

**José Paulo Cabral de Vasconcellos**

**Avaliação da Frequência e do Tipo de Mutações no Gene  
TIGR/MYOC em uma População Brasileira com  
Glaucoma Primário de Ângulo Aberto do Tipo Juvenil.**

**Campinas 2001**



**José Paulo Cabral de Vasconcellos**

**Avaliação da Frequência e do Tipo de Mutações no Gene  
TIGR/MYOC em uma População Brasileira com  
Glaucoma Primário de Ângulo Aberto do Tipo Juvenil.**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas, área de Oftalmologia.

**Orientador: Prof. Dr. Vital Paulino Costa**

Campinas 2001

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

**UNICAMP**

V441a Vasconcellos, José Paulo Cabral de  
Avaliação da frequência e do tipo de mutações no gene TIGR /  
MYOC em uma população brasileira com glaucoma primário de  
ângulo aberto do tipo juvenil / José Paulo Cabral de Vasconcellos.  
Campinas, SP : [s.n.], 2001.

Orientador : Vital Paulino Costa  
Tese ( Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade  
de Ciências Médicas.

1. Genética. 2. Mutação ( Biologia). 3. Glaucoma. 4. Biologia  
molecular. I. Vital Paulino Costa. II. Universidade Estadual de  
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Banca examinadora da tese de Doutorado

Orientador: Prof. Dr. Vital Paulino Costa

Membros:

Prof. Dr. Carmo Mandia Junior

Prof. Dr. José Carlos Reys

Prof. Dr. Fernando F. Costa

Profa. Dra. Ana Maria Marcondes

Prof Dr. Vital Paulino Costa

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da  
Universidade Estadual de Campinsa.

Data: 28.11.2001



À minha esposa Mônica, que teve participação fundamental nesta tese, na parte técnica e emocional. É com ela que encontro motivação para o trabalho e alegria para minha vida.

Aos meus pais Walter e Therezinha.



## **Agradecimentos**

Ao Dr. Vital Paulino Costa, que iniciou-me no mundo acadêmico, e que, apesar de todos os percalços inerentes à vida, mantém-me motivado a continuar neste caminho.

Ao Dr. Newton Kara José e Dr. Carlos Eduardo Arieta pelo constante aprendizado na área médica e pessoal.

Ao Dr. Fernando Ferreira Costa por encorajar o desenvolvimento da genética em oftalmologia e por ter aberto o Hemocentro da UNICAMP para realização deste trabalho.

À todas as pessoas que direta ou indiretamente estiveram envolvidas no desenvolvimento desta tese, incluindo médicos e funcionários do Departamento de Oftalmologia, membros do Setor de Pós-Graduação e aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro. A todos gostaria de dizer que o tempo compartilhado foi extremamente agradável e produtivo, extrapolando o simples ato do desenvolvimento deste trabalho.

Aos pacientes e familiares que participaram desta tese.



# SUMÁRIO

	pág.
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xv
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xvi
<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS</b> .....	xix
<b>RESUMO</b> .....	xxv
<b>I – INTRODUÇÃO</b> .....	27
1. Definição do Glaucoma .....	29
2. Classificação do Glaucoma.....	29
3. Epidemiologia do Glaucoma Primário de Ângulo Aberto.....	30
3.1. Antecedente Familiar .....	31
4. Oftalmologia e Genética .....	36
4.1. Introdução .....	36
4.2. Glaucoma e Genética .....	42
4.2.1. Classificação .....	42
4.2.2. Glaucoma Congênito Primário .....	42
4.2.2.1. Padrão de Herança .....	42
4.2.2.2. Biologia Molecular .....	43
4.2.3. Glaucomas de Desenvolvimento .....	45
4.2.3.1. Aniridia e Anomalia de Peters .....	45
4.2.3.2. Axenfeld Rieger e Iridogoniodisgenesia.....	46
4.2.4. Glaucomas Secundários .....	48

4.2.4.1. Glaucoma Pigmentar.....	48
4.2.4.2. Glaucoma Cortisônico .....	48
4.2.4.3. Glaucoma Pseudoexfoliativo .....	50
4.2.5. Glaucoma Primário de Ângulo Estreito.....	51
4.2.6. Glaucoma Primário de Ângulo Aberto .....	52
4.2.6.1. Padrão de Herança .....	52
4.2.6.2. Biologia Molecular .....	56
5. Gene TIGR/MYOC.....	62
5.1. Região Codificadora .....	62
5.2. Região Promotora .....	66
5.3. Expressão.....	67
5.4. Rastreamento de Mutações.....	71
6. Objetivos.....	72
<b>II – PACIENTES E MÉTODOS .....</b>	<b>73</b>
1. Pacientes .....	75
1.1. Critérios de Inclusão .....	75
1.2. Critérios de Exclusão .....	76
1.3. Grupo Controle .....	76
2. Métodos .....	76
2.1. Dados Demográficos.....	76
2.2. Exame Oftalmológico .....	77
2.3. Biologia Molecular .....	77
2.3.1. Extração de DNA.....	77

2.3.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	78
2.3.3. Polimorfismo de Conformção de Fita Simples (SSCP).....	80
2.3.4. Análise por Seqüenciamento .....	82
2.3.4.1. Seqüenciamento Manual.....	82
2.3.4.2. Seqüenciamento Automático .....	83
2.3.4.2.1. Purificação do Produto da PCR .....	83
2.3.4.2.2. Quantificação do Produto Amplificado .....	84
2.3.4.2.3. Reação de Seqüenciamento .....	84
2.3.5. Digestão com Enzima de Restrição .....	85
2.3.6. Análise de Haplótipos.....	85
3. Análise dos Heredogramas .....	86
3.1. Segregação Concomitante.....	86
3.2. Penetrância.....	86
4. Análise dos Dados .....	86
5. Análise Estatística.....	87
6. Aspectos Éticos.....	87
<b>III – RESULTADOS.....</b>	<b>89</b>
1. Dados Demográficos.....	91
2. Exame Ocular .....	93
3. Mutações no gene TIGR/MYOC em indivíduos com GPAA-J .....	95
4. Indivíduos com GPAA-J sem mutação no gene TIGR/MYOC.....	101
5. Comparação entre indivíduos com GPAA-J apresentando a mutação Cys433Arg e indivíduos com GPAA-J sem mutação no gene TIGR/MYOC.....	103

6. Grupo Controle .....	104
7. Análise de Haplótipos .....	105
8. Heredograma.....	108
<b>IV – DISCUSSÃO .....</b>	<b>111</b>
1. GPAA-J: Dados Demográficos.....	113
2. Mutações no Gene TIGR/MYOC .....	115
<b>V – CONCLUSÕES .....</b>	<b>135</b>
<b>VI – SUMMARY.....</b>	<b>139</b>
<b>VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>143</b>

## ***LISTA DE TABELAS***

<b>Tabela I:</b> Algumas afecções oculares e seus respectivos loci e genes .....	40
<b>Tabela II:</b> Seqüência dos iniciadores, tamanho do fragmento amplificado e temperatura de anelamento utilizados para o rastreamento de mutações nos 3 exons do gene TIGR/MYOC .....	79
<b>Tabela III:</b> Condições de corrida e concentração do gel de poliacrilamida para os 3 exons do gene TIGR/MYOC .....	81
<b>Tabela IV:</b> Identificação, idade ao diagnóstico, sexo, cor e antecedente familiar dos 28 indivíduos com GPAA-J .....	92
<b>Tabela V:</b> Identificação, PIO inicial, acuidade visual inicial, equivalente esférico, campo visual, inicial e número de cirurgias antiglaucomatosas ao final do seguimento em cada olho dos 28 indivíduos com GPAA-J .....	94
<b>Tabela VI:</b> Identificação, idade ao diagnóstico, sexo, cor, antecedente familiar, PIO inicial dos olhos direito e esquerdo, acuidade visual inicial de ambos os olhos e cirurgia antiglaucomatosa de pacientes com GPAA-J e alteração na seqüência do gene TIGR/MYOC .....	101
<b>Tabela VII:</b> Identificação, idade ao diagnóstico, sexo, cor, antecedente familiar, PIO inicial dos olhos direito e esquerdo, acuidade visual inicial de ambos os olhos e cirurgia antiglaucomatosa de pacientes com GPAA-J e sem alteração na seqüência do gene TIGR/MYOC .....	102
<b>Tabela VIII:</b> Comparação dos dados clínicos e demográficos entre pacientes com a mutação Cys433Arg e sem mutação no gene TIGR/MYOC .....	104
<b>Tabela IX:</b> Tipos de mutação identificados no gene TIGR/MYOC .....	129

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Esquema da região candidata associada ao GPAA-J (GLC1A) no cromossomo 1, construída a partir de cromossomos artificiais de levedura (YAC), incluindo os genes SELL, SELE, TIGR, APT1LG1 e TXGP1. Os círculos cheios indicam a posição dos marcadores. A região candidata encontra-se delimitada pelos marcadores D1S1619 e D1S3664 e contém o gene TIGR (STONE et al, 1997) ..... 60
- Figura 2:** Estrutura do gene TIGR/MYOC e possíveis mecanismos para formação de produtos. Região intrônica, promotora e os três exons do gene TIGR/MYOC (acima). Diferentes traduções do RNAm do gene TIGR/MYOC: a) quando o primeiro ATG é traduzido, a proteína apresenta 504 aa. b) a proteína traduzida a partir do sítio de clivagem do exon 1 apresenta 472 aa, c) proteína glicosilada (o contorno pontilhado indica a forma com 504 aa) (NGUYEN et al, 1998) ..... 64
- Figura 3:** Zíper de leucina, configuração helicoidal. Os resíduos de arginina (R) e leucina (L) estão salientados. (SARFARAZI, 1997) ..... 65
- Figura 4:** Regiões homólogas à miosina (exon 1) e à olfactomedina (exon 3). A porção preenchida corresponde à região do zíper de leucina. (SARFARAZI, 1997) ..... 66
- Figura 5:** À esquerda, SSCP realizado em gel de poliacrilamida 20% do produto da PCR da região 4, exon 3. Amostra controle (1) e amostras de indivíduos com GPAA-J (2 - IS, 3 - MAN e 4 - VF). As amostras 2 e 4 apresentam padrão de mobilidade eletroforética alterada quando comparadas com o controle. À direita, seqüenciamento manual do produto da PCR da região 4 do exon 3 da amostra controle (A) e do paciente 4 (B), mostrando no último a alteração de T para C em heterozigose (indicada pela seta), a qual resulta na troca do aminoácido cisténa por arginina (Cys433Arg)..... 96
- Figura 6:** Seqüenciamento automático do produto da PCR da região 3/4 (exon 3) do gene TIGR/MYOC de indivíduo normal (à esquerda) e do paciente MJN (à direita) portador da mutação no codon 433 (TGT→CGT, à direita, levando à substituição de uma cisteína por uma arginina). A seta indica o local onde ocorreu a mutação em heterozigose (Cys433Arg)..... 96

**Figura 7:** À esquerda, SSCP realizado em gel de poliacrilamida 20% do produto da PCR da região 2 do exon 3. Amostra controle (1) e amostras provenientes de indivíduos com GPAA-J (2 - CVD e 3 - HGF). A amostra 2 apresenta padrão de mobilidade eletroforética alterada quando comparada com o controle. À direita, seqüenciamento manual do produto da PCR da região 2 do exon 3 da amostra controle (A) e do paciente 2 (B), mostrando no último a alteração de C para T em heterozigose (indicada pela seta), a qual leva à troca do aminoácido prolina por leucina no codon 370 (Pro370Leu)..... 97

**Figura 8:** Seqüenciamento automático do produto da PCR da região 2 do exon 3 do gene TIGR/MYOC de indivíduo normal (à esquerda) e do paciente CVD (à direita), portador da mutação no codon 370 (CCG→CTG), levando à substituição de uma prolina por uma leucina. A seta indica o local onde ocorreu a mutação em heterozigose (Pro370Leu) ..... 98

**Figura 9:** À esquerda, SSCP realizado em gel de poliacrilamida 20% do produto da PCR da região 2 do exon 3. Amostra controle (1) e amostras provenientes de indivíduos com GPAA-J (2 - LAB e 3 - JAR). A amostra 3 apresenta padrão de mobilidade eletroforética alterada quando comparada com o controle. À direita, seqüenciamento manual do produto da PCR da região 2 do exon 3 da amostra controle (A) e do paciente 3 (B), mostrando no último a alteração de C para T em heterozigose (indicada pela seta), a qual leva à troca do aminoácido glutamina por um codon de terminação (Gln368 STOP) ..... 99

**Figura 10:** Seqüenciamento automático do produto da PCR da região 3/2 (exon 3) do gene TIGR/MYOC de indivíduo normal (à esquerda) e do paciente JAR (à direita), portador da mutação no codon 368 (CAG→TAG), levando à substituição de uma glutamina por um codon de terminação. A seta indica o local onde ocorreu a mutação em heterozigose (Gln368STOP) ..... 99

