *TNFA*. Em A, a seta indica o alelo selvagem G, em homozigose, em B alelos G e A em heterozigose e em C o alelo A em homozigose.

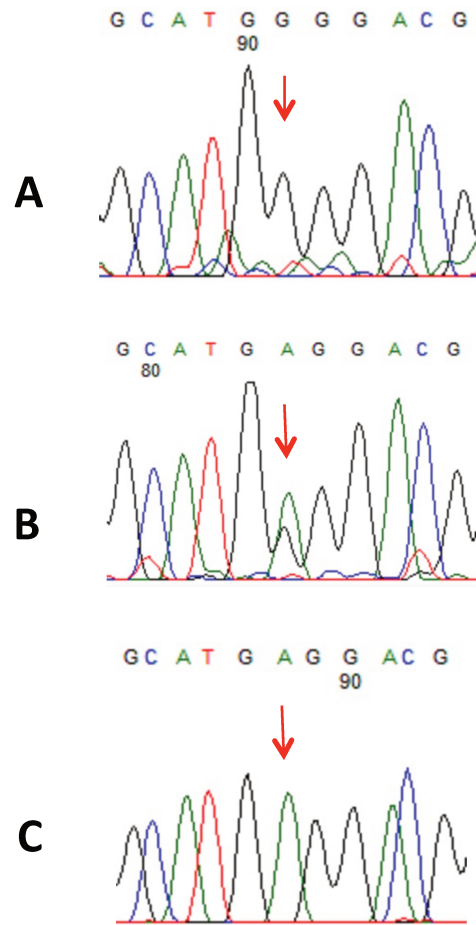


Figura 14. Representação do sequenciamento direto do polimorfismo $-308G/A$ no gene *TNFA*. Em A, a seta indica o alelo selvagem G, em homozigose, em B alelos G e A em heterozigose e em C o alelo A em homozigose.

5. DISCUSSÃO

No glaucoma, as alterações teciduais oculares ocorrem na malha trabecular, no nervo óptico e retina. (Wang et al., 2001) Há evidências de que o sistema imune desempenhe um papel importante na patogenia da degeneração do nervo óptico. No entanto, é importante que haja um balanço entre as vantagens da imunidade protetora e do risco de indução de uma doença neurodegenerativa autoimune, visto que o efeito da imunoregulação pode ser tanto neuroprotetor como neurodestrutivo (Tezel and Wax, 2004).

Sabe-se que a inflamação crônica tem uma função importante no início e/ou progressão de várias doenças relacionadas com a idade, incluindo aterosclerose, doença de Alzheimer, osteoartrite e câncer (Arend, 2002). O envelhecimento é um fenômeno complexo associado com um declínio gradual da função celular e fisiológica, capacidade reduzida de responder ao estresse e aumento da probabilidade de desenvolver doenças degenerativas, como glaucoma. (Beckman and Ames, 1998) De fato, a idade é um importante fator de risco para o desenvolvimento do glaucoma. As alterações relacionadas com a idade aceleram sob influência do estresse oxidativo e com a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), criando um microambiente pró-inflamatório (Ren et al., 2009).

Além disso, a MT de doadores glaucomatosos mostram um aumento na expressão de um marcador bem estabelecido de senescência celular, a SA-beta-galactosidase (SA- β -gal) (Liton et al., 2005), assim como a “up-regulation” de várias proteínas associadas com a resposta inflamatória, em concordância com o processo denominado “inflammaging”. (Li et al., 2007; Liton et al., 2005; Olivieri et al., 2013; Wang et al., 2001). Foi descrito um

“fenótipo secretório associado à senescência” (SASP), caracterizado pela produção de citocinas inflamatórias por células senescentes, tais como IL-6, IL-8, $\alpha\beta$ e a IL-1 α (Coppé et al., 2010; Orjalo et al., 2009).

O conhecimento sobre a função intracelular da IL-1 α não é clara, mas existe uma sequência de sinalização nuclear que permite sua ligação na sequência de DNA e consequentemente estimula a regulação do crescimento celular e a proliferação, indução da senescência e a secreção de citocinas inflamatórias (Werman et al., 2004).

A importância do estudo de polimorfismos de suscetibilidade em doenças neurodegenerativas pode ser exemplificada pela correlação entre o polimorfismo -889C/T e doenças crônicas e degenerativas como a doença de Alzheimer, o que justificaria a sua avaliação em pacientes com glaucoma (Du et al., 2000; Payão et al., 2012).

Estudos prévios com polimorfismos na região promotora da IL-1 α mostraram que o alelo -889T pode ser um fator de risco para o desenvolvimento do glaucoma (Wang et al., 2006) e que o alelo T está associado com um aumento na produção de IL-1 α (Dominici et al., 2002). Outros estudos, incluindo o nosso, não confirmam a associação entre o alelo -889T e o glaucoma (How et al., 2007; Wang et al., 2007b). Estudos anteriores mostraram um forte desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos -899C/T e +4845G/T na IL-1 α (Jouvenne et al., 1999). Neste estudo foi observado um $D' = 0,86$, porém sem a formação de bloco haplotípico. Além disso, não foi encontrada diferença entre casos de GPAA e controles tanto na análise de haplótipos quanto na de polimorfismos, o que, provavelmente, se deve a características genéticas próprias da amostra da população brasileira estudada.

Com relação aos polimorfismos da IL-1 β , as variantes -31C/T e -511C/T foram associados com diversas condições clínicas como câncer gástrico e de pulmão (Landvik et al., 2009), periodontite (Archana et al., 2012) e doenças cardiovasculares (Iacoviello et al., 2005). Estudos prévios mostraram resultados controversos para a associação entre o polimorfismo -511C/T do gene IL1B e glaucoma (Wang et al.; 2007a, Lin et al., 2003_a; How et al., 2007; Markiewicz et al., 2013). Wang et al. compararam 245 indivíduos chineses saudáveis com 231 pacientes com glaucoma de pressão normal (GPN) e não observaram associação entre os polimorfismos -511C/T e +3954C/T e a doença. Similarmente, em uma amostra de população chinesa diferente, de 58 pacientes com GPAA e 105 controles saudáveis, Lin et al. também demonstraram ausência de associação entre -511C/T e glaucoma. Outro estudo realizado por How et al. confirmou estes resultados e descreveu ausência de associação entre -511 C/T, +3954C/T e GPAA. Diferente dos estudos anteriores, Markiewicz et al. encontram uma associação entre a variante -511 C/T e o risco de GPAA, o que está de acordo com o nosso estudo. Foram estudados 255 pacientes com GPAA e 256 controles, numa população caucasiana. (Markiewicz et al., 2013) A ausência de associação observada com o polimorfismo -511 C/T em estudos prévios sugere que o número incluído nestes estudos pode não ter sido suficiente para determinar uma associação estatisticamente significativa ou que a etnia pode ter influenciado esta associação. Como previamente descrito por Rogus et al., a homozigosidade CC do polimorfismo -511 C/T está associada com atividade aumentada da IL-1 β em fluidos teciduais e aumento de produção de IL-1 β por células mononucleares sanguíneas, o que não ocorre com a homozigosidade TT (Rogus et al., 2008). Os heterozigotos dependem de outros polimorfismos num contexto haplotípico para determinar

altos níveis de IL-1 β . A correlação genótipo-fenótipo neste caso não está bem estabelecida.