**Figura 11: A.** SSCP realizado em gel de poliacrilamida 20% do produto da PCR da região 5 do exon 1. Amostra controle (1) e amostras provenientes de indivíduos com GPAA-J (2 – CBF, 3 – AAS, 4 – DAJ e 5 - JLU). A amostra 2 apresenta padrão eletroforético alterado quando comparada com o controle. **B.** Sequenciamento automático do produto da PCR da região 1/5 (exon 1) do gene TIGR/MYOC de controle normal (à esquerda) e do paciente CBF (à direita) portador do polimorfismo no codon 122 (GGC→GGT). O aminoácido glicina não sofreu modificação. A seta indica o local onde ocorreu a substituição em heterozigose ..... 100

**Figura 12:** Gel de agarose 3% representando a digestão com a enzima de restrição *Fok I*. M. marcador de peso molecular.:Produto da PCR com 195 pb compreendendo os aminoácidos 412 a 476 do gene TIGR/MYOC, sem digerer. 2. Amostra de um paciente controle (representante da população geral) com dois fragmentos. 3. Amostra de um paciente com GPAA-J com a mutação em heterozigose, com três fragmentos. Os fragmentos de 13 pb e 33pb não podem ser visibilizados no gel. À direita, quadro com o número de pb de cada fragmento criado pela ação da enzima *Fok I* em um alelo normal e alelo mutante ..... 105

**Figura 13:** Eletroforese em gel de poliacrilamida 6% do produto da amplificação da região dos marcadores D1S1619, D1S210, NGA19 e D1S2790 que flanqueiam o gene TIGR/MYOC. Amostras 1 e 2: controles. Amostras 3 a 7: indivíduos com GPAA-J portadores da mutação Cys433Arg. As setas indicam as bandas correspondentes aos alelos compartilhados pelos indivíduos portadores da mutação Cys433Arg ..... 106

**Figura 14:** Heredograma I: Família de um dos pacientes (VF) com GPAA-J, indicado pela seta, compreendendo 4 gerações (I a IV). Símbolos preenchidos indicam membros com glaucoma e portadores da mutação Cys433Arg. O indivíduo II-3 é hipertenso ocular, também portador da mutação Cys433Arg e não desenvolveu glaucoma. Quatro marcadores (microssatélites) flanqueando o gene MYOC/TIGR foram usados para a análise de haplótipos. O haplótipo associado ao glaucoma nesta família está circundado por moldura ..... 107

**Figura 15:** Heredograma II: Ramo da família do paciente MJN com GPAA-J, compreendendo duas gerações. Símbolos preenchidos indicam membros com glaucoma e portadores da mutação Cys433Arg. Quatro marcadores (microssatélites) flanqueando o gene MYOC/TIGR foram usados para a análise de haplótipos. O haplótipo associado ao glaucoma nesta família está circundado por moldura ..... 108

**Figura 16:** Sequenciamento automático do produto da PCR da região 3/4 (exon 3) do gene TIGR/MYOC do paciente HN. À esquerda controle normal e à direita paciente portador da mutação no codon 433 (TGT→CGT), levando à substituição de uma cisteína por uma arginina. A seta indica o local onde ocorreu a mutação em homozigose ..... 109

**Figura 17:** Heredograma III: Família do paciente MJN (seta indicando MJN). Os indivíduos examinados dispõem de informação quanto à presença ou não de glaucoma, idade, PIO, necessidade

de tratamento cirúrgico e/ou clínico. Tal informação se encontra abaixo do respectivo símbolo..... 110

### ***LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS***

A	amarela
aa	aminoácido
ABCR	<i>human specific ATP-binding cassette transporter gene</i>
AD	autossômico dominante
AMPc	adenosina monofosfato cíclico
APT1LG1	<i>human fas ligand gene</i>
AR	autosômico recessivo
AS	<i>anti-sense</i>
B	branca
bFGF	fator de crescimento básico de fibroblasto
BFSP2	<i>beaded filament structural protein 2 gene</i>
BIGH3	<i>transforming growth factor beta-induced protein gene</i>
CD	conta dedos
CYP1B1	<i>dioxin-inducible cytochrome P450 gene</i>
cDNA	DNA produzido a partir do RNAm
cM	centiMorgan
CRX	<i>cone-rod homeobox gene</i>
dATP	desoxiadenosina trifosfato
DCA	distrofia corneana de Avelino
DCGG1	distrofia corneana granular Groenouw 1
DCL1	distrofia corneana latice 1
DCRB	distrofia corneana Reis-Bücklers
dCTP	desoxicitosina trifosfato
dGTP	desoxiguanosina trifosfato
dNTP	desoxinucleotídeos trifosfato
dTTP	desoxitimidina trifosfato
EDTA	ácido etilenodiaminotetraacético

f	feminino
FKHL7	<i>forkhead/winged helix-like transcription factor 7 gene</i>
GCP	glaucoma congênito primário
GLC	código para genes associados ao glaucoma
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
GLC3A	primeiro locus associado ao GCP
GLC3B	segundo locus associado ao GCP
GPAA	glaucoma primário de ângulo aberto
GPAA-A	GPAA do tipo adulto
GPAA-J	GPAA do tipo juvenil
GPAE	glaucoma primário de ângulo estreito
GUCY2D	<i>guanylate cyclase 2D, membrane (retina-specific) gene</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	água oxigenada
IRID1	primeiro locus associado à iridogoniodisgenesia
IRID2	segundo locus associado à iridogoniodisgenesia
kb	quilobase
KCl	cloreto de potássio
kDa	quiloDalton
K12	<i>cornea specific keratin K-12 gene</i>
K3	<i>cornea specific keratin K-3 gene</i>
L	probabilidade L para cálculo de ligação
ligado ao X	herança ligada ao sexo
m	masculino
M	molar
mA	miliampere
MgCl <sub>2</sub>	cloreto de magnésio
MIP	<i>myoinhibitory-like protein gene</i>

mM	milimolar
MM	movimento de mãos
mmHg	milímetro de mercúrio
mmol/l	milimol por litro
MYOC	<i>myocilin gene</i>
n	número de indivíduos pertencentes à amostra
N	negro
NH <sub>4</sub> Cl	cloreto de amônia
NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	bicarbonato de amônio
NI	não identificado
NRL	<i>retinal neural-specific leucine zipper gene</i>
nm	nanômetro
p	braço curto do cromossomo
P	nível de significância estatística
PAX6	<i>paired box protein gene</i>
pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia da polimerase
PDE6A	<i>phosphodiesterase 6A, cGMP-specific, rod, alpha gene</i>
PDE6B	<i>phosphodiesterase 6B, cGMP-specific, rod, beta gene</i>
pH	potencial hidrogeniônico
p <sup>H</sup>	alelo de resposta aumentada à cortisona
PIO	pressão intra-ocular
PITX2	<i>paired-like homeodomain transcription factor 2 gene</i>
PITX3	<i>paired-like homeodomain transcription factor 3 gene</i>
PL	percepção luminosa
p <sup>L</sup>	alelo de resposta diminuída à cortisona
pmol	picomol
P450B1	cytochrome P450
q	braço longo do cromossomo
RB1	gene retinoblastoma

RDS	<i>peripherin gene</i>
RHO	<i>rhodophisin gene</i>
RIEG1	primeiro locus associado à síndrome de Axenfeld-Rieger
RIEG2	segundo locus associado à síndrome de Axenfeld-Rieger
RPE65	<i>retinal pigment epithelium-specific protein gene</i>
RPGR	<i>retinitis pigmentosa GTPase regulator gene</i>
rpm	rotação por minuto
RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro
RP1	<i>retinitis pigmentosa 1 gene</i>
RP2	<i>retinitis pigmentosa 2 gene</i>
SELE	<i>selectin E gene</i>
SELL	<i>selectin L gene</i>
SSCP	polimorfismo de conformação em fita simples
SPL	sem percepção luminosa
Taq	thermophilus
TGFβ1	fator de crescimento β1
TIGR	<i>trabecular meshwork-induced glucocorticoid response gene</i>
TIGR/MYOC	<i>trabecular induced glucocorticoid response and myocilin gene</i>
Tris-HCl	trishidroximetil aminometano - ácido clorídrico
TTE	tris-aurina-EDTA
TULP1	<i>tubby like protein 1 gene</i>
TXGP1	<i>tax-transcriptionally activated glycoprotein 1 gene</i>
U	unidade
U/μl	unidades por microlitro
UV	luz ultra violeta
v	volt
vol	volume
v/h	relação voltagem hora
w	watt

$\chi^2$	teste de significância do qui-quadrado
$\gamma\text{-}^{32}\text{P ATP}$	adenosina trifosfato marcada com fósforo 32
$\mu\text{g}$	micrograma
$\mu\text{l}$	microlitro
$^{\circ}\text{C}$	grau centígrado



## *RESUMO*

O glaucoma é uma das principais causas de cegueira irreversível no mundo. Recentemente, a biologia molecular permitiu identificar o primeiro gene associado ao glaucoma primário de ângulo aberto (GPAA): o gene TIGR/MYOC. Vários estudos em diferentes populações relataram alterações na seqüência do gene TIGR/MYOC em 3% a 5% dos pacientes com GPAA. Este estudo tem como objetivo determinar a freqüência e tipos de mutação no gene TIGR/MYOC em uma população brasileira de indivíduos com glaucoma primário de ângulo aberto do tipo juvenil (GPAA-J). Extraíu-se DNA genômico a partir de sangue periférico de 28 pacientes com GPAA-J. Posteriormente, realizou-se PCR e SSCP para identificar possíveis mutações no gene TIGR/MYOC, as quais foram confirmadas por meio de análise de seqüenciamento. Avaliaram-se também aspectos clínicos de pacientes com ou sem alteração na seqüência deste gene. Dos 28 indivíduos com GPAA-J, 10 (35,71%) apresentaram mutação no gene TIGR/MYOC. Um paciente (3,57%) apresentou a mutação Pro370Leu, outro paciente (3,57%) portou a mutação Gln368STOP e oito pacientes (28,57%) exibiram a mutação Cys433Arg, descrita pela primeira vez. Por meio da análise de haplótipos, observou-se que pacientes portadores da mutação Cys433Arg provinham de um ancestral comum. Os indivíduos com GPAA-J portadores da mutação Cys433Arg apresentaram pressões intra-oculares médias iniciais mais elevadas do que indivíduos com GPAA-J sem mutações no gene TIGR/MYOC (OD,  $P = 0,0044$  e OE,  $P = 0,0034$ ). Ao avaliar o heredograma de família com GPAA-J, a mutação Cys433Arg apresentou uma penetrância de 0% nos indivíduos menores do que 10 anos de idade, de 40% entre 11 e 30 anos, 75% na faixa etária de 31 e 40 anos e alcançou 100% nos pacientes acima de 40 anos.





## ***I - INTRODUÇÃO***



## **1. Definição de Glaucoma**

O termo glaucoma engloba uma série de moléstias oculares que têm como característica comum a escavação progressiva do disco óptico com correspondente perda de campo visual (LESKE, 1983; SHIELDS, RITCH, KRUPIN, 1996; QUIGLEY & VITALE 1997). O principal fator de risco associado ao desenvolvimento de glaucoma é a pressão intra-ocular (PIO) (QUIGLEY, 1993).

## **2. Classificação do Glaucoma**

O glaucoma pode ser classificado segundo a sua etiologia, o aspecto anatômico do seio camerular e a idade de seu aparecimento.

Quando os mecanismos de ação para o desenvolvimento do glaucoma são conhecidos e envolvem condições oculares ou sistêmicas que resultem em elevação da PIO, o glaucoma é denominado secundário. O termo primário se restringe aos glaucomas onde o mecanismo responsável pelo aumento da PIO não está estabelecido (LESKE, 1983).

O seio camerular compreende uma série de estruturas que inclui desde a íris periférica até a linha de Schwalbe. A observação destas estruturas através da gonioscopia permite classificar o seio camerular em aberto, estreito ou fechado (FELMAN, 1998). Os glaucomas, portanto, podem também ser denominados segundo o aspecto anatômico do seio camerular em: 1) ângulo estreito ou 2) ângulo aberto (LESKE, 1983).

Finalmente, o glaucoma primário de ângulo aberto (GPAA) pode ser classificado de acordo com a idade de seu aparecimento em juvenil (GPAA-J), quando se manifesta em indivíduos entre 10 e 35 anos de idade e do tipo adulto (GPAA-A), quando o dano glaucomatoso é detectado mais tardiamente (JOHNSON et al, 1996). O GPAA-J normalmente apresenta níveis pressóricos elevados, predomínio de miopia e necessidade

freqüente de tratamento cirúrgico (JHONSON et al, 1993; WIGGS et al, 1995). Entretanto, esta divisão em idade muitas vezes se mostra artificial, devido à sobreposição destes subtipos de GPAA (GPAA-J e GPAA-A) em uma mesma família (STOILOVA et al, 1996; WIGGS et al, 1996; SARFARAZI et al, 1998; WIRTZ et al, 1999).

### **3. Epidemiologia do Glaucoma Primário de Ângulo Aberto**

Estimou-se para o ano 2000, a existência de cerca de 66,8 milhões de glaucomatosos no mundo (1,08%), sendo 33 milhões do tipo primário de ângulo aberto. Desta população, calcula-se que 6,6 milhões de indivíduos apresentem cegueira bilateral, o que representaria a segunda maior causa de cegueira no mundo (QUIGLEY, 1996). Outros autores sugeriram que as probabilidades de desenvolvimento de cegueira unilateral e bilateral (acuidade visual menor do que 20/200 e/ou campo visual com 20° de constrição ou menos) por pacientes com GPAA no decorrer de 15 anos seriam de 27% e 9%, respectivamente (HATTENHAUER et al, 1998). No Brasil, GULLO et al (1995) 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), na faixa etária acima de 60 anos (PERKINS, 1978), e nos países em desenvolvimento (THYLEFORS, 1995).

Além do impacto na qualidade de vida, a perda da função visual tem um custo elevado para a sociedade. SMITH & SMITH (1996) constataram a perda de um quarto a um sexto do produto interno bruto per capita no Reino Unido devido à cegueira. O custo de um

indivíduo cego nos EUA é de aproximadamente US\$ 12000,00 anuais, o que representa cerca de 0,3% do orçamento federal americano (JAVITT, 1995).

A prevalência do GPAA varia conforme a etnia, a faixa etária e a localização geográfica da população estudada (BENGTSSON, 1981; MASON et al, 1989; SHIOSE et al, 1991; TIELSCH et al, 1991; KLEIN et al, 1992; COFFEY et al, 1993; DIELEMANS et al, 1994; LESKE et al, 1994; MICHELL et al, 1996). A prevalência de GPAA observada em caucasianos acima de 40 anos situa-se entre 0,8% e 3,0% (BENGTSSON, 1981; TIELSCH et al, 1991; KLEIN et al, 1992; COFFEY et al, 1993; DIELEMANS et al, 1994; LESKE et al, 1994; MICHELL et al, 1996), entre 4,74% e 8,8% em indivíduos da raça negra acima de 30 anos (MASON et al, 1989; TIELSCH et al, 1991; LESKE et al, 1994) e na população japonesa acima de 40 anos observou-se uma prevalência de 2,6% (SHIOSE et al 1991).

### **3.1. Antecedente Familiar: Sua Importância como Fator de Risco para o Glaucoma Primário de Ângulo Aberto**

Além da PIO (DAVID, LIVINGSTON, LUNTZ, 1977; ARMALY et al, 1980; HOVDING & AESVED, 1986; LESKE et al, 1995), da raça (WILSON et al, 1987; TIELSCH et al, 1991; WORMALD et al, 1994; . QUIGLEY & VITALE, 1997), da idade (ARMALY et al, 1980; SHIOSE et al, 1991; LESKE et al, 1994) e da miopia (MITCHELL et al, 1999; WU, NEMESURE, LESKE, 2000;), a história familiar é outro fator de risco associado ao GPAA. Várias abordagens têm sido utilizadas para investigar tal associação, incluindo a avaliação de parentes de pacientes com GPAA, estudos do tipo caso-controle, estudos observacionais de prevalência e estudos de avaliação de gêmeos.

Em meados do século XX, vários autores determinaram que a frequência de antecedente familiar (presença de glaucoma em outro membro da família) em séries de pacientes com glaucoma variava de 5,65% a 13,75% (BELL, 1932; BIRO, 1939; POSNER & SCHLOSSMAN, 1949; BIRO, 1951; KELLERMAN & POSNER, 1955).

Em 1939, BIRO identificou 43 (5,65%) pacientes glaucomatosos com antecedente familiar positivo para a moléstia entre 761 pacientes avaliados no período de 1931 a 1936. POSNER & SCHLOSSMAN (1949) avaliaram 371 pacientes com glaucoma primário e constataram que 51 (13,75%) dos pacientes apresentavam um ou mais familiares acometidos por glaucoma. Posteriormente, BIRO (1951) apresentou uma nova série de pacientes com glaucoma (sem incluir casos de glaucoma associados a buftalmo) composta por 125 indivíduos, dos quais 16 (12,80%) apresentaram antecedente familiar. Em 1955, KELLERMAN & POSNER avaliaram 192 familiares de 27 pacientes com história familiar para glaucoma, provenientes de um grupo de 199 indivíduos com GPAA (porcentagem com antecedente familiar positivo = 13,57%). Destes, oito (4,17%) foram diagnosticados com GPAA e 11 (5,73%) foram considerados hipertensos oculares (com PIOs acima de 21 mmHg sem lesão glaucomatosa evidente).

PERKINS (1974) avaliou 190 parentes (filhos e irmãos) de indivíduos com GPAA, encontrando uma prevalência de 5,26% de glaucoma entre os familiares, porcentagem que se elevava para 7,62% considerando-se somente os indivíduos acima de 40 anos. LEIGHTON (1976) encontrou entre os parentes de primeiro grau de 58 pacientes com GPAA que apresentavam história familiar positiva para a moléstia, a prevalência de 1,42% de GPAA, contra 0,5% do grupo controle da mesma idade (média de 40 anos). MILLER (1978) avaliou 650 familiares (primeiro grau de parentesco) de pacientes britânicos com GPAA durante um período de 14 anos. O autor obteve uma incidência de GPAA e

hipertensão ocular de 0,75% e 3,9% entre os indivíduos menores do que 40 anos e de 4,6% e 15,5% entre os familiares com mais de 40 anos de idade, respectivamente.

ROSENTHAL & PERKINS (1985) avaliaram 101 indivíduos com história familiar positiva para GPAA durante um período que variou de 10 a 12 anos e concluíram que o risco relativo de aumento da PIO nesses indivíduos era três a quatro vezes maior do que na população geral e que 9% evoluíram para GPAA. Tal número representa aproximadamente 10 vezes a prevalência de GPAA na população geral de etnia semelhante (HOLLOWS & GRAHAM, 1966) e três vezes a prevalência encontrada por PERKINS (1973) em pacientes com hipertensão ocular seguidos por sete anos. NGUYEN, RAJA, TRABOULSI et al (2000) avaliaram 86 parentes de 15 famílias com mais de um membro acometido por GPAA do tipo adulto (GPAA-A). Neste estudo, o indivíduo era considerado acometido (com diagnóstico de GPAA) se preenchesse pelo menos dois dos seguintes critérios: PIO maior do que 21 mmHg, defeito glaucomatoso de campo visual, ou alteração de nervo óptico compatível com glaucoma. O indivíduo era considerado suspeito se apresentasse apenas um dos critérios acima preenchido e não acometido quando os três parâmetros eram normais. Entre os 86 indivíduos avaliados, 26 (30,2%) apresentaram diagnóstico de GPAA e 23 (26,3 %) foram considerados suspeitos. O grupo de maior risco para apresentar GPAA foi o de irmãos de indivíduos afetados (64,7%). Estudo mais recente conduzido por LESKE et al (2001) avaliou 207 famílias de 230 pacientes com GPAA (total = 1056 familiares). Os autores observaram que 29% dos pacientes apresentavam um familiar acometido por GPAA e que 10% tinham dois ou mais parentes acometidos. Entre os familiares de pacientes com GPAA, 10% apresentavam GPAA e 19% eram suspeitos para a moléstia.

Estudos do tipo caso-controle em diferentes grupos populacionais (caucasóides, negros e orientais) constataram que o antecedente familiar para o glaucoma era um dos

fatores de risco associados à moléstia. O risco relativo observado nestes estudos variou de 3,08 a 18,00 (WILSON et al, 1987; UHM & SHIN, 1992; CHARLIAT, JOLLY, BLANCHARD, 1994; LESKE, WARHEIT-ROBERTS, WU, 1996; KAIMBO, BUNTINX, MISSOTTEN, 2001).

O estudo populacional de Baltimore (TIELSCH et al, 1994) determinou que história familiar positiva para GPAA era um importante fator de risco para o desenvolvimento deste. Dezesesseis por cento (26/161) dos pacientes com GPAA referiram antecedente familiar positiva para glaucoma, enquanto o mesmo ocorreu em 7,21 % (371/5147) dos indivíduos do grupo controle. O risco relativo para desenvolvimento de GPAA em indivíduos com história familiar positiva para glaucoma (corrigido para idade e raça) foi de 2,85. A associação foi mais significativa entre irmãos, que apresentavam risco relativo corrigido de 3,69 e menor para os filhos, que mostravam risco relativo de 1,12.

LESKE et al (1995) estudaram a população de Barbados para determinar possíveis fatores de risco para a instalação do GPAA. Os autores obtiveram um risco relativo de 2,43 para os indivíduos com história familiar de glaucoma comparado à população normal sem antecedente. Este risco foi maior nos indivíduos de sexo masculino, alcançando o valor de 7,88. WU & LESKE (1997) avaliaram a mesma população e encontraram associação significativa entre PIOs mais elevadas e história familiar positiva, tanto em indivíduos do sexo masculino como do sexo feminino.

O estudo populacional de Rotterdam (WOLFS et al, 1998) determinou que a prevalência de glaucoma era de 10,4% nos irmãos de pacientes com GPAA, e 0,7 % nos irmãos de indivíduos do grupo controle. O risco de desenvolvimento de GPAA aos 80 anos foi de 22,0 % nos irmãos de pacientes acometidos pela doença e de 2,3% no grupo controle (risco relativo de 9,2). MICHELL, CUMMING, MACKAY (1999) avaliaram a importância

da história familiar positiva para o glaucoma na população investigada no Blue Mountain Eye Study. Dos 323 indivíduos com história familiar positiva, 18 (5,57%) apresentavam glaucoma e 32 (9,90%) hipertensão ocular. Considerando as 3331 pessoas sem antecedente familiar para o glaucoma, 90 (0,27%) apresentavam a moléstia e 128 (3,84%) apresentaram diagnóstico de hipertensão ocular.

Em estudo envolvendo populações de gêmeos monozigóticos e gêmeos dizigóticos (KALENAK & PAYDAR, 1995) observou que a média de variação da PIO entre os pares de gêmeos monozigóticos era menor que a média de variação da PIO entre os pares de gêmeos dizigóticos, sugerindo que fatores hereditários podem estar envolvidos na determinação da PIO. Em concordância com estes achados estão as observações de ARMALY (1965), que, avaliando 2394 indivíduos da população geral, constatou PIOs maiores no grupo de indivíduos com história familiar positiva para o glaucoma. BECKER, KOLKER, ROTH (1960) observaram, também, que os níveis de PIO eram maiores e a drenagem de humor aquoso era menor entre os parentes de pacientes glaucomatosos comparados à população sem glaucoma. TEIKARI et al (1987a) avaliaram dois pares de gêmeos monozigóticos quanto à ocorrência de GPAA. No primeiro par (idade = 69 anos), ambos os irmãos apresentavam GPAA, enquanto no segundo (idade = 57 anos) havia um indivíduo com diagnóstico definitivo de GPAA e outro com PIO elevada sem lesão de nervo óptico ou defeito de campo visual. O estudo populacional de gêmeos com GPAA na Finlândia avaliou a concordância de diagnóstico entre gêmeos monozigóticos e dizigóticos. Este estudo usou dados epidemiológicos governamentais sobre pares de gêmeos e pacientes que tinham assistência ao tratamento pelo estado. A maior concordância de diagnóstico de GPAA envolvendo pares monozigóticos indica que fatores genéticos têm seu papel no desenvolvimento da moléstia (TEIKARI, 1987b).

Avaliou-se uma possível relação entre história familiar de glaucoma e maior risco na progressão do dano glaucomatoso (KASS et al, 1980; WILSON et al, 1982; QUIGLEY et al 1994). Alguns estudos constataram tal associação, como o de KASS et al (1980), envolvendo pacientes com diagnóstico de hipertensão ocular e o de WILSON et al (1982), avaliando a progressão do dano glaucomatoso em 57 pacientes com GPAA. Entretanto, QUIGLEY et al (1994) identificaram os seguintes fatores de risco associados à progressão do dano glaucomatoso entre indivíduos com hipertensão ocular: idade, valores elevados de PIO e aspectos anatômicos do nervo óptico.

Os estudos supracitados sugerem que a presença de antecedente familiar está associada com um maior risco de desenvolvimento do GPAA e, possivelmente, com maior risco de progressão da moléstia.