O polimorfismo -31T/C mostrou uma diferença estatisticamente significativa entre o fenótipo glaucomatoso e indivíduos saudáveis nesta amostra. A variação das características genéticas relacionadas à atividade da região promotora pode ser complexa. Existem múltiplos sítios de ligação de fatores de transcrição, incluindo a C/EBP, o elemento responsivo ao cAPM, o fator nuclear kappa B e o Spi/PU.1 distribuídos na região regulatória do gene *IL1B* (Auron and Webb, 1994). Entre os elementos regulatórios, o alelo “C” do SNP -31C/T interrompe um “TATA” box, afetando a atividade de transcrição do promotor do gene *IL1B*, o que ocasiona uma ligação específica de fatores de transcrição de acordo com o alelo presente (Chen et al., 2006). Esta variação parece afetar a produção de IL-1 β ; existem trabalhos que demonstram uma produção aumentada de IL-1 β na presença do alelo T do SNP -31C/T (El-Omar et al., 2000; Landvik et al., 2009; Wen et al., 2006). Este padrão de expressão também é observado para o SNP -511C/T, uma vez que há um forte desequilíbrio de ligação em uma amostra na população americana de etnia caucasiana (ARIC - Atherosclerosis Risk in Communities study) entre os polimorfismos -31C/T e -511C/T (Rogus et al., 2008; 1989). Portanto, a análise de um único polimorfismo não parece representar da melhor forma a relação genótipo-fenótipo e a atividade biológica da IL-1 parece ser baseada mais em uma estrutura haplotípica que em uma variação de um único polimorfismo (Chen et al., 2006).

Outro polimorfismo que foi descrito por influenciar a produção da proteína IL-1 β foi o +3954C/T (Santtila et al., 1998). O polimorfismo +3954C/T do gene *IL1B* é uma variante sinônima que não muda a sequência de aminoácidos, mas pode, entretanto, levar a

uma inativação do sítio original de processamento. O processamento alternativo resulta em um códon de parada prematuro ou na perda de um exon, o que pode formar uma proteína “truncada”, que provavelmente seria degradada ou funcionalmente inativa (Zhang et al., 2012). A análise do SNP +3954C/T neste estudo não mostrou diferença entre casos e controles. Entretanto, considerando que o haplótipo -31TT/-511CC é um “haplótipo de proteção”, 51,3% dos indivíduos com o “haplótipo de proteção” têm o alelo T do +3954C/T, comparados com 13% dos indivíduos com o “haplótipo de risco” (-31CC/-511TT), mostrando uma tendência de proteção para o alelo T, embora esta comparação não alcance os valores de p significativos. Fini et al. observaram um efeito protetor do alelo T do polimorfismo +3954C/T em pacientes com GPAA de etnia caucasiana, mas não demonstraram associação do polimorfismo -511C/T (Fini et al., 2005). Uma possível explicação é de que a proteção pode indiretamente representar a associação -31C/T, na medida em que trabalhos anteriores já mostraram um desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos +3954C/T e -31C/T (Iacoviello et al., 2005), embora não tenha sido observado bloco haplotípico neste estudo. Uma investigação mais aprofundada é necessária para compreender como estes polimorfismos estão correlacionados estruturalmente e como eles podem influenciar a expressão de IL-1B.

Baseado em estudos prévios, este “haplótipo de proteção” está correlacionado com um aumento na expressão de IL-1 β e a produção elevada de IL-1 pelas células glaucomatosas da MT podem levar a efeitos benéficos no glaucoma. A IL-1 é capaz de aumentar o fluxo de escoamento do humor aquoso pela malha trabecular, e, conseqüentemente, pode levar à redução da PIO (Birke et al., 2011; Kee and Seo, 1997). Também, a produção de metaloproteinases locais (MMPs) à jusante na via de transdução de sinal induzida pela IL-1- pode diminuir a resistência à drenagem, reduzindo a PIO e

protegendo contra o desenvolvimento do glaucoma (Kelley et al., 2007). De fato, quando perfunde-se o segmento anterior humano em cultura com MMP-3, observa-se um aumento no fluxo de escoamento, e quando há bloqueio da IL-1 α este fluxo é novamente reduzido, evidenciando o papel importante da IL-1 no controle do fluxo de escoamento do humor aquoso pela MT. (Bradley et al., 1998) Consequentemente, a reciclagem da matriz extracelular, iniciado por uma ou mais MMPs, parece ser essencial para a manutenção da homeostase em níveis adequados de PIO. Birke et al. mostraram que a redução de PIO provocada pela IL-1 é contrabalanceada pelo TGF- β 2, que está elevado no humor aquoso de pacientes glaucomatosos. (Birke et al., 2011; Inatani et al., 2001) O TGF- β 2 aumenta a síntese e secreção de proteínas de matriz extracelular, como fibronectina, elastina e proteoglicanos, além de diminuir a síntese de enzimas proteolíticas que degradam estas proteínas, causando redução do fluxo de escoamento (Picht et al., 2001).

Outro efeito benéfico da IL-1 observado é que esta citocina pode prevenir a morte celular pela inibição da resposta de apoptose através da via de transdução de sinal do NF- κ B, induzida pelo estresse oxidativo. (Wang et al., 2001). A resposta induzida pelo estresse foi descrita por Wang et al., em que a IL-1 tem um papel central na produção da molécula de adesão endotélio-leucócito 1 (ELAM-1 ou E-selectina). Ela está presente na via de escoamento da MT de diversos tipos de glaucoma, identificada como primeiro marcador molecular do glaucoma humano (Tomarev, 2001). O estresse oxidativo cumulativo é capaz de desencadear uma resposta sustentada ao estresse, levando à produção de EROs na mitocôndria, a indução de IL-1 α , IL-1 β e ELAM-1 e a ativação da via de ativação NF- κ B (Li et al., 2007). Já demonstrou-se que a IL1-alfa pode ter papel na neuroproteção de células da malha trabecular contra o estresse oxidativo e que esta pode fazer parte da resposta autoimune na fisiopatologia da lesão observada no disco óptico no GPAA (Kee e

Seo, 1997; Wang et al, 2006, Mookherjee et al, 2010). O real mecanismo que desequilibra o sistema levando à doença é ainda desconhecido e um maior esforço deve ser realizado com o intuito de explicar o papel da IL-1 no glaucoma.

O TNF-alfa é uma citocina pró-inflamatória com múltiplas funções no sistema imunológico. Vários artigos fornecem evidências de que esta molécula esteja envolvida na etiologia do glaucoma. Foram publicadas duas meta-análises: A primeira em 2012 inclui 7 publicações englobando 1199 casos e 1189 controles e não mostra associação entre o polimorfismo -308G/A (rs1800629) e o glaucoma (Yu and Yao, 2012). A meta-análise publicada por Xin e colaboradores em 2013 compila 14 artigos que avaliaram os polimorfismos -308G/A, -238G/A, -863C/A (rs645836), e -857C/T (rs1799724), totalizando 1182 portadores de GPAA (neste casos de PIO elevada) e 3003 indivíduos controle. Neste estudo, o polimorfismo -308 G/A está significativamente associado com risco de GPAA, sendo que os outros SNPs não mostraram associação (Xin et al., 2013).

Há uma diferença entre esses dois artigos: Yu et al. não subdivide em grupos de glaucoma de PIO elevada e GPN, diferentemente de Xin et al., que associa o polimorfismo -308 G/A com glaucoma de PIO elevada, mas não com GPN. Isto pode indicar que, embora ambos os tipos de glaucoma sejam classificados como GPAA, suas fisiopatologias podem ser diferentes e associadas com variações genéticas distintas. Em nosso estudo não houve associação tanto do SNP -308 G/A quanto do -238G/A com o glaucoma, o que está de acordo com o estudo realizado por Mossböck et al., 2006, em uma população caucasiana de GPAA de PIO elevada, estudo incluído na meta-análise de Xin et al. A não ocorrência de associação pode ser decorrente do tamanho reduzido da amostra.