## **4. Oftalmologia e Genética**

### **4.1. Introdução**

A Genética é a ciência da diversidade biológica. Nos últimos 45 anos, a genética humana evoluiu da diversidade fenotípica até chegar à variação do DNA propriamente dito. A genética médica é um ramo da genética humana que estuda a relação entre a diversidade biológica em humanos, saúde e doença. Dedicar-se à investigação de doenças que acometem pacientes e seus familiares, seu diagnóstico, prevenção e tratamento (MCKUSICK, 1992).

A evolução da genética médica permitiu determinar que as doenças podem apresentar um padrão monogênico de hereditariedade, que incluem os tipos autossômico dominante (AD), autossômico recessivo (AR), ligado ao sexo (ligado ao X) e mitocondrial; ou apresentar um padrão complexo de hereditariedade, que envolve mais de um gene e possíveis fatores ambientais na determinação etiológica da moléstia (herança poligênica

multifatorial). No padrão AD de herança, a presença de um alelo alterado (uma das versões alternativas de um gene que pode ocupar um determinado locus) 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 moléstia. Na herança mitocondrial, a transmissão genética dá-se através do DNA mitocondrial, presente somente nas células germinativas femininas, de modo que nenhum homem afetado transmite a doença (THOMPSON & THOMPSON, 1993a).

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 normalmente, 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. Por exemplo, se uma condição se expressar em 100% dos indivíduos que possuam o alelo responsável, este alelo apresentaria uma penetrância de 100%, ao passo que, se esta mesma condição estiver presente em 70% das pessoas portadoras do alelo mutante, isto corresponderia a uma penetrância de 70% para este alelo. Expressividade corresponde ao grau de severidade de uma moléstia 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 (MUSSARELLA, 1992; DAMJI & ALLINGHAM, 1997).

A oftalmologia e a genética estão historicamente associadas desde o início do século XX. Em 1911, WILSON deduziu que a deficiência da visão de cores estava localizada no cromossomo X. Em 1947, observou-se a ligação no padrão de transmissão hereditária entre

duas moléstias (hemofilia e deficiência de visão de cores) (DAMJI & ALLINGHAM, 1997). Em 1963, identificou-se a primeira moléstia humana ligada a um autossomo: catarata pulverulenta com grupo sanguíneo Duffy no cromossomo 1 (DAMJI & ALLINGHAM, 1997). A primeira doença humana a mostrar padrão de herança digênico, em que há necessidade de mutação em dois genes para a manifestação da moléstia, corresponde a um tipo de retinose pigmentar descrita por KAJIWARA, BERSON, DRIJA (1994).

Recentemente, com o desenvolvimento da biologia molecular, vários pesquisadores têm procurado identificar genes associados aos mais diversos tipos de moléstias humanas. Assim, um grande número de afecções oculares já tem seu locus (posição no cromossomo) e gene determinados através do mapeamento genético e da análise de ligação [**Tabela 1**].

É por meio da análise de ligação genética que um gene, cuja função é desconhecida, pode ser identificado e localizado no genoma. Dois genes ou um marcador e um gene são considerados ligados quando são transmitidos juntos de uma geração à outra sem a ocorrência de eventos de recombinação genética entre eles. Isto mostra que ambos estão no mesmo cromossomo a uma distância fisicamente próxima. A análise de ligação, portanto, calcula a probabilidade (L) de determinados marcadores cromossômicos herdados estarem associados (ligados) a uma determinada moléstia. Assim, define-se L como a razão entre a probabilidade de ligação e a probabilidade de não ligação entre os marcadores e a moléstia em estudo. Por conveniência, as probabilidades computadas são expressas em logaritmos de base 10 desta proporção, denominados *LOD scores*. Por convenção, valores de *LOD score* maiores que ou iguais a 3,00 (equivalentes a uma chance superior a 1000 : 1 a favor da ligação) sugerem ligação definitiva entre o marcador e a moléstia em estudo, ao passo

que valores de *LOD score* próximos a – 2,00 são suficientes para afastar esta possibilidade (THOMPSON & THOMPSON, 1993b; ZHANG et al, 1995).

A tabela 1 lista uma série de doenças oculares, com os respectivos padrões de transmissão, loci e genes. Várias destas moléstias já têm definido o gene responsável por seu desenvolvimento, enquanto em outras identificou-se somente o locus.

**Tabela 1.** Algumas afecções oculares e seus respectivos loci e genes.

Afeção Ocular	Padrão de Transmissão	Locus	Gene	Referência
Retinose Pigmentar	AD	3q21-24	RHO	INGLEHEARN et al (1992)
Retinose pigmentar	AD	6p21.1cen.	RDS	WELEBER et al, (1993)
Retinose pigmentar	AD		CRX	SOHOCKI et al (1998)
Retinose pigmentar	AD	14q11	NRL	BESSANT et al (1999)
Retinose pigmentar	AD	8q11-13	RP1	PIERCE et al (1999)
Retinose pigmentar	AR	4p16.3	PDE6B	DANCIGER et al (1995)
Retinose pigmentar	AR	6p21.3	TULP1	NORTH et al (1997)
Retinose pigmentar	AR	1p31	RPE65	MORIMURA et al (1998)
Retinose pigmentar	AR	5q31.2-34	PDE6A	HUANG et al (1995)
Retinose pigmentar	ligado ao X	Xp21.1	RPGR	MEINDL et al (1996)
Retinose pigmentar	ligado ao X	X11.3	RP2	SCHWAHN et al (1998)
Retinoblastoma	AD	13q14	RB1	FRIEND et al (1986)
Stargardt Fundus Flavimaculatus	AR	1p13-p21	ABCR	ALLIKMETS et al (1997)
Distrofia macular de Stargardt 2	AD	13q34	NI	ZHANG et al (1994)
Distrofia macular de Stargardt 3	AD	6q11-q14	NI	STONE et al (1994)
Doença de Best	AD	11q13	Bestrophin	PETRUKHIN et al (1998)
Neuropatia óptica de Leber	mitocondrial		ND4	HOWELL (1990)
Amaurose congênita de Leber	AR	17p13.3	GUCY2D	PERRAULT et al (1996)
Neuropatia óptica dominante	AD	3q28 e 18q	NI	VOTRUBA et al (1998)
DCGG1, DCRB, DCL1, DCA	AD	5q31	BIGH3	MUNIER et al (1997)
Distrofia corneana de Meesmann	AD	12q e 17q	K3 e K12	IRVINE et al (1997)
Distrofia corneana polimórfica posterior	AD	20q11	NI	HEON et al (1995a)
Distrofia corneana macular	AR	16q22	NI	VANCE et al (1996)
Catarata congênita (cerulean)	AD	22	$\beta$ crystalin	LITT et al (1997)
Catarata zonular pulverulenta	AD	1q	connexin50	SHIELS et al (1998)
Catarata congênita	AD	21q22.3	$\alpha$ crystalin	LITT et al (1998)
Catarata congênita	AD	10q25	PITX3	SEMINA et al (1998)
Catarata juvenil puntacta progressiva	AD	2q33-q35	$\gamma$ D-crystalin	STEPHAN et al (1999)
Catarata zonular pulverulenta	AD	13q	connexin46	MACKHAY et al (1999)
Catarata juvenil	AD	3q21-q22	BFSP2	CONLEY et al (2000)
Catarata congênita lamelar	AD	12q14	MIP	BARRETT et al (1988)

DCGG1: distrofia corneana granular Groenouw tipo 1, DCRB: distrofia corneana Reis-Bücklers, DCL1: distrofia corneana latices tipo 1, DCA: distrofia corneana de Avelino, NI: não identificado, Locus: número e bandeamento do gene, q: braço longo do cromossomo, p: braço curto do cromossomo

Do ponto de vista de saúde pública, existem dados sugerindo que doenças oculares com padrão de hereditariedade monogênético representam causas importantes de cegueira. Estudo avaliando causas de cegueira em uma população específica no Canadá (Newfoundland e Labrador, 1981 - 1984) (GREEN, BEAR, JOHNSON, 1986) através da revisão de prontuários obtidos junto ao *Canadian National Institute of the Blind*, observou que moléstias oculares com padrão de hereditariedade monogênético constituíam a principal causa de cegueira nesta população (24,30 % - 253/1041). Ao analisar a duração da cegueira das diversas moléstias, os autores observaram que as doenças causadas por alteração em um único gene causavam cegueira de maior duração (21 anos), seguidos pelo glaucoma (10 anos), degeneração macular relacionada com a idade (cinco anos) e retinopatia diabética (cinco anos). Os autores sugeriram que a freqüência elevada de cegueira causada por alteração monogênética poderia estar superestimada devido à possível subnotificação dos casos de cegueira causados por degeneração macular relacionada a idade, diabetes e glaucoma, uma vez que o registro destas doenças não é obrigatório. Além disto, estes valores podem ainda ser elevados por tratar-se de uma população específica, com pouca miscigenação.

A incidência de doenças oculares obtidas junto a um centro de aconselhamento genético foi de 135 casos em 10.484 pacientes avaliados em cinco anos. Destes 135 casos, 61 eram crianças acometidas por doença oculares, 30 queriam aconselhamento pré-nupcial e 44 eram gestantes para diagnóstico pré-natal. As moléstias mais freqüentemente encontradas foram: retinose pigmentar (n = 16), catarata congênita (n = 14), luxação de cristalino (n = 12), miopia (n = 13), doenças metabólicas associadas com déficit visual (n = 10), microftalmia (n = 9), estrabismo (n = 8), retinoblastoma (n = 7) e glaucoma congênito (n = 6) (ELÇIOGLU, ELÇIOGLU, FUHRMANN, 1995).

## **4.2. Glaucoma e Genética**

### **4.2.1. Classificação**

A classificação proposta pela Organização Mundial do Genoma Humano designa para os genes associados ao glaucoma a sigla “GLC” (RAYMOND, 1997). Os números “1”, “2” e “3” que seguem a sigla geral para os glaucomas representam ângulo aberto, ângulo estreito 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). Assim, o primeiro locus identificado em associação com GPAA recebeu o nome GLC1A, enquanto o primeiro locus relacionado para o glaucoma congênito foi denominado GLC3A.

### **4.2.2. Glaucoma Congênito Primário**

#### **4.2.2.1. Padrão de Herança**

O glaucoma congênito primário (GCP) geralmente desenvolve-se nos primeiros anos de vida com um quadro clínico clássico caracterizado por epífora, blefaroespasmos, fotofobia e buphthalmos (DELUISE & ANDERSON, 1983). A elevação da PIO ocorre devido à má formação do seio cameral impedindo o escoamento adequado do humor aquoso. A incidência do GCP varia de acordo com a população estudada de 1:2.500 a 1:22.000 nascimentos (GENCIK, GENCIKOVA, FERAK, 1982; GENCIK, 1989; WAGNER, 1993). O GCP, que acomete ambos os olhos em 75% dos casos, apresenta componente hereditário em aproximadamente 10%, predominando o padrão AR de transmissão (DELUISE & ANDERSON, 1983; FRANÇOIS, 1980) sobre os padrões AD e multifatorial (MERIN & MORIN, 1972; BRIARD et al, 1976).

BRIARD et al (1976) estudaram 10 famílias com GCP, das quais duas com três gerações e uma com quatro gerações acometidas, sugerindo padrão AD de herança. MERIN & MORIN (1972) avaliaram 64 famílias de pacientes acometidos por GCP. Nove das 64 famílias apresentaram mais de um membro com GCP; em três destas, observou-se um dos pais afetados e em quatro havia somente irmãos acometidos. Nas duas famílias restantes, constatou-se a presença de GCP em dois pares de gêmeos monozigóticos. O baixo número de irmãos acometidos neste estudo fez com que os autores sugerissem o padrão poligênico multifatorial de transmissão hereditária para o GCP. Por outro lado, FRANÇOIS (1980) sugeriu que o padrão AR era o principal tipo de herança no GCP. Segundo FRANÇOIS (1980), os casos com perfil AD seriam, em realidade, casos de pseudodominância, enquanto os GCP com padrão aparentemente poligênico de hereditariedade seriam casos com herança AR com penetrância variável. Estas observações apoiaram-se na existência de alta concordância entre os gêmeos monozigóticos e ausência de concordância para os gêmeos dizigóticos.

#### **4.2.2.2. Biologia Molecular**

Em 1995, SARFARAZI et al avaliaram 17 famílias provenientes da Turquia que apresentavam de dois a nove membros afetados com GCP bilateral. Observou-se nesses heredogramas, padrão AR de herança, reforçado pela existência de casamento consanguíneo em 10 das 17 famílias. Através da estratégia de clonagem posicional, os autores identificaram o primeiro locus (GLC3A) para o GCP no braço curto do cromossomo 2 (2p21), compartilhado por 11 famílias (*LOD score* de 11,50). A transmissão do GCP nas seis famílias restantes não estava associada a este locus, indicando que o GCP tem um componente heterogêneo, ou seja, mais de um gene deve estar envolvido na

determinação da moléstia. Estudo subsequente demonstrou que o locus GLC3A era responsável por cerca de 85 a 90 % dos GCPs com história familiar positiva (SARFARAZI, 1997).

Posteriormente, o mesmo grupo de autores identificou em cinco famílias de origem turca o gene CYP1B1 como o gene relacionado ao GCP ligado ao locus GLC3A. Identificaram-se três diferentes mutações em homozigose que acarretavam o deslocamento na leitura da sequência do gene CYP1B1, o que poderia resultar em alelos funcionalmente nulos (STOILOV, AKARSU, SARFARAZI, 1997). Outras mutações de ponto em regiões altamente conservadas do gene CYP1B1 já foram relatadas em diferentes grupos populacionais (BEJJANI et al, 1998; STOILOV et al, 1998; PLASILOVA et al, 1999), incluindo a população brasileira (STOILOV et al, 2001). O gene CYP1B1, composto por três exons totalizando 1629 pares de bases (pb), codifica a proteína P4501B1, pertencente à família do citocromo P450 e envolvida no metabolismo do oxigênio, ácido aracdônico e na gênese de esteróides (SARFARAZI, 1997). Entretanto, o papel da proteína P4501B1 na etiologia do GCP não está totalmente esclarecido (SARFARAZI, 1997).

Outro locus (GLC3B) no cromossomo 1 (1p36) foi descrito recentemente, envolvendo quatro de oito famílias com GCP não ligadas ao locus GLC3A, o que demonstra no mínimo a presença de três loci associados ao GCP (AKARSU et al, 1996).

### **4.2.3. Glaucomas Associados à Mal Formação do Segmento Anterior (Glaucomas de Desenvolvimento)**

Os glaucomas de desenvolvimento ocorrem devido à mal formação dos tecidos mesenquimais (estroma iriano, ângulo írido-corneano, endotélio e estroma da córnea), associados ou não a alterações de tecidos ectodérmicos (cristalino) (DIAS, 1998).

#### **4.2.3.1. Aniridia e Anomalia de Peters**

A aniridia é uma das anomalias do desenvolvimento ocular que podem cursar com glaucoma. O glaucoma na aniridia pode manifestar-se até a terceira década de vida dependendo do mecanismo responsável pela redução do escoamento do humor aquoso, que pode ser devido à mal formação do seio camerular (início mais precoce do glaucoma) ou à obstrução do mesmo por sinéquias estabelecidas pelo coto da íris (início mais tardio) (MINTZ-HITTNER, 1996). A aniridia pode ser herdada na forma AD ou aparecer esporadicamente. Em 1991, a aniridia foi associada a alterações no gene PAX6 (TON et al, 1991), localizado no cromossomo 11p13. O gene PAX6 tem uma seqüência codificadora de 2,7 kilobase (kb) e parece ser o principal gene no controle do desenvolvimento ocular no reino animal (TOMAREV et al, 1997). A anomalia de Peters, caracterizada por opacidade corneana central com desarranjo do segmento anterior do globo ocular (íris, seio camerular, câmara anterior e algumas vezes do cristalino), é outra moléstia associada a alterações no gene PAX6 (FRIEDMAN & WALTER, 1999) e que pode evoluir para o glaucoma em 50 a 70 % dos casos (SCHOTTENSTEIN, 1996).

#### 4.2.3.2. Axenfeld-Rieger e Iridogoniodisgenesia

A anomalia de Axenfeld-Rieger, descrita primeiramente por AXENFELD em 1920 e depois por RIEGER em 1934, apresenta manifestações oculares que incluem hipoplasia da íris, embriotóxon posterior com traves irianas a ele aderidos. Esta última característica distingue a anomalia de Axenfeld-Rieger da iridogoniodisgenesia, outra entidade que cursa com desenvolvimento anormal do segmento anterior do globo ocular e glaucoma. Quando tais distúrbios oculares são acompanhados por alterações sistêmicas como hipodontia, hipoplasia maxilar, hipertelorismo entre outras, damos o nome de síndrome de Axenfeld-Rieger e síndrome da iridogoniodisgenesia, respectivamente (MEARS et al, 1996; FRIEDMAN & WALTER, 1999). O mecanismo de aumento da PIO nestas entidades é secundário ao desenvolvimento incompleto da malha trabecular e à inserção alta do tecido uveal. O glaucoma se manifesta durante a infância ou em adultos jovens em cerca de 50% dos casos, dependendo da extensão das alterações no sistema de drenagem do humor aquoso (SHIELDS, 1996).

Apesar das características oculares em comum e do mesmo padrão AD de transmissão, os genes mapeados envolvidos nestas entidades estão localizados em loci diferentes (FRIEDMAN & WALTER, 1999). Um deles, descrito por MEARS et al (1996) e confirmado por GRAFF et al (1997) em indivíduos com iridogoniodisgenesia, está mapeado no cromossomo 6p25, numa região de extensão equivalente a 6 cM. Este locus foi posteriormente denominado IRID1. MEARS et al (1998) estudaram cinco famílias com iridogoniodisgenesia ligadas ao locus 6p25 (IRID1) e 16 pacientes não relacionados apresentando outras disgenesias do segmento anterior e glaucoma. Nos pacientes com anomalia de Axenfeld-Rieger, os autores identificaram mutações no gene FKHL7 (locus 6p25), pertencente à família *forkhead/winged-helix*, que participa na embriogênese de

vertebrados e invertebrados (KAUFMANN & KNOCHEL, 1996). Tais achados foram ratificados por NISHIMURA et al (1998).

Os loci associados à síndrome de Axenfeld-Rieger (RIEG1) e à síndrome de iridogoniodisgenesia (IRID2) estão localizados no cromossomo 4q25 (MURRAY et al, 1992; HÉON et al, 1995b; DATSON et al, 1996; WALTER et al, 1996). Mutações no gene PITX2 (locus 4q25) foram identificadas em pacientes com a síndrome de Axenfeld-Rieger (SEMINA et al, 1996) e em duas famílias com síndrome de iridogoniodisgenesia (ALWARD et al, 1998a; KULAK et al, 1998). O gene PITX2 codifica uma proteína de 217 aminoácidos de extensão, que parece atuar no processo de transcrição ao ligar-se ao DNA (BEEBE, 1994), assim como na determinação da assimetria corporal entre os vertebrados (PIEDRA et al, 1998; YOSHIOKA et al, 1998). PHILIPS et al (1996), ao avaliarem uma família com onze indivíduos afetados, descreveram um segundo locus para a síndrome de Axenfeld-Rieger (RIEG2) no cromossomo 13q14 (extensão = 26 cM).

Em resumo, tanto a síndrome de Axenfeld-Rieger como síndrome de iridogoniodisgenesia são afecções alélicas (localizadas no mesmo gene). O mesmo não se pode dizer em relação às anomalias de Axenfeld-Rieger e iridogoniodisgenesia. Embora ambas compartilhem o mesmo locus (6p25), mutações no gene FKHL7 foram identificadas apenas entre os indivíduos com anomalia de Axenfeld-Rieger (FRIEDMAN & WALTER, 1999).

#### **4.2.4. Glaucomas Secundários**

##### **4.2.4.1. Glaucoma Pigmentar**

O glaucoma pigmentar é associado à síndrome de dispersão pigmentar, caracterizada por atrito entre os feixes zonulares e o epitélio pigmentar da íris, que leva à dispersão de grânulos de pigmento e posterior acúmulo destes nas estruturas do segmento anterior do globo ocular (RITCH, 1997). Nestes pacientes, a face posterior da íris frequentemente se mostra deslocada posteriormente, o que facilita o contato entre estas estruturas (CAMPBELL, 1979; KAMPIK et al, 1981). A tríade de diagnóstico clássica compreende a pigmentação do endotélio corneano, transiluminação da íris periférica e pigmentação densa da malha trabecular (RITCH, 1997). O glaucoma pigmentar é caracterizado pela ocorrência de dispersão pigmentar e aumento da PIO, que potencialmente pode desencadear dano glaucomatoso ao nervo óptico. Acomete preferencialmente indivíduos míopes do sexo masculino durante a terceira e quarta décadas de vida (RICHTER, RICHARDSON, GRANT, 1986). ANDERSEN et al (1997) estudaram quatro famílias de origem iraniana com síndrome de dispersão pigmentar (total de 28 indivíduos afetados) e demonstraram que o gene responsável está localizado no locus 7q35-q36, em uma região de 10 cM. Um segundo locus foi subsequentemente identificado no cromossomo 18 (18q11-q21) (ANDERSEN et al, 1998).

##### **4.2.4.2. Glaucoma Cortisônico**

Define-se como glaucoma cortisônico um glaucoma de ângulo aberto desencadeado pelo uso de corticoesteróides tópicos ou sistêmicos (SKUTA & MORGAN, 1996), provavelmente em decorrência de alterações morfológicas e funcionais das células trabeculares e da matriz extracelular circundante (KIMURA & HONDA, 1982;

WORDINGER & CLARK, 1999). O aumento da PIO secundário ao uso de corticoesteróides é dependente da potência, dose, duração do tratamento, via de administração e susceptibilidade individual à cortisona (CLARK, 1995).

Em 1965, ARMALY avaliou 80 indivíduos normais submetidos à instilação tópica de dexametasona 0,1% durante um período de quatro semanas. O autor constatou três níveis de resposta pressórica à cortisona: o primeiro incluiu indivíduos que apresentaram aumento da PIO de até 5 mmHg (66,2%), o segundo mostrou elevação da PIO entre 6 e 15 mmHg (28,8%) e o terceiro incluiu indivíduos onde a elevação da PIO foi superior a 15 mmHg (5%). BECKER (1965) observou que 30% dos indivíduos normais (15/50) apresentaram PIOs maiores do que 20 mmHg após o uso da betametasona durante seis semanas. Este valor alcançou 98% (49/50) entre indivíduos suspeitos para o glaucoma e 100% no grupo de pacientes com GPAA.

Baseado no aumento da PIO relacionada ao uso da cortisona, BECKER (1965) sugeriu que o padrão de transmissão do GPAA fosse AR, onde o genótipo gg (recessivo) estaria associado ao GPAA, e o genótipo ng (heterozigose) representaria os portadores do gene glaucomatoso. ARMALY (1965), descreveu três genótipos para a resposta pressórica à cortisona:  $P^L P^L$  ( $P^L$  = alelo de resposta diminuída a cortisona),  $P^L P^H$  (resposta intermediária) e  $P^H P^H$  ( $P^H$  = alelo de resposta aumentada à cortisona). A possível associação entre o aumento da PIO em resposta aos corticoesteróides e o componente genético do GPAA não foi comprovada por estudos envolvendo gêmeos, onde detectou-se uma concordância abaixo da esperada para o teste da cortisona (SCHWARTZ et al, 1973a; SCHWARTZ et al, 1973b). Apesar disto, indivíduos altamente responsáveis à cortisona estão sob maior risco de desenvolver o GPAA (KITAZAWA & HORIE, 1981; LEWIS et al, 1988).

KITAZAWA & HORIE (1981) avaliaram um grupo de 22 indivíduos normais que apresentaram aumento importante da PIO com o uso prolongado de cortisona tópica (quatro vezes ao dia por quatro semanas) durante um período de 10 anos e constataram que cinco destes indivíduos evoluíram como hipertensos oculares (PIO maior do que 21 mmHg), dos quais dois mostraram sinais precoces de dano glaucomatoso ao disco óptico. Os autores concluíram que este grupo de pacientes estaria sob risco maior de desenvolver a moléstia. O mesmo foi observado por LEWIS et al (1988) ao estudarem 788 indivíduos submetidos ao teste da cortisona por um período mínimo de cinco anos. Do grupo de indivíduos (n = 276) que responderam ao uso da cortisona com PIOs maiores do que 31 mmHg, 13% desenvolveram GPAA. Esta porcentagem reduziu-se para 3,4% entre os 261 indivíduos que apresentaram aumento da PIO entre 20 e 31 mmHg e foi de 0% no grupo de 251 indivíduos que não responderam à cortisona. Outro estudo constatou que o uso da cortisona oral em pacientes idosos estava associado a um maior risco de desenvolvimento de GPAA e hipertensão ocular (risco relativo de 1,41) (GARBE et al, 1997).

#### **4.2.4.3. Glaucoma Pseudoexfoliativo**

O glaucoma pseudoexfoliativo é outra forma de glaucoma secundário de ângulo aberto que desenvolve-se tardiamente (na sexta e sétima décadas de vida), como complicação da síndrome de pseudoexfoliação (NAUMANN, SCHLÖTZER-SCHREHARDT, KUCLE, 1998). A síndrome pseudoexfoliativa consiste na presença de material amilóide-fibrilar proveniente da matriz extracelular, que se acumula em estruturas do segmento anterior do globo ocular bem como em tecidos extra-oculares (NAUMANN et al, 1998). A presença deste material na malha trabecular ocasiona uma disfunção do sistema de drenagem do humor aquoso, que culmina com a elevação da PIO e dano

glaucomatoso ao disco óptico (NAUMANN et al, 1998). Dois loci associados à síndrome de pseudoexfoliação e ao glaucoma pseudoexfoliativo foram descritos, avaliando-se famílias de origens britânica e canadense: o primeiro deles no braço curto do cromossomo 2 (2p16) com padrão de herança AD (WIGGS et al, 1998a) e o outro sugerindo padrão de herança mitocondrial (DAMJI et al, 1998). No entanto, os genes associados a estas condições não foram identificados.