Este estudo foi realizado para investigar os polimorfismos nos genes *IL1A*, *IL1B* e *TNFA* e sua relação com o glaucoma. Este trabalho é o primeiro, de acordo com o nosso conhecimento, a mostrar a relação entre glaucoma e o polimorfismo -31C/T do gene *IL1B*. De acordo com esse estudo, os indivíduos homozigotos CC para o polimorfismo -31C/T e TT para o polimorfismo -511 C/T no gene *IL1B* estão sob maior risco para o desenvolvimento do glaucoma. Foi demonstrado também que estes SNPs estão em forte desequilíbrio de ligação.

6. CONCLUSÕES

Nesta amostra estudada da população brasileira:

1. O alelo C do polimorfismo funcional -31C/T do gene *IL1B* está significativamente associado com o glaucoma.
2. O alelo T do polimorfismo funcional -511 C/T do gene *IL1B* está significativamente associado com o glaucoma.
3. Existe um forte desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos -31 C/T e o -511 C/T do gene *IL1B*.
4. O haplótipo (-31C/-511T) está significativamente associado com o glaucoma.
4. Os polimorfismos +3954 C/T do gene *IL1B*, -889 C/T e +4845 G/T do gene *IL1A* e o -308G/A e o -238 G/A do gene *TNFA* não mostraram associação com o glaucoma.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson, D.R. (2003). Collaborative normal tension glaucoma study. *Curr. Opin. Ophthalmol.* 14, 86–90.
- Archana, P.M., Salman, A.A., Kumar, T.S.S., Saraswathi, P.K., Panishankar, K.H., and Kumarasamy, P. (2012). Association between interleukin-1 gene polymorphism and severity of chronic periodontitis in a south Indian population group. *J. Indian Soc. Periodontol.* 16, 174–178.
- Arend, W.P. (2002). The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 13, 323–340.
- Armaly, M.F., Krueger, D.E., Maunder, L., Becker, B., Hetherington, J., Jr, Kolker, A.E., Levene, R.Z., Maumenee, A.E., Pollack, I.P., and Shaffer, R.N. (1980). Biostatistical analysis of the collaborative glaucoma study. I. Summary report of the risk factors for glaucomatous visual-field defects. *Arch. Ophthalmol.* 98, 2163–2171.
- Aung, T., Rezaie, T., Okada, K., Viswanathan, A.C., Child, A.H., Brice, G., Bhattacharya, S.S., Lehmann, O.J., Sarfarazi, M., and Hitchings, R.A. (2005). Clinical features and course of patients with glaucoma with the E50K mutation in the optineurin gene. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46, 2816–2822.
- Auron, P.E., and Webb, A.C. (1994). Interleukin-1: a gene expression system regulated at multiple levels. *Eur. Cytokine Netw.* 5, 573–592.
- Barrett, J.C., Fry, B., Maller, J., and Daly, M.J. (2005). Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21, 263–265.
- Beckman, K.B., and Ames, B.N. (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.* 78, 547–581.
- Birke, M.T., Birke, K., Lütjen-Drecoll, E., Schlötzer-Schrehardt, U., and Hammer, C.M. (2011). Cytokine-dependent ELAM-1 induction and concomitant intraocular pressure regulation in porcine anterior eye perfusion culture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52, 468–475.
- Bradley, J.M., Vranka, J., Colvis, C.M., Conger, D.M., Alexander, J.P., Fisk, A.S., Samples, J.R., and Acott, T.S. (1998). Effect of matrix metalloproteinases activity on outflow in perfused human organ culture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 2649–2658.
- Carbonaro, F., Andrew, T., Mackey, D.A., Spector, T.D., and Hammond, C.J. (2008). Heritability of intraocular pressure: a classical twin study. *Br. J. Ophthalmol.* 92, 1125–1128.

Charlesworth, J., Kramer, P.L., Dyer, T., Diego, V., Samples, J.R., Craig, J.E., Mackey, D.A., Hewitt, A.W., Blangero, J., and Wirtz, M.K. (2010). The path to open-angle glaucoma gene discovery: endophenotypic status of intraocular pressure, cup-to-disc ratio, and central corneal thickness. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *51*, 3509–3514.

Chen, H., Wilkins, L.M., Aziz, N., Cannings, C., Wyllie, D.H., Bingle, C., Rogus, J., Beck, J.D., Offenbacher, S., Cork, M.J., et al. (2006). Single nucleotide polymorphisms in the human interleukin-1B gene affect transcription according to haplotype context. *Hum. Mol. Genet.* *15*, 519–529.

Choplin, N.T., and Lundy (2007). *Atlas of glaucoma* (Abingdon, Oxon [England]; Boca Raton, FL: Informa Healthcare ; Distributed in North America by Taylor & Francis).

Coppé, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A., and Campisi, J. (2010). The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* *5*, 99–118.

Dominici, R., Cattaneo, M., Malferrari, G., Archi, D., Mariani, C., Grimaldi, L.M.E., and Biunno, I. (2002). Cloning and functional analysis of the allelic polymorphism in the transcription regulatory region of interleukin-1 alpha. *Immunogenetics* *54*, 82–86.

Du, Y., Dodel, R.C., Eastwood, B.J., Bales, K.R., Gao, F., Lohmüller, F., Müller, U., Kurz, A., Zimmer, R., Evans, R.M., et al. (2000). Association of an interleukin 1 alpha polymorphism with Alzheimer's disease. *Neurology* *55*, 480–483.

El-Omar, E.M., Carrington, M., Chow, W.-H., McColl, K.E.L., Bream, J.H., Young, H.A., Herrera, J., Lissowska, J., Yuan, C.-C., Rothman, N., et al. (2000). Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* *404*, 398–402.

Fan, B.J., Liu, K., Wang, D.Y., Tham, C.C.Y., Tam, P.O.S., Lam, D.S.C., and Pang, C.P. (2010). Association of polymorphisms of tumor necrosis factor and tumor protein p53 with primary open-angle glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *51*, 4110–4116.

Fingert, J.H., Héon, E., Liebmann, J.M., Yamamoto, T., Craig, J.E., Rait, J., Kawase, K., Hoh, S.T., Buys, Y.M., Dickinson, J., et al. (1999). Analysis of myocilin mutations in 1703 glaucoma patients from five different populations. *Hum. Mol. Genet.* *8*, 899–905.

Fini, M., Wang, C.-Y., Farthing-Nayak, P.J., Budenz, D.L., Ventura, L.M., Polk, M., Venkatraman, A., Gorin, M.B., Schuman, J.S., and Miami-Pittsburgh Glaucoma Genetics Group (2005). Polymorphisms in the IL-1 Gene Cluster Associated With Reduced Risk for Primary Open Angle Glaucoma in Caucasians. *ARVO Meet. Abstr.* *46*, 2369.

Fuchs, C., Forster, V., Balse, E., Sahel, J.-A., Picaud, S., and Tessier, L.-H. (2005). Retinal-cell-conditioned medium prevents TNF-alpha-induced apoptosis of purified ganglion cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *46*, 2983–2991.

Gabriel, S.B., Schaffner, S.F., Nguyen, H., Moore, J.M., Roy, J., Blumenstiel, B., Higgins, J., DeFelice, M., Lochner, A., Faggart, M., et al. (2002). The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* *296*, 2225–2229.

- Galassi, F., Renieri, G., Sodi, A., Ucci, F., Vannozzi, L., and Masini, E. (2004). Nitric oxide proxies and ocular perfusion pressure in primary open angle glaucoma. *Br. J. Ophthalmol.* *88*, 757–760.
- Al-Gayyar, M.M., and Elsherbiny, N.M. (2013). Contribution of TNF- α to the development of retinal neurodegenerative disorders. *Eur. Cytokine Netw.* *24*, 27–36.
- Gemenetzi, M., Yang, Y., and Lotery, A.J. (2012). Current concepts on primary open-angle glaucoma genetics: a contribution to disease pathophysiology and future treatment. *Eye* *26*, 355–369.
- Gong, G., Kosoko-Lasaki, O., Haynatzki, G.R., and Wilson, M.R. (2004). Genetic dissection of myocilin glaucoma. *Hum. Mol. Genet.* *13 Spec No 1*, R91–102.
- Grieshaber, M.C., Mozaffarieh, M., and Flammer, J. (2007). What is the link between vascular dysregulation and glaucoma? *Surv. Ophthalmol.* *52 Suppl 2*, S144–154.
- Griffiths, A.J.F. (2008). Introduction to genetic analysis (New York, NY ;[Basingstoke: Freeman).
- Gullo, M.R., Costa, Bernardi, L., and et al (1996). Condições visuais de pacientes glaucomatosos em um hospital universitário. *Arq. Bras. Oftalmol.* *59*, 147–150.
- Hall, S.K., Perregaux, D.G., Gabel, C.A., Woodworth, T., Durham, L.K., Huizinga, T.W.F., Breedveld, F.C., and Seymour, A.B. (2004). Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein. *Arthritis Rheum.* *50*, 1976–1983.
- Hattenhauer, M.G., Johnson, D.H., Ing, H.H., Herman, D.C., Hodge, D.O., Yawn, B.P., Butterfield, L.C., and Gray, D.T. (1998). The probability of blindness from open-angle glaucoma. *Ophthalmology* *105*, 2099–2104.
- Hauser, M.A., Allingham, R.R., Linkroum, K., Wang, J., LaRocque-Abramson, K., Figueiredo, D., Santiago-Turla, C., del Bono, E.A., Haines, J.L., Pericak-Vance, M.A., et al. (2006). Distribution of WDR36 DNA sequence variants in patients with primary open-angle glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *47*, 2542–2546.
- Hinton, D.R., Sadun, A.A., Blanks, J.C., and Miller, C.A. (1986). Optic-nerve degeneration in Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* *315*, 485–487.
- Hodapp, E., Parrish, R.K., and Anderson, D.R. (1993). Clinical decisions in glaucoma (St. Louis, Mo.: Mosby).
- How, A.C.S., Aung, T., Chew, X., Yong, V.H.K., Lim, M.C.C., Lee, K.Y.C., Toh, J.-Y., Li, Y., Liu, J., and Vithana, E.N. (2007). Lack of Association between Interleukin-1 Gene Cluster Polymorphisms and Glaucoma in Chinese Subjects. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *48*, 2123–2126.

- Iacoviello, L., Castelnovo, A.D., Gattone, M., Pezzini, A., Assanelli, D., Lorenzet, R., Zotto, E.D., Colombo, M., Napoleone, E., Amore, C., et al. (2005). Polymorphisms of the Interleukin-1 β Gene Affect the Risk of Myocardial Infarction and Ischemic Stroke at Young Age and the Response of Mononuclear Cells to Stimulation In Vitro. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 222–227.
- Inatani, M., Tanihara, H., Katsuta, H., Honjo, M., Kido, N., and Honda, Y. (2001). Transforming growth factor-beta 2 levels in aqueous humor of glaucomatous eyes. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* Albrecht Von Graefes Arch. Für Klin. Exp. Ophthalmol. 239, 109–113.
- Janssen, S.F., Gorgels, T.G.M.F., Ramdas, W.D., Klaver, C.C.W., van Duijn, C.M., Jansonius, N.M., and Bergen, A.A.B. (2013). The vast complexity of primary open angle glaucoma: disease genes, risks, molecular mechanisms and pathobiology. *Prog. Retin. Eye Res.* 37, 31–67.
- Johnson, A.T., Richards, J.E., Boehnke, M., Stringham, H.M., Herman, S.B., Wong, D.J., and Lichter, P.R. (1996). Clinical phenotype of juvenile-onset primary open-angle glaucoma linked to chromosome 1q. *Ophthalmology* 103, 808–814.
- Jouvenne, P., Chaudhary, A., Buchs, N., Giovine, F.S., Duff, G.W., and Miossec, P. (1999). Possible genetic association between interleukin-1alpha gene polymorphism and the severity of chronic polyarthritis. *Eur. Cytokine Netw.* 10, 33–36.
- Kee, C., and Seo, K. (1997). The effect of interleukin-1alpha on outflow facility in rat eyes. *J. Glaucoma* 6, 246–249.
- Kelley, M.J., Rose, A.Y., Song, K., Chen, Y., Bradley, J.M., Rookhuizen, D., and Acott, T.S. (2007). Synergism of TNF and IL-1 in the induction of matrix metalloproteinase-3 in trabecular meshwork. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48, 2634–2643.
- Klein, B.E.K., Klein, R., and Lee, K.E. (2004). Heritability of risk factors for primary open-angle glaucoma: the Beaver Dam Eye Study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45, 59–62.
- Van Koolwijk, L.M.E., Despriet, D.D.G., van Duijn, C.M., Pardo Cortes, L.M., Vingerling, J.R., Aulchenko, Y.S., Oostra, B.A., Klaver, C.C.W., and Lemij, H.G. (2007). Genetic contributions to glaucoma: heritability of intraocular pressure, retinal nerve fiber layer thickness, and optic disc morphology. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48, 3669–3676.
- LaFramboise, T. (2009). Single nucleotide polymorphism arrays: a decade of biological, computational and technological advances. *Nucleic Acids Res.* 37, 4181–4193.
- Landvik, N.E., Hart, K., Skaug, V., Stangeland, L.B., Haugen, A., and Zienolddiny, S. (2009). A specific interleukin-1B haplotype correlates with high levels of IL1B mRNA in the lung and increased risk of non-small cell lung cancer. *Carcinogenesis* 30, 1186–1192.
- Leske, M.C. (1983). The epidemiology of open-angle glaucoma: a review. *Am. J. Epidemiol.* 118, 166–191.