#### **4.2.5. Glaucoma Primário de Ângulo Estreito**

O glaucoma primário de ângulo estreito (GPAE), é uma forma de glaucoma que cursa com PIO elevada devido ao bloqueio crônico ou agudo do seio camerular através de aderências entre este e a íris periférica (RITCH & LOWE, 1996). Assim como o GPAA, existem fatores de risco associado ao GPAE tais como idade, sexo, raça, câmara anterior rasa e catarata avançada (SPAETH, 1995). Todos estes fatores favorecem a instalação do bloqueio pupilar relativo, que impede o livre fluxo de humor aquoso através da pupila até seu escoamento pelo seio camerular (RITCH & LOWE, 1996). O antecedente familiar positivo inclui-se como um dos fatores de risco para desenvolvimento da moléstia (SPAETH, 1995; RITCH & LOWE, 1996).

KELLERMAN & POSNER (1955) avaliaram 48 olhos de familiares de pacientes com GPAE. Os autores constataram que 25% (12/48) dos olhos apresentavam ângulo oclusível, sugerindo a presença de um componente genético na determinação das características anatômicas do seio camerular (ângulo estreito). Corroborando com esta observação, PERKINS (1974) avaliou 67 familiares de pacientes com GPAE e encontrou quatro indivíduos acometidos (5,97%), todos pertencentes ao sexo feminino, três dos quais apresentavam idade superior a 60 anos.

Apesar dos padrões AD (MILLER, 1970) e AR (WEEKERS, GOUNGARD-RION, GOUNGARD, 1955) já terem sido descritos para o GPAA, admite-se o padrão poligênico multifatorial como o mais aceito para este tipo de glaucoma (TEIKARI, 1988; NETLAND WIGGS, DREYER, 1993). No entanto, até o presente momento, nenhum locus foi identificado para o GPAA.

#### **4.2.6. Glaucoma Primário de Ângulo Aberto**

##### **4.2.6.1. Padrão de Herança**

A possibilidade da predisposição genética para o glaucoma foi descrita pela primeira vez por BENEDICT que, em 1842, relatou a ocorrência da moléstia em duas irmãs. Desde então, varias famílias com glaucoma têm sido descritas na literatura. Salientamos que a classificação dos glaucomas no início século XX difere da atual, dificultando a comparação entre os diversos heredogramas estudados. Em boa parte das publicações do início do século, o termo glaucoma crônico simples era utilizado preferencialmente em relação ao termo GPAA (SCHMIDT-RIMPLER, 1908).

HARLAN (1885) descreveu uma família com membros acometidos por glaucoma em cinco gerações consecutivas, com início da moléstia ocorrendo preferencialmente entre os 10 e 20 anos de idade. Em 1914, CALHOUN descreveu uma família de três gerações, com diagnóstico de glaucoma crônico simples em nove indivíduos com menos de 30 anos de idade, onde todos necessitaram de procedimento cirúrgico para o controle da moléstia. Outro heredograma, descrito por BERG (1932), e que incluía sete gerações, revelou a presença de 22 pacientes com glaucoma simples em um total de 54 indivíduos. Nesta família, determinou-se que o padrão de transmissão era AD e que o início do glaucoma ocorria ao redor da terceira década de vida. O padrão de herança AD também foi observado

por ZORAB (1932), que descreveu uma família de três gerações com glaucoma crônico simples. Dos 22 membros desta família, sete apresentaram glaucoma, dos quais quatro desenvolveram a moléstia com mais de 40 anos de idade. Este autor foi o primeiro a sugerir que, ao se observarem dois membros de uma família com glaucoma, deve-se examinar cuidadosamente os demais membros para se obter um diagnóstico precoce da moléstia.

No início da década de 30, BELL (1932) estudou 3021 casos de glaucoma primário, incluindo 279 casos de glaucoma familiar. A distribuição por sexo apresentava discreto predomínio do sexo masculino no grupo familiar (54% versus 46%). Em relação à idade de aparecimento, os glaucomas familiares surgiam cerca de 20 anos mais cedo e 52% ocorriam antes dos 30 anos de idade, contra 3,6% da série geral (2742 pacientes). BIRÓ (1939) avaliou 761 pacientes com glaucoma de um total de 9666 indivíduos que passaram por exame oftalmológico (7,76%). Dos 761 pacientes, 43 (5,65%) apresentaram história familiar positiva para o glaucoma. Estes 43 pacientes pertenciam a 36 famílias, que foram divididas em: cinco famílias com glaucoma presente apenas entre irmãos (sugerindo transmissão AR), 27 famílias com glaucoma presente em duas gerações e quatro famílias com glaucoma presente em três gerações. A idade de aparecimento da moléstia situava-se ao redor de 50-60 anos no grupo onde o glaucoma manifestava-se em duas gerações e diminuía nas quatro famílias com três gerações consecutivas da moléstia (sugerindo padrão AD). Em 1940, STOCKES publicou uma série de cinco heredogramas de glaucoma primário, com instalação variando desde a adolescência até a idade adulta e com padrão AD de hereditariedade.

O primeiro estudo a incluir a avaliação do seio camerular por meio da gonioscopia em uma família com glaucoma crônico simples foi realizado por ALLEN & ACKERMAN (1942). Nesta família, o padrão de herança era AD, com a razão entre afetados e não

afetados próxima a 50 %. A média da idade ao diagnóstico foi de 11,6 anos, e os níveis de PIO variaram entre 30 e 40 mmHg.

POSNER & SCHLOSSMAN (1949) avaliaram 373 casos de glaucoma primário, dos quais 51 (13,5%) apresentaram história familiar da moléstia. Estes indivíduos pertenciam a 30 diferentes famílias com um ou mais parentes afetados. Com exceção de um heredograma que apresentava padrão de transmissão hereditária AR, os demais eram do tipo AD, com penetrância calculada entre as famílias com no mínimo dois membros afetados de 74 a 80%. Os autores sugeriram que casos de glaucoma esporádico pudessem incluir um componente genético AR, garantido pela presença de alelos relativamente freqüentes na população geral. WAARDENBURG (1950) reforçou esta teoria ao descrever uma família com glaucoma e padrão de transmissão hereditária AR, além de famílias de pacientes com glaucoma esporádico e pais consangüíneos. Outro estudo realizado por BIRÓ (1951) avaliou o padrão hereditário de 125 pacientes com glaucoma. O autor observou 16 pacientes (12,8%) com história familiar pertencentes a 10 heredogramas, dos quais seis apresentaram padrão AD e quatro padrão AR. Apesar de sugerir precaução diante de suas conclusões devido ao pequeno número de pacientes avaliados, BIRÓ propôs que o padrão de transmissão AR fosse mais freqüente que o anteriormente observado na literatura.

SVEINSSON (1959) avaliando na Groelândia 1544 pacientes glaucomatosos, encontrou em 724 casos (46,8%) um componente familiar, incluindo padrões de hereditariedade do tipo AD, AR e até mesmo ligado ao sexo. Uma família com 1261 membros distribuídos em seis gerações foi descrita por COTÉ et al (1968). Dos 1261 membros, 112 foram avaliados, dos quais 56 (50%) apresentaram glaucoma crônico simples. A análise do heredograma revelou tratar-se de padrão AD de hereditariedade. SHIN

et al (1977), observaram história familiar positiva para glaucoma em 50% dos indivíduos (75/150) com GPAA, e em 43% (38/88) dos hipertensos oculares. O antecedente materno para o glaucoma estava presente em 27% (41/150) e o antecedente paterno em 4% (6/150), enquanto 3% apresentavam antecedentes paterno e materno e 16% (24/150) possuíam irmãos e parentes de primeiro grau entre os pacientes com GPAA. Os indivíduos com hipertensão ocular apresentavam equilíbrio entre o lado materno e paterno de transmissão hereditária (17% em ambos). Baseado em seus achados, os autores sugeriram a possibilidade de fator citoplasmático maternal na transmissão e patogênese do glaucoma.

A determinação do padrão de hereditariedade através do estudo de famílias é muitas vezes comprometido devido ao pequeno número de gerações avaliadas. CROMBIE & CULLEN (1964) observaram que, em uma condição como o glaucoma, com prevalência relativamente alta na população, a presença de duas gerações sucessivas afetadas pela moléstia não é suficiente para estabelecer o padrão dominante, uma vez que isto pode ocorrer devido à união entre um indivíduo afetado com caráter recessivo em homozigose e outro não afetado, mas portador do alelo em heterozigose, caracterizando o que se denomina pseudo-dominância.

Até o presente momento, todos os estudos citados referem-se a glaucomas onde a PIO é elevada. SANDVIG (1961) estudou de forma minuciosa, incluindo fotografias da papila, campos visuais e avaliação neurológica, uma família com glaucoma de pressão normal e observou um padrão AD de hereditariedade (quatro gerações) com a moléstia manifestando-se entre os 20 e 35 anos de idade. Outra família com mesmo diagnóstico foi avaliada por BENNETT et al (1989), incluindo seis gerações com perfil AD de hereditariedade e idade de manifestação da moléstia ao redor da terceira e quarta décadas.

Apesar de vários trabalhos na literatura sugerirem que o GPAA seja herdado segundo padrões de herança mendeliana, a grande maioria dos pacientes não apresenta este padrão de transmissão hereditária (ADAM, 1997). Estudos com pares de gêmeos dizigóticos e monozigóticos avaliando o componente genético para o GPAA sugerem a ocorrência de padrão poligênico multifatorial para a moléstia (TEIKARI, 1987, 1990). Esta teoria já havia sido postulada por ARMALY (1967a, 1967b, 1968) e JAY & PATERSON (1970) e poderia justificar a baixa prevalência da moléstia de 2,5% a 13,5% entre os parentes de pacientes com GPAA (NETLAND et al, 1993).

#### **4.2.6.2. Biologia Molecular**

Em 1993, SHEFFIELD et al estudaram, por meio de análise de ligação, uma família de cinco gerações que apresentava GPAA-J, na tentativa de identificar o gene associado a esta forma de glaucoma. Mais de 90 marcadores do tipo microssatélites (*short tandem repeat polymorphisms*) foram avaliados neste heredograma antes da determinação da ligação de marcadores com o braço longo do cromossomo 1. Posteriormente, a análise de ligação mais restrita, englobando um número maior de membros da família e usando 33 marcadores do cromossomo 1, demonstrou ligação significativa com oito deles (LOD score variando de 3,1 a 6,5) e indicou que o locus para aquela forma de glaucoma estava localizado em uma região com aproximadamente 20 cM entre os marcadores D1S191 e D1S194. Portanto, o primeiro locus para o GPAA foi identificado no braço longo do cromossomo 1 (1q21-q23), posteriormente denominado GLC1A.

No ano seguinte, RICHARDS et al (1994) estudaram uma família caucasiana com 31 membros, dos quais 16 apresentavam GPAA-J. Através de análise de ligação, observou-se que o glaucoma nesta família estava associado de maneira estatisticamente significativa

com o cromossomo 1q em seis marcadores, sendo o maior LOD score (8,38) alcançado pelo marcador D1S210. A análise dos haplótipos recombinantes sugeriu uma região de 14 cM entre os marcadores D1S194 e D1S218 no locus 1q21-q31. Três heredogramas de origem irlandesa e inglesa com GPAA-J (n = 36) foram avaliados por WIGGS et al (1994). Por meio da análise de ligação, obteve-se uma associação do glaucoma com o locus 1q21-q31, compreendendo um intervalo de 12 cM entre os marcadores D1S196 e D1S212. Em outra família com GPAA-J (38 indivíduos / 21 afetados) de origem dinamarquesa, observou-se a ligação da moléstia com o locus 1q21-q31, sendo o maior LOD score (6,67) obtido no marcador D1S210 (GRAFF et al, 1995).

MORISSETTE et al (1995) avaliaram uma grande família franco-canadense, que compreendia mais de 1261 indivíduos distribuídos em sete gerações, onde o fundador do sexo masculino tornou-se cego aos 50 anos. Um dos ramos da família era composto por 128 membros de quatro gerações mais recentes. Realizou-se o diagnóstico de glaucoma na maioria dos pacientes entre 25 e 35 anos de idade, o que justificou que fossem considerados como tendo GPAA-J. No entanto, quatro indivíduos manifestaram glaucoma após os 40 anos de idade, o que os classificaria como GPAA-A. Tanto os pacientes com GPAA-J como os pacientes com GPAA-A estavam ligados de forma significativa a seis marcadores da região 1q23-q25, com um LOD score máximo de 6,62 para o marcador M278YE5. Eventos de recombinação confinaram a região associada à moléstia a um intervalo de 9 cM entre os marcadores D1S445 e D1S416/D1S480. Os autores demonstraram que o gene associado ao locus GLC1A era responsável tanto pelo GPAA-J como pelo GPAA-A e que, nesta família, a separação por faixa etária destas duas entidades era artificial. Outra família de origem francesa composta por 82 membros com GPAA associada ao gene GLC1A também mostrou uma variação na idade de diagnóstico que ultrapassava o limite dos 40

anos de idade (MEYER et al, 1996). Nesta família, o diagnóstico da moléstia foi realizado entre 11 e 51 anos de idade. Uma outra família caucasóide proveniente dos EUA com GPAA associado ao locus GLC1A e avaliada por JOHNSON et al (1996) mostrou um fenótipo mais homogêneo, com faixa etária de diagnóstico variando entre 16 e 46 anos de idade. A análise dos haplótipos recombinantes permitiu restringir um pouco mais o intervalo do locus GLC1A para 8 cM. Os autores sugeriram que diferenças de expressão entre famílias com GPAA associado ao locus GLC1A devido a heterogeneidade alélica ainda estavam por ser determinadas. Em outras palavras, uma vez identificado o gene, diferentes mutações possivelmente resultariam em variações no quadro clínico do glaucoma.

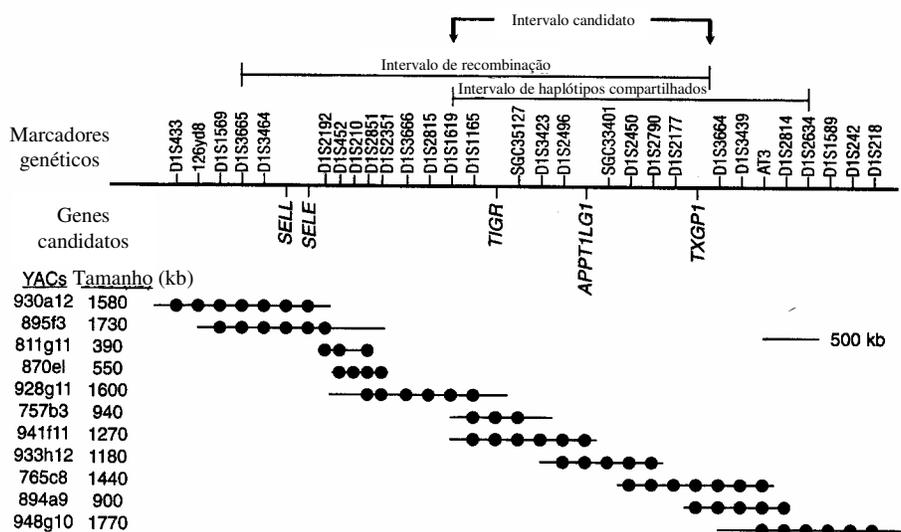
Sete heredogramas incluindo descendentes de irlandeses, britânicos e alemães e uma família originária do Pacífico Sul foram avaliados por WIGGS et al (1995). Cinco destas famílias apresentavam GPAA-J associado ao locus GLC1A e compartilhavam semelhanças fenotípicas. Um dos heredogramas não ligado à região 1q21-q31 apresentava indivíduos com início do glaucoma mais precoce e com PIOs mais baixas. O outro heredograma não associado ao locus GLC1A era fenotipicamente semelhante às cinco famílias ligadas, excluindo-se o fato de seus componentes pertencerem à raça negra. Famílias de origem hispânica com GPAA-J também apresentaram ligação com o locus GLC1A (WUDUNN, PARRISH, INANA, 1996; LICHTER et al, 1997).

BRÉZIN et al (1997) avaliaram 60 pacientes (45 com GPAA e 15 com hipertensão ocular) pertencentes a oito famílias francesas. Das oito famílias avaliadas, quatro apresentaram ligação com o locus GLC1A, duas não revelaram associação com este locus e duas apresentaram dados inconclusivos. As famílias que mostraram associação com o locus GLC1A apresentaram glaucoma mais severo.

BELMOUDEN et al (1997), avaliando novos haplótipos recombinantes, reduziram a região do locus GLC1A para 3 cM entre os marcadores D1S452/NGA1/D1S210 e NGA5. Através da construção de cromossomo artificial de levedura contendo a região selecionada pela recombinação de haplótipos, os autores excluíram uma série de genes localizados próximos a esta região e abriram a possibilidade de, com o uso da clonagem posicional, identificar-se o gene associado ao locus GLC1A.

Finalmente, em 1997, STONE et al identificaram o gene associado ao locus GLC1A. Inicialmente, observando recombinações entre marcadores altamente polimórficos e os fenótipos de glaucoma em dois heredogramas com GPAA-J, os autores lograram confinar em 3 cM a região responsável no cromossomo 1q (entre os marcadores D1S3665 e D1S3664). Esta região foi posteriormente restrita ao intervalo entre os marcadores D1S1619 a D1S3664 através da avaliação de haplótipos compartilhados. Cinco genes candidatos contidos no intervalo de recombinação foram determinados através de mapeamento usando cromossomos artificiais de levedura e *sequence tagged site*. Dois destes genes, *selectin E* (SELE) (*GenBank accession number* M24736) e *selectin L* (SELL) (*GenBank accession number* M25280) foram excluídos, pois estavam fora do intervalo constituído pelos haplótipos compartilhados. Dos três genes restantes (TXGP1 - *GenBank accession number* MD90224, APT1LG1 e TIGR (trabecular meshwork-induced glucocorticoid response) - *GenBank accession number* R95491), dois (APT1LG1 e TIGR) foram selecionados para o rastreamento de mutações em famílias de pacientes com GPAA-J [Figura 1]. Não foram observadas variações na sequência do gene APT1LG1 nestes pacientes. Entretanto, mutações no gene TIGR foram detectadas em cinco das oito famílias com GPAA-J. Duas mutações de ponto foram identificadas: a substituição de uma tirosina por uma histidina no codon 430 (Tyr430His) e a troca de uma glicina por uma valina no

codon 357 (Gly357Val). Observou-se, também, uma mutação do tipo sem sentido, que produz uma proteína de menor tamanho (Gln361Stop) em duas famílias. Os autores posteriormente realizaram um rastreamento de mutações no gene TIGR em quatro grupos diferentes compostos por 227 pacientes com GPAA e história familiar positiva, 103 pacientes com GPAA sem história familiar, 380 indivíduos da população geral e 91 voluntários sem glaucoma. As frequências de mutações no gene TIGR foram de 4,4%, 2,9%, 0,3% e 0% nos respectivos grupos. Estes resultados sugeriam que a participação, embora pequena, de mutações no gene TIGR entre os pacientes com GPAA, era importante devido à alta prevalência de GPAA na população. Os autores concluíram ser a mutação no gene GLC1A (TIGR) a causa mais freqüente de cegueira com base molecular conhecida.



**Figura 1.** Esquema da região candidata associada ao GPAA-J (GLC1A) no cromossomo 1, construída a partir de cromossomos artificiais de levedura (YAC), incluindo os genes SELL, SELE, TIGR, APT1LG1 e TXGP1. Os círculos cheios indicam a posição dos marcadores. A região candidata encontra-se delimitada pelos marcadores D1S1619 e D1S3664 e contém o gene TIGR (STONE et al, 1997).

Desde então, estudos com diversas famílias portadoras de GPAA têm sido realizados na tentativa de identificar novos loci e genes para esta moléstia. Duas famílias (uma de origem grega) com GPAA e padrão de hereditariedade AD não apresentaram ligação com o locus GLC1A, o que sugere a existência de, no mínimo, dois loci para esta doença (AVRAMOPOULOS et al, 1996; RICHARDS et al, 1996).

STOILOVA et al (1996) analisaram um grupo de 17 famílias caucasianas do Reino Unido composto por 203 indivíduos, sendo que 90 apresentavam GPAA. O padrão de transmissão hereditária era do tipo AD, porém a idade de instalação do glaucoma era variável (20 a 68 anos) e as PIOs mais baixas (no máximo 30 mmHg), caracterizando, assim, um fenótipo diferente daquele descrito para o GPAA-J. A análise de ligação nestes heredogramas identificou um novo locus (GLC1B) para o GPAA, situado no cromossomo 2 na região 2cen-q13 com intervalo de 11,2 cM, flanqueado pelos marcadores D2S2161 e D2S176. Outro estudo publicado posteriormente não confirmou a ligação entre GPAA e a região 2cen-q31 (GLC1B) em 18 famílias norte americanas (ALLINGHAM et al, 1998a).

Seguindo na busca por novos genes associados ao GPAA, WIRTZ et al (1997) estudaram três gerações de uma família norte americana caucasiana que apresentavam GPAA com padrão de hereditariedade AD. O novo locus, denominado GLC1C, apresentava extensão de 11,1 cM e localizava-se no braço longo do cromossomo 3 (3q21-24) entre os marcadores D3S3637 e D3S1744.

Um quarto locus (GLC1D), localizado no cromossomo 8 (8q32 – 6,3 cM entre os marcadores D8S1830 e D8S592), foi identificado em uma família de 20 membros com 8 indivíduos afetados (TRIFAN et al, 1998).

SARFARAZI et al (1998), publicaram um estudo contendo um heredograma de três gerações com padrão de transmissão AD, composto por 46 membros, dos quais 15 afetados

por GPAA. A região associada ao glaucoma nesta família encontrava-se no braço curto do cromossomo 10 (10p15-p14) e apresentava extensão genética de 5 a 11 cM, compreendendo os marcadores D10S585 e D10S1664 (5 cM) ou D10S1172 e D10S1664 (11 cM). As características clínicas dos indivíduos incluíam aparecimento do glaucoma ao redor dos 44 anos (variando entre 23 e 65 anos) e PIOs inferiores a 30 mmHg. Este foi o quinto locus identificado para o GPAA, denominado GLC1E.

O último locus identificado até o momento (GLC1F), foi obtido a partir da avaliação de uma família de 25 membros e 10 indivíduos afetados, cuja idade de manifestação da doença variava entre 25 e 70 anos e cujos valores pressóricos situavam-se entre 22 e 38 mmHg (sem tratamento antiglaucomatoso). Este locus foi mapeado no cromossomo 7 na região 7q35-q36, compreendendo um intervalo de 5,3 cM entre os marcadores D7S2442 e D7S483 (WIRTZ et al, 1999).

Apesar da descrição de seis loci (GLC1A – GLC1F) associados ao GPAA, somente o gene TIGR, associado ao locus GLC1A, foi identificado.

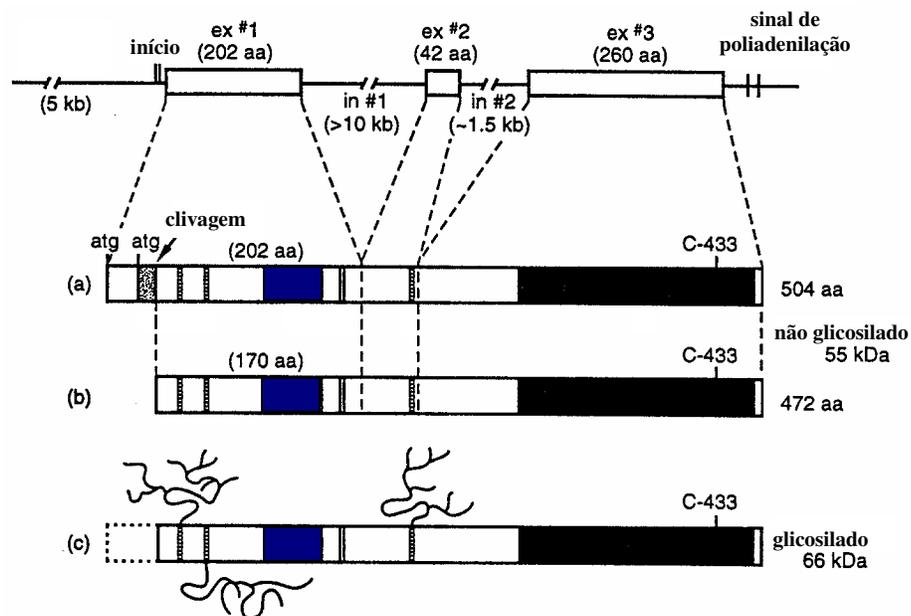
## **5. Gene TIGR/MYOC**

### **5.1. Região Codificadora**

O gene TIGR codifica uma proteína de peso molecular igual a 55 kDa, isolada pela primeira vez por POLANSKY et al (1989), que observaram a produção desta três semanas após a exposição de cultura de células da malha trabecular a glicocorticóides. Em 1997, KUBOTA et al isolaram um clone de cDNA humano proveniente de uma biblioteca de tecido retiniano que codificava uma proteína de 55 kDa. O gene responsável por esta proteína foi denominado Myocilin (MYOC) devido à sua semelhança com a miosina na sequência codificadora. Esta proteína foi localizada no cílio de conexão das células

fotorreceptoras. Posteriormente, constatou-se que os genes TIGR e MYOC compartilhavam a mesma seqüência, o que fez com que o gene associado ao locus GLC1A passasse a ser denominado TIGR/MYOC.