- Leske, M.C. (2007). Open-angle glaucoma -- an epidemiologic overview. *Ophthalmic Epidemiol.* *14*, 166–172.
- Leske, M.C., Connell, A.M., Wu, S.Y., Nemesure, B., Li, X., Schachat, A., and Hennis, A. (2001). Incidence of open-angle glaucoma: the Barbados Eye Studies. The Barbados Eye Studies Group. *Arch. Ophthalmol.* *119*, 89–95.
- Leske, M.C., Wu, S.-Y., Hennis, A., Honkanen, R., Nemesure, B., and BESs Study Group (2008). Risk factors for incident open-angle glaucoma: the Barbados Eye Studies. *Ophthalmology* *115*, 85–93.
- Lewin, B. (2008). *Genes IX* (Sudbury, Mass.: Jones and Bartlett Publishers).
- Li, G., Luna, C., Liton, P.B., Navarro, I., Epstein, D.L., and Gonzalez, P. (2007). Sustained stress response after oxidative stress in trabecular meshwork cells. *Mol. Vis.* *13*, 2282–2288.
- Libby, R.T., Gould, D.B., Anderson, M.G., and John, S.W.M. (2005). Complex genetics of glaucoma susceptibility. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* *6*, 15–44.
- Lin, H.-J., Tsai, S.-C., Tsai, F.-J., Chen, W.-C., Tsai, J.J.P., and Hsu, C.-D. (2003a). Association of Interleukin 1 β and Receptor Antagonist Gene Polymorphisms with Primary Open-Angle Glaucoma. *Ophthalmologica* *217*, 358–364.
- Lin, H.-J., Tsai, F.-J., Chen, W.-C., Shi, Y.-R., Hsu, Y., and Tsai, S.-W. (2003b). Association of tumour necrosis factor alpha -308 gene polymorphism with primary open-angle glaucoma in Chinese. *Eye Lond. Engl.* *17*, 31–34.
- Liton, P.B., Challa, P., Stinnett, S., Luna, C., Epstein, D.L., and Gonzalez, P. (2005). Cellular senescence in the glaucomatous outflow pathway. *Exp. Gerontol.* *40*, 745–748.
- Liu, Q., Ju, W.-K., Crowston, J.G., Xie, F., Perry, G., Smith, M.A., Lindsey, J.D., and Weinreb, R.N. (2007). Oxidative Stress Is an Early Event in Hydrostatic Pressure–Induced Retinal Ganglion Cell Damage. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *48*, 4580–4589.
- Liu, Y., Liu, W., Crooks, K., Schmidt, S., Allingham, R.R., and Hauser, M.A. (2010). No evidence of association of heterozygous NTF4 mutations in patients with primary open-angle glaucoma. *Am. J. Hum. Genet.* *86*, 498–499; author reply 500.
- Markiewicz, L., Majsterek, I., Przybyłowska, K., Dziki, L., Waszczyk, M., Gacek, M., Kaminska, A., Szaflik, J., and Szaflik, J.P. (2013). The MMP1, MMP9, MMP12, IL-1 β and TIMP1 gene polymorphisms and the risk of primary open-angle glaucoma. *Acta Ophthalmol. (Copenh.)*.
- Monemi, S., Spaeth, G., DaSilva, A., Popinchalk, S., Ilitchev, E., Liebmann, J., Ritch, R., Héon, E., Crick, R.P., Child, A., et al. (2005). Identification of a novel adult-onset primary open-angle glaucoma (POAG) gene on 5q22.1. *Hum. Mol. Genet.* *14*, 725–733.

- Mookherjee, S., Banerjee, D., Chakraborty, S., Banerjee, A., Mukhopadhyay, I., Sen, A., and Ray, K. (2010). Association of IL1A and IL1B loci with primary open angle glaucoma. *BMC Med. Genet.* *11*, 99.
- Mossböck, G., Weger, M., Moray, M., Renner, W., Haller-Schober, E.M., Mattes, D., Schmut, O., Wegscheider, B., and El-Shabrawi, Y. (2006). TNF-alpha promoter polymorphisms and primary open-angle glaucoma. *Eye Lond. Engl.* *20*, 1040–1043.
- Mukesh, B.N., McCarty, C.A., Rait, J.L., and Taylor, H.R. (2002). Five-year incidence of open-angle glaucoma: the visual impairment project. *Ophthalmology* *109*, 1047–1051.
- Murdoch, I.E., Cousens, S.N., Babalola, O.E., Yang, Y.F., Abiose, A., and Jones, B.R. (2001). Glaucoma prevalence may not be uniformly high in all “black” populations. *Afr. J. Med. Med. Sci.* *30*, 337–339.
- Nathanson, J.A., and McKee, M. (1995). Alterations of ocular nitric oxide synthase in human glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *36*, 1774–1784.
- Nicklin, M.J., Weith, A., and Duff, G.W. (1994). A physical map of the region encompassing the human interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-1 receptor antagonist genes. *Genomics* *19*, 382–384.
- Nicolela, M.T. (2008). Clinical clues of vascular dysregulation and its association with glaucoma. *Can. J. Ophthalmol.* *43*, 337–341.
- Ntim-Amponsah, C.T., Amoaku, W.M.K., Ofosu-Amaah, S., Ewusi, R.K., Idirisuriya-Khair, R., Nyatepe-Coo, E., and Adu-Darko, M. (2004). Prevalence of glaucoma in an African population. *Eye Lond. Engl.* *18*, 491–497.
- Olivieri, F., Rippo, M.R., Prattichizzo, F., Babini, L., Graciotti, L., Recchioni, R., and Procopio, A.D. (2013). Toll like receptor signaling in “inflammaging”: microRNA as new players. *Immun. Ageing A* *10*, 11.
- Orjalo, A.V., Bhaumik, D., Gengler, B.K., Scott, G.K., and Campisi, J. (2009). Cell surface-bound IL-1alpha is an upstream regulator of the senescence-associated IL-6/IL-8 cytokine network. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 17031–17036.
- Pärssinen, O., Era, P., Tolvanen, A., Kaprio, J., Koskenvuo, M., and Rantanen, T. (2007). Heritability of Intraocular Pressure in Older Female Twins. *Ophthalmology* *114*, 2227–2231.
- Pasutto, F., Mardin, C.Y., Michels-Rautenstrauss, K., Weber, B.H.F., Sticht, H., Chavarria-Soley, G., Rautenstrauss, B., Kruse, F., and Reis, A. (2008). Profiling of WDR36 missense variants in German patients with glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *49*, 270–274.
- Pasutto, F., Matsumoto, T., Mardin, C.Y., Sticht, H., Brandstatter, J.H., Michels-Rautenstrauss, K., Weisschuh, N., Gramer, E., Ramdas, W.D., van Koolwijk, L.M.E., et al. (2009). Heterozygous NTF4 Mutations Impairing Neurotrophin-4 Signaling in Patients with Primary Open-Angle Glaucoma. *Am. J. Hum. Genet.* *85*, 447–456.

Payão, S.L.M., Gonçalves, G.M., de Labio, R.W., Horiguchi, L., Mizumoto, I., Rasmussen, L.T., de Souza Pinhel, M.A., Silva Souza, D.R., Bechara, M.D., Chen, E., et al. (2012). Association of interleukin 1 β polymorphisms and haplotypes with Alzheimer's disease. *J. Neuroimmunol.* 247, 59–62.

Pease, M.E., McKinnon, S.J., Quigley, H.A., Kerrigan-Baumrind, L.A., and Zack, D.J. (2000). Obstructed axonal transport of BDNF and its receptor TrkB in experimental glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 764–774.

Perkins, E.S. (1978). Blindness from glaucoma and the economics of prevention. *Trans. Ophthalmol. Soc. U. K.* 98, 293–295.

Picht, G., Welge-Luessen, U., Grehn, F., and Lütjen-Drecoll, E. (2001). Transforming growth factor β 2 levels in the aqueous humor in different types of glaucoma and the relation to filtering bleb development. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 239, 199–207.

Polansky, J.R., Juster, R.P., and Spaeth, G.L. (2003). Association of the myocilin mt.1 promoter variant with the worsening of glaucomatous disease over time. *Clin. Genet.* 64, 18–27.

Prünke, C., Orgül, S., and Flammer, J. (1998). Abnormalities of microcirculation in glaucoma: facts and hints. *Curr. Opin. Ophthalmol.* 9, 50–55.

Quigley, H.A. (1996). Number of people with glaucoma worldwide. *Br. J. Ophthalmol.* 80, 389–393.

Quigley, H.A. (1999). Neuronal death in glaucoma. *Prog. Retin. Eye Res.* 18, 39–57.

Quigley, H.A., and Broman, A.T. (2006). The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br. J. Ophthalmol.* 90, 262–267.

Quigley, H.A., Enger, C., Katz, J., Sommer, A., Scott, R., and Gilbert, D. (1994). Risk factors for the development of glaucomatous visual field loss in ocular hypertension. *Arch. Ophthalmol.* 112, 644–649.

Quigley, H.A., Nickells, R.W., Kerrigan, L.A., Pease, M.E., Thibault, D.J., and Zack, D.J. (1995). Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma and after axotomy occurs by apoptosis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 36, 774–786.

Rao, K.N., Kaur, I., Parikh, R.S., Mandal, A.K., Chandrasekhar, G., Thomas, R., and Chakrabarti, S. (2010). Variations in NTF4, VAV2, and VAV3 genes are not involved with primary open-angle and primary angle-closure glaucomas in an indian population. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 4937–4941.

Ray, K., and Mookherjee, S. (2009). Molecular complexity of primary open angle glaucoma: current concepts. *J. Genet.* 88, 451–467.

Raymond, V. (1997). Molecular genetics of the glaucomas: mapping of the first five “GLC” loci. *Am. J. Hum. Genet.* 60, 272–277.

- Ren, J.-L., Pan, J.-S., Lu, Y.-P., Sun, P., and Han, J. (2009). Inflammatory Signaling and Cellular Senescence. *Cell. Signal.* 21, 378–383.
- Resnikoff, S., Pascolini, D., Etya'ale, D., Kocur, I., Pararajasegaram, R., Pokharel, G.P., and Mariotti, S.P. (2004). Global data on visual impairment in the year 2002. *Bull. World Health Organ.* 82, 844–851.
- Rezaie, T., Child, A., Hitchings, R., Brice, G., Miller, L., Coca-Prados, M., Héon, E., Krupin, T., Ritch, R., Kreutzer, D., et al. (2002). Adult-onset primary open-angle glaucoma caused by mutations in optineurin. *Science* 295, 1077–1079.
- Rogus, J., Beck, J.D., Offenbacher, S., Huttner, K., Iacoviello, L., Latella, M.C., de Gaetano, M., Wang, H.-Y., Kornman, K.S., and Duff, G.W. (2008). IL1B gene promoter haplotype pairs predict clinical levels of interleukin-1beta and C-reactive protein. *Hum. Genet.* 123, 387–398.
- Rosenthal, A.R., and Perkins, E.S. (1985). Family studies in glaucoma. *Br. J. Ophthalmol.* 69, 664–667.
- Rudnicka, A.R., Mt-Isa, S., Owen, C.G., Cook, D.G., and Ashby, D. (2006). Variations in primary open-angle glaucoma prevalence by age, gender, and race: a Bayesian meta-analysis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 4254–4261.
- Sakata, K., Sakata, L.M., Sakata, V.M., Santini, C., Hopker, L.M., Bernardes, R., Yabumoto, C., and Moreira, A.T.R. (2007). Prevalence of glaucoma in a South brazilian population: Projeto Glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48, 4974–4979.
- Sambrook, J., Fritsch, Edward F, Maniatis, T., Sambrook-Fritsch-Maniatis, .., and Cold Spring Harbor Laboratory (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual; [prepared for use in the CSH courses on the molecular cloning of eukaryotic genes]* 1 1 (Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sanfilippo, P.G., Hewitt, A.W., Hammond, C.J., and Mackey, D.A. (2010). The Heritability of Ocular Traits. *Surv. Ophthalmol.* 55, 561–583.
- Santtila, S., Savinainen, K., and Hurme, M. (1998). Presence of the IL-1RA allele 2 (IL1RN*2) is associated with enhanced IL-1beta production in vitro. *Scand. J. Immunol.* 47, 195–198.
- Shaftel, S.S., Griffin, W.S.T., and O'Banion, M.K. (2008). The role of interleukin-1 in neuroinflammation and Alzheimer disease: an evolving perspective. *J. Neuroinflammation* 5, 7.
- Shields, M.B., Ritch, R., and Krupin, T. (1996). *Shields textbook of glaucoma* (Saint Louis. Mosby-Year Book).
- Sommer, A., Tielsch, J.M., Katz, J., Quigley, H.A., Gottsch, J.D., Javitt, J., and Singh, K. (1991). Relationship between intraocular pressure and primary open angle glaucoma among

white and black Americans. The Baltimore Eye Survey. *Arch. Ophthalmol.* 109, 1090–1095.

Stasi, K., Nagel, D., Yang, X., Wang, R.-F., Ren, L., Podos, S.M., Mittag, T., and Danias, J. (2006). Complement Component 1Q (C1Q) Upregulation in Retina of Murine, Primate, and Human Glaucomatous Eyes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 1024–1029.

Stone, E.M., Fingert, J.H., Alward, W.L., Nguyen, T.D., Polansky, J.R., Sunden, S.L., Nishimura, D., Clark, A.F., Nystuen, A., Nichols, B.E., et al. (1997). Identification of a gene that causes primary open angle glaucoma. *Science* 275, 668–670.

Tezel, G., and Wax, M.B. (2000). Increased Production of Tumor Necrosis Factor- α by Glial Cells Exposed to Simulated Ischemia or Elevated Hydrostatic Pressure Induces Apoptosis in Cocultured Retinal Ganglion Cells. *J. Neurosci.* 20, 8693–8700.

Tezel, G., and Wax, M.B. (2004). The immune system and glaucoma. *Curr. Opin. Ophthalmol.* 15, 80–84.

Tezel, G., Li, L.Y., Patil, R.V., and Wax, M.B. (2001). TNF- α and TNF- α receptor-1 in the retina of normal and glaucomatous eyes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 1787–1794.

Thompson, M.W. (2002). Thompson & Thompson: genética médica (Rio de Janeiro: Guanabara Koogan).

Thylefors, B. (1995). The role of international ophthalmology in blindness prevention. *Am. J. Ophthalmol.* 119, 229–230.

Tomarev, S.I. (2001). Eyeing a new route along an old pathway. *Nat. Med.* 7, 294–295.

De Vasconcellos, J.P.C., de Melo, M.B., Schimiti, R., Costa, F.F., and Costa, V.P. (2003). Penetrance and phenotype of the Cys433Arg myocilin mutation in a family pedigree with primary open-angle glaucoma. *J. Glaucoma* 12, 104–107.

Wang, C.Y., Shen, Y.C., Lo, F.Y., Su, C.H., Lee, S.H., Lin, K.H., Tsai, H.Y., Kuo, N.W., and Fan, S.S. (2006). Polymorphism in the IL-1 α (-889) locus associated with elevated risk of primary open angle glaucoma. *Mol Vis* 12, 1380–1385.

Wang, C.Y., Shen, Y.-C., Su, C.-H., Lo, F.-Y., Lee, S.-H., Tsai, H.-Y., and Fan, S.-S. (2007a). Investigation of the association between interleukin-1 β polymorphism and normal tension glaucoma. *Mol. Vis.* 13, 719–723.

Wang, C.-Y., Shen, Y.-C., Lo, F.-Y., Su, C.-H., Lee, S.-H., Tsai, H.-Y., and Fan, S.-S. (2007b). Normal tension glaucoma is not associated with the interleukin -1 α (-889) genetic polymorphism. *J. Glaucoma* 16, 230–233.

Wang, N., Chintala, S.K., Fini, M.E., and Schuman, J.S. (2001). Activation of a tissue-specific stress response in the aqueous outflow pathway of the eye defines the glaucoma disease phenotype. *Nat. Med.* 7, 304.

- Wang, N., Chintala, S.K., Fini, M.E., and Schuman, J.S. (2003). Ultrasound activates the TM ELAM-1/IL-1/NF-kappaB response: a potential mechanism for intraocular pressure reduction after phacoemulsification. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *44*, 1977–1981.
- Weinreb, R.N., Friedman, D.S., Fechtner, R.D., Cioffi, G.A., Coleman, A.L., Girkin, C.A., Liebmann, J.M., Singh, K., Wilson, M.R., Wilson, R., et al. (2004). Risk assessment in the management of patients with ocular hypertension. *Am. J. Ophthalmol.* *138*, 458–467.
- Weisschuh, N., Neumann, D., Wolf, C., Wissinger, B., and Gramer, E. (2005). Prevalence of myocilin and optineurin sequence variants in German normal tension glaucoma patients. *Mol. Vis.* *11*, 284–287.
- Wen, A., Wang, J., Feng, K., Zhu, P., Wang, Z., and Jiang, J. (2006). Effects of haplotypes in the interleukin 1beta promoter on lipopolysaccharide-induced interleukin 1beta expression. *Shock Augusta Ga* *26*, 25–30.
- Werman, A., Werman-Venkert, R., White, R., Lee, J.-K., Werman, B., Krelin, Y., Voronov, E., Dinarello, C.A., and Apte, R.N. (2004). The precursor form of IL-1 α is an intracrine proinflammatory activator of transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 2434–2439.
- West, S., and Sommer, A. (2001). Prevention of blindness and priorities for the future. *Bull. World Health Organ.* *79*, 244–248.
- Wirtz, M.K., Samples, J.R., Rust, K., Lie, J., Nordling, L., Schilling, K., Acott, T.S., and Kramer, P.L. (1999). GLC1F, a new primary open-angle glaucoma locus, maps to 7q35-q36. *Arch. Ophthalmol.* *117*, 237–241.
- Wolfs RW, Klaver CW, Ramrattan RS, van Duijn CM, Hofman A, and de Jong PM (1998). Genetic risk of primary open-angle glaucoma: Population-based familial aggregation study. *Arch. Ophthalmol.* *116*, 1640–1645.
- Xin, X., Gao, L., Wu, T., and Sun, F. (2013). Roles of tumor necrosis factor alpha gene polymorphisms, tumor necrosis factor alpha level in aqueous humor, and the risks of open angle glaucoma: a meta-analysis. *Mol. Vis.* *19*, 526–535.
- Yan, X., Tezel, G., Wax, M.B., and Edward, D.P. (2000). Matrix metalloproteinases and tumor necrosis factor alpha in glaucomatous optic nerve head. *Arch. Ophthalmol.* *118*, 666–673.
- Yu, Q.-Q., and Yao, Y. (2012). A detailed meta-analysis shows no association between TNF- α -308G/A polymorphism and different forms of glaucoma. *Ophthalmic Res.* *47*, 47–51.
- Yuan, L., and Neufeld, A.H. (2000). Tumor necrosis factor-alpha: a potentially neurodestructive cytokine produced by glia in the human glaucomatous optic nerve head. *Glia* *32*, 42–50.
- Yuan, L., and Neufeld, A.H. (2001). Activated microglia in the human glaucomatous optic nerve head. *J. Neurosci. Res.* *64*, 523–532.

Zalish, M., Oron, Y., and Geyer, O. (2004). Outcome of consecutive trabeculectomy. *Clin. Experiment. Ophthalmol.* 32, 19–22.

Zhang, Y., Liu, C., Peng, H., Zhang, J., and Feng, Q. (2012). IL1 Receptor Antagonist Gene IL1-RN Variable Number of Tandem Repeats Polymorphism and Cancer Risk: A Literature Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE* 7, e46017.

(1989). The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study: design and objectives. The ARIC investigators. *Am. J. Epidemiol.* 129, 687–702.

8.FONTES CONSULTADAS

ENSEMBL GENOME BROWSER. <http://www.ensembl.org/index.html>.
http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Mapping.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>.

ANEXO 1

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

✉ Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP

☎ (0_19) 3521-8936

FAX (0_19) 3521-7187

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

Termo de consentimento livre e esclarecido 📧 cep@fcm.unicamp.br

Você está sendo convidado(a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado(a) de forma alguma.

Informações sobre a pesquisa:

Título do projeto: ANÁLISE DAS PROTEÍNAS SOLÚVEIS TGF- β 2, IL-1 β , TNF α e PDGF E DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS NOS GENES IL-1 β E TNF- α : MODULAÇÃO DA CICATRIZAÇÃO EM PACIENTES PORTADORES DE GLAUCOMA PRIMÁRIO DE ÂNGULO ABERTO SUBMETIDOS À TRABECULECTOMIA.

Pesquisador responsável: Mariana Borges Oliveira

Telefone para contato: 019 3521-1135

O glaucoma é uma das principais causas de visão baixa em idosos em todo o mundo. Nos últimos anos, muitas alterações genéticas têm sido encontradas em pacientes com esta doença. O principal objetivo de estudar estas alterações é para que no futuro seja possível prevenir estas doenças e evitar que idosos tenham problemas visuais por glaucoma.

Caso você concorde em participar desse estudo, os pesquisadores participantes farão perguntas a respeito dos seus antecedentes médicos e familiares. Para participar do estudo é necessário colher uma amostra de 20 a 30 ml de sangue (o equivalente a duas colheres de sopa), como é feito em exames para anemia ou glicose. O exame é muito seguro e fora o desconforto da injeção não costuma causar efeitos colaterais. O sangue será colhido apenas uma vez. O exame oftalmológico realizado será o de costume no ambulatório, com registro fotográfico da cirurgia de glaucoma. A amostra de humor aquoso (líquido contido no interior do olho) será colhida durante a cirurgia de glaucoma com auxílio de uma seringa de insulina totalizando um volume aproximado de 0,1 ml, sem qualquer prejuízo para o resultado da cirurgia, sem efeito colateral resultante da coleta ou desconforto causado pela injeção previsíveis.

O participante do estudo não receberá qualquer valor em dinheiro. Os resultados serão publicados, mas sua identidade será preservada.

O DNA, extraído a partir do sangue de cada paciente, será preservado conforme o Regimento do Laboratório de Genética Molecular Humana do CBMEG (UNICAMP) se o paciente assim o consentir.

Consentimento

Eu, _____ RG _____
_____,

abaixo assinado, estou de acordo em participar do estudo proposto acima, como sujeito. Fui devidamente informado(a) e esclarecido pelo pesquisador sobre a pesquisa e os procedimentos nela envolvidos. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer instante, sem prejuízo em meu acompanhamento ou tratamento. Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento. Fui informado que poderei autorizar que esse material genético seja guardado no Banco de Material Biológico do Laboratório de Genética Molecular Humana CBMEG/UNICAMP. Caso este material venha a ser útil para outros estudos aprovados pelo Comitê de Ética, estou ciente que serei informado para que autorize ou não o uso da(s) amostra(s).

() Autorizo que a minha amostra de DNA seja utilizada durante o projeto em questão e armazenada para utilização em projetos futuros por um período de até 5 anos, sabendo que os novos projetos serão submetidos à apreciação do CEP.

() Autorizo a utilização da minha amostra de DNA apenas para a execução deste projeto, após o qual ela não permanecerá armazenada.

Local e data: _____

Nome do paciente: _____

Nome e assinatura do responsável legal: _____

PARTICIPAÇÃO DE INDIVÍDUOS CONTROLE

Eu estou ciente de que a minha participação no estudo intitulado “**ANÁLISE DAS PROTEÍNAS SOLÚVEIS TGF- β 2, IL-1 β , TNF α e PDGF E DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS NOS GENES IL-1 β E TNF- α : MODULAÇÃO DA CICATRIZAÇÃO EM PACIENTES PORTADORES DE GLAUCOMA PRIMÁRIO DE ÂNGULO ABERTO SUBMETIDOS À TRABECULECTOMIA.**” será como um indivíduo controle em testes de biologia molecular.

Entendi que todas as informações constadas neste termo quanto a procedimentos, sigilo, resultados e contatos para resultados (se eu desejar saber), serão iguais aos demais indivíduos não-controles deste estudo. Fui informado também que poderei autorizar que o meu material genético seja guardado no Banco de Material Biológico do Laboratório de Genética Molecular Humana CBMEG/UNICAMP. Caso este material venha a ser útil para outros estudos aprovados pelo Comitê de Ética, estou ciente que serei informado para que autorize ou não o uso da (s) amostra (s).

Nome e RG do indivíduo controle

Assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

Data

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR

Eu expliquei a _____ o objetivo do estudo, os procedimentos requeridos e os possíveis riscos que poderão advir do estudo, usando o melhor do meu conhecimento. Eu me comprometo a fornecer uma cópia desse formulário de consentimento ao participante ou responsável.

Nome e RG do pesquisador

Assinatura do pesquisador

Data

Telefone para contato: 19-3521-1135 (Mariana Borges Oliveira)
Telefone do Comitê de Ética em Pesquisa – FCM – UNICAMP para dúvidas éticas e/ou reclamações: 19-3521-8936
Endereço: Rua Tessália Vieira Camargo, 126 – Caixa Postal 6111 12083, Campinas – SP; e-mail: cep@fcm.unicamp.br

ANEXO 2

 UNICAMP	FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html
CEP, 29/05/13. (Grupo II)	3ª VIA
PARECER CEP: Nº 642/2009 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto) CAAE: 0518.0.146.000-09	
I - IDENTIFICAÇÃO:	
PROJETO: “ANÁLISE DAS PROTEÍNAS SOLÚVEIS TGF- β 2, IL-1 β , TNF α E PDGF E DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS NOS GENES IL-1 β E TNF- α : MODULAÇÃO DA CICATRIZAÇÃO EM PACIENTES PORTADORES DE GLAUCOMA PRIMÁRIO DE ÂNGULO ABERTO SUBMETIDOS À TRABECULECTOMIA”.	
PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Mariana Borges Oliveira	
INSTITUIÇÃO: Hospital das Clínicas/UNICAMP	
APRESENTAÇÃO AO CEP: 13/07/2009	
APRESENTAR RELATÓRIO EM: 19/08/10 (O formulário encontra-se no site acima)	
II - OBJETIVOS	
Estudar a participação de citocinas inflamatórias e de regeneração no processo de reparo/cicatrização de pacientes submetidos a trabeculectomia por glaucoma de ângulo primário, antes da cirurgia e em 3 momentos pós-cirúrgicos relacionando com a resposta clínica do procedimento. Ainda, avaliar a presença dos polimorfismos do TNF- α e IL-1 β nestes pacientes, fazendo correlação com a resposta cirúrgica.	
III - SUMÁRIO	
O projeto pretende analisar a presença de citocinas inflamatórias envolvidas na reparação/cicatrização cirúrgica. Isto será feito através de dosagem sérica antes da cirurgia e em 3 momentos pós-cirúrgicos. Além disso, será analisada a expressão de IL-1 β e PDGF, TGF- β e TNF- α no humor aquoso, extraído em quantidade não prejudicial ao procedimento e ao doente. As dosagens obtidas serão relacionadas posteriormente ao resultado cirúrgico verificado no pós-operatório, bem como correlacionado com as dosagens séricas das citocinas. Serão avaliados também polimorfismos da IL-1 β e TNF- α na resposta inflamatória pré e pós cirúrgica. A amostra está bem caracterizada, com critérios de inclusão e exclusão bem definidos, obedecendo a parâmetros da literatura internacional.	
IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES	
Após respostas às pendências, o projeto encontra-se adequadamente redigido e de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.	
Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126 Caixa Postal 6111 13083-887 Campinas - SP	FONE (019) 3521-8936 FAX (019) 3521-7187 cep@fcm.unicamp.br

- 1 -



V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

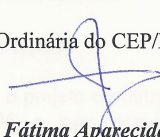
O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na VII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 28 de julho de 2009.


Prof. Dra. Fátima Aparecida Böttcher Luiz
COORDENADORA DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM/UNICAMP

ANEXO 3

Extração de DNA a partir de sangue periférico

1ª PARTE

1. O sangue deverá ser coletado em EDTA ou ACD em tubos de *vacunteiner* em duas alíquotas de 7-10mL.
2. Centrifugar este sangue por 10 minutos a 1900 rpm.
3. Remover a porção sobrenadante, correspondente ao plasma, pipeta Pasteur (de plástico descartável). Em seguida, misturar as porções intermediária e inferior, correspondentes aos leucócitos e às hemácias, respectivamente, com outra pipeta Pasteur.
4. Transferir a mistura para um tubo falcon de 15mL. Adicionar tampão RSB 1X até completar o volume final de 11mL. Misturar levemente com as mãos.
5. Adicionar 60µL de NONIDET – P40 (TRITON ou IGEFAL). Inverter e misturar. Deverá ficar translúcido e de cor cereja contra luz.
6. Centrifugar a 2500rpm por 10 minutos e desprezar o sobrenadante.
7. Ressuspender o restante em 0,5mL de tampão RSB 1X. Homogeneizar bem.
8. Lisar os núcleos com 3mL de SDS (solução para sangue) e misturar gentilmente por inversão repetidamente.
9. Adicionar proteinase K (numa concentração final de 100µL/mL) aproximadamente 80µL e incubar por 2-3 horas à 37°C. Pode-se também deixar de um dia para o outro.

2ª PARTE

1. Adicionar 3,0mL de fenol saturado e ‘misturar’ por cerca de 10 minutos, invertendo o tubo gentilmente.
2. Centrifugar a 2500rpm por 10 minutos e remover a porção inferior do tubo (fenol), com pipeta Pasteur, tomando cuidado para não misturá-la à porção superior do centrifugado.
3. Repetir os itens 1 e 2 usando clorofórmio saturado com fenol (1:1) , isto é, 1,5mL de clorofórmio e 1,5mL de fenol.
4. Adicionar 3,0mL de álcool isoamílico-clorofórmio e misturar através de inversão gentil do tubo.
5. Centrifugar a 2500rpm por 10 minutos e remover completamente a porção inferior do centrifugado.
6. Adicionar 6,0mL de etanol 100% e misturar bem e levemente até precipitar o DNA.
7. Coletar o DNA com pipeta e ressuspendê-lo em 200-250µL de TE pH 8,0.

ANEXO 4

Purificação da reação de sequenciamento

1. Adicionar 80 µl de etanol 80%;
2. Centrifugar a 4000 rpm por 45 minutos;
3. Descartar por inversão, colocar a placa invertida sobre papel toalha e secar as bordas;
4. Adicionar 150 µl de etanol 70%;
5. Descartar novamente por inversão, colocar a placa ainda invertida sobre papel toalha e secar as bordas;
6. Realizar “spin” invertido;
7. Deixar secar em local escuro, envolto em papel alumínio, por 2 horas.