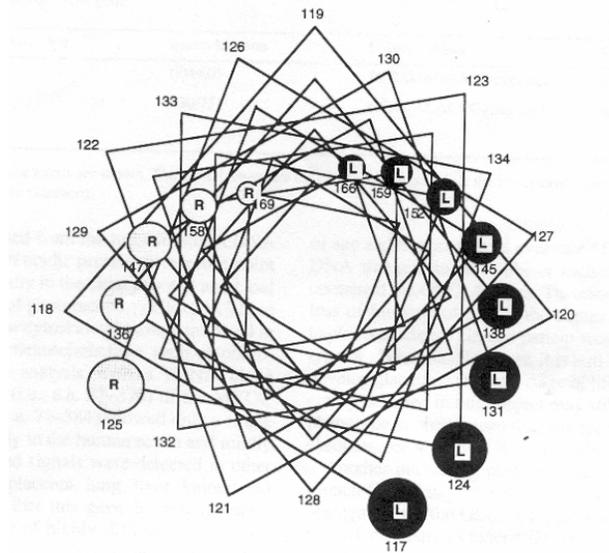
KUBOTA et al (1997,1998) e NGUYEN et al (1998) decifram a estrutura e propriedades do gene TIGR/MYOC através de clones obtidos a partir de cultura de células da malha trabecular exposta a glicocorticóide durante 10 dias. A análise estrutural do cDNA do gene TIGR/MYOC realizada por estes autores compreendeu uma região de aproximadamente 20 kb, incluindo 3 exons com 606, 126 e 718 pb, respectivamente, duas regiões intrônicas com 10 e 1,5 kb e uma região promotora com 5 kb. O gene TIGR/MYOC apresenta dois possíveis sítios de iniciação de leitura (ATG) que codificam proteínas de 504 e 472 aminoácidos de extensão, respectivamente. Estas proteínas apresentam sítios de glicosilação ligados ao nitrogênio e ao oxigênio, sítios de ligação ao ácido hialurônico e um sítio de clivagem no exon 1 compreendendo os resíduos 32-33 **[Figura 2]**.



**Figura 2.** Estrutura do gene TIGR/MYOC e possíveis mecanismos para a formação de produtos. Região intrônica, promotora e os três exons do gene TIGR/MYOC (acima). Diferentes traduções do RNAm do gene TIGR/MYOC: a) quando o primeiro ATG é traduzido a proteína apresenta 504 aa, b) a proteína traduzida a partir do sítio de clivagem do exon 1 apresenta 472 aa, c) proteína glicosilada (o contorno pontilhado indica a forma com 504 aa). A região preenchida em cor preta corresponde ao domínio da olfactomedina e a região preenchida em cor azul corresponde ao zíper de leucina (Modificado a partir de NGUYEN et al, 1998).

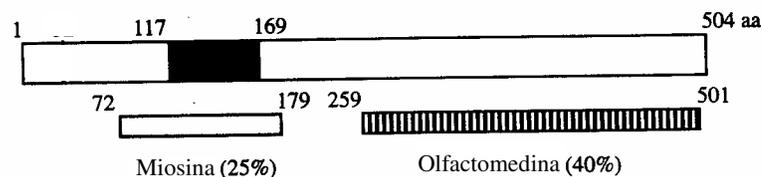
Uma característica importante desta molécula é a presença no exon 1 de zíper de leucina e no exon 3 de uma região codificadora homóloga à olfactomedina [Figuras 2 e 4]. A região codificadora do gene TIGR/MYOC apresenta dois domínios principais, um no exon 1 na porção amino-terminal e outro no exon 3 na porção carboxi-terminal. O primeiro é o domínio da miosina com 29,9% de identidade (seqüência idêntica – 20/67 aa) com a cadeia pesada da miosina do *Dictyostelium discoideu* e 32 aminoácidos adicionais apresentando substituições conservativas, totalizando 77,6% (52/67) de homologia. Este domínio contém o zíper de leucina (entre os aa 71 e 152) dividido em duas sub-regiões (71-

85 e 103-152). A cada sete posições aparecem os resíduos de leucina [Figura 3], que podem ajudar na formação de polímeros (estrutura enovelada).



**Figura 3.** Zíper de leucina, configuração helicoidal. Os resíduos de arginina (R) e leucina (L) estão salientados. (SARFARAZI, 1997)

O segundo é o domínio da olfactomedina, localizado no exon 3 na região carboxi-terminal. Este domínio apresenta identidade de 31,3% (56/179 aminoácidos) com a olfactomedina do sapo boi e outros 83 aminoácidos correspondendo a substituições conservativas, alcançando uma homologia de 77,7% (KUBOTA et al, 1997) [Figuras 2 e 4]. A olfactomedina é uma proteína que está presente na matriz extracelular do neuroepitélio olfativo com capacidade de polimerizar-se através de pontes dissulfeto. Esta característica é decorrente da propriedade do aminoácido cisteína [Figura 2].



**Figura 4.** Regiões homólogas à miosina (exon 1) e à olfactomedina (exon 3). A porção preenchida corresponde à região do zíper de leucina. (Modificado a partir de SARFARAZI, 1997).

Outros sítios identificados na estrutura do gene TIGR/MYOC são: fosforilação da proteína quinase C nos resíduos 256-258 (Thr-Leu-Arg), ligação de glicosaminoglicanas nos resíduos 238-241 (Ser-Gly-Glu-Gly), fosforilação da proteína quinase II entre os aminoácidos 377-380 (Thr-Asp-Ile-Asp) e o sítio para proteína quinase dependente do AMPc nos resíduos 422-425 com a Ser 425 como substrato da fosforilação (ROSZA et al, 1998).

## 5.2. Região Promotora

Identificou-se uma região de 5 kb (à montante) como a região promotora, responsável por modular o processo de transcrição do gene TIGR/MYOC (NGUYEN et al, 1998, ADAM et al, 1997) [Figura 2]. Observaram-se as seguintes seqüências reguladoras na região promotora do gene TIGR/MYOC: a) sítios de iniciação a montante: TATA *box* (entre 20 e 30 pb à montante do sítio de iniciação) e CAT *box*; b) elementos de resposta a sinais hormonais tais como glicocorticóides, estrogênio, progesterona e tiróide; c) elementos de resposta ao plasma, interferon e três sítios de ligação em potencial para ácido

retinóico e vitamina D. Identificaram-se também elementos relacionados ao dano oxidativo, ao à lesões no DNA e a respostas ao calor e choque (POLANSKY et al, 1997; NGUYEN et al, 1998). Seqüências com função inibitória foram identificadas como o elemento repressor do plasma. KUBOTA et al (1998) sugeriram que os elementos de resposta a glicocorticóides teriam características únicas no gene TIGR/MYOC. Além disto, este grupo de autores sugeriu que a presença de repetições de dinucleotídeos a frente destes elementos de resposta a glicocorticóides poderiam influenciar a expressão do gene TIGR/MYOC de acordo com o número de repetições encontradas, como já foi especulado na região promotora do gene interleucina-10 (ESKDALE & GALLAGHER, 1995). Esta suposição ajudaria a explicar a variação de sensibilidade das células da malha trabecular aos esteróides.

### **5.3. Expressão**

Ensaio com imunoprecipitação usando anticorpos anti-TIGR foram realizados para avaliar se a proteína codificada pelo gene TIGR poderia apresentar-se em um meio de células trabeculares expostas à dexametasona. Os autores (NGUYEN et al, 1998) observaram a presença de uma glicoproteína extracelular com 66 kDa de peso molecular (forma predominante), além de duas proteínas próximas aos 55 kDa, representando as formas não glicosiladas de 504 e 472 aminoácidos. Além disto, identificou-se no interior das células trabeculares tratadas com a dexametasona a forma de 55KDa em uma quantidade menor. Os autores sugeriram que as diversas formas descritas da proteína devem ser decorrentes de eventos ocorridos durante o processo de tradução e pós-tradução do gene TIGR, uma vez que uma única cópia transcrita deste gene foi observada. No mesmo estudo, constatou-se a formação de complexos de alto peso molecular (acima de

200 kDa), sugerindo que a proteína codificada pelo gene TIGR poderia existir na forma de polímeros. Esta característica seria possível graças à presença do zíper de leucina e através do resíduo de cisteína na posição 433 no domínio da olfactomedina.

Estudos em olhos humanos utilizando diversos procedimentos em biologia molecular incluindo análises por *Western blot* (KARALI et al, 2000) e *Northern blot* (SWIDERSKI et al, 2000), constataram que diversos tecidos oculares expressam o gene TIGR/MYOC. No segmento anterior, observou-se a expressão do gene TIGR/MYOC no estroma corneano, no citoplasma de células endoteliais da córnea, nas células epiteliais anteriores do cristalino e no humor vítreo. Na íris, o gene TIGR/MYOC encontrou-se expresso tanto no estroma como nas células dos músculos dilatador e esfíncter da pupila.

No corpo ciliar, o gene TIGR/MYOC se mostrou expresso na musculatura lisa, porém não no estroma (KARALI et al, 2000). O gene TIGR/MYOC também foi clonado a partir de uma biblioteca de corpo ciliar humano (ORTEGO, ESCRIBANO, COCA-PRADOS, 1997).

Na malha trabecular, o gene TIGR/MYOC mostrou-se expresso na região córneo-escleral, uveal e justa-canalicular, porém não foi possível determinar se a expressão deste ocorria no meio extracelular (KARALI et al, 2000), o que foi constatado posteriormente com a ajuda da microscopia eletrônica (UEDA et al, 2000).

Na retina, como já foi citado anteriormente, o gene TIGR/MYOC foi clonado a partir de uma biblioteca de tecido retiniano, estando expresso na região do cílio conector das células fotorreceptoras (KUBOTA et al, 1997), achado posteriormente confirmado pelos trabalhos de KARALI et al (2000) e SWIDERSKI et al (2000).

É importante salientar que estes dois últimos estudos constataram a expressão do gene TIGR/MYOC tanto nos astrócitos e axônios do nervo óptico (KARALI et al, 2000)

como no tecido perivascular que circunda a artéria central da retina e na pia mãe (SWIDERSKI et al, 2000). Os autores inferiram que o gene TIGR/MYOC seria expresso não somente na malha trabecular, local onde ocorre a maior parte da drenagem do humor aquoso, mas também no nervo óptico, local do dano glaucomatoso. Em contraste, ADAM et al (1997) não encontraram vestígio de RNAm do gene TIGR/MYOC no nervo óptico.

O gene TIGR/MYOC mostrou-se expresso na musculatura cardíaca, estriada, no neuroepitélio olfatório e nas células ciliares da cóclea (KUBOTA et al, 1997). ORTEGO, et al (1997) observaram níveis detectáveis de expressão em músculo cardíaco e esquelético e não detectáveis em tecido cerebral, placenta, pulmão, fígado, rim e pâncreas.

Em relação à regulação da expressão do gene TIGR/MYOC, POLANSKY et al (1997) avaliaram através da análise por reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa o aumento da concentração de RNAm do gene TIGR/MYOC em células trabeculares expostas a diferentes agentes, incluindo a dexametasona, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, acetato de tetradecanoilforbol e choque térmico. Os autores observaram aumento da concentração de RNAm em relação ao seu nível basal após exposição aos quatro agentes estudados. A exposição à dexametasona resultou na maior concentração após um período mais prolongado (10 dias), sugerindo a participação não apenas de estímulos hormonais mas também do estresse oxidativo na regulação da expressão do produto do gene TIGR/MYOC. Outro trabalho apresentado por TAMM et al (1999) relatou aumento da expressão do gene TIGR/MYOC em cultura de células trabeculares após estímulo mecânico e após exposição ao fator de crescimento (*transforming growth factor*) TGFβ1. Entretanto, algumas substâncias como o fator de crescimento básico de fibroblastos (bFGF) e o hormônio da tireóide parecem reduzir a expressão do gene TIGR/MYOC em células trabeculares expostas

à dexametasona (POLANSKY, FAUSS, ZIMMERMAN, 2000). Além disto, KIRSTEIN et al (2000) observaram que proteínas associadas ao processo de transcrição atuam facilitando o acoplamento de RNA polimerase ao DNA, contribuindo para a transcrição do gene TIGR/MYOC em células trabeculares e astrócitos.

O gene TIGR/MYOC encontra-se expresso na malha trabecular em olhos normais e glaucomatosos (GPAA, GPAE e glaucoma secundário a corticoesteróides) segundo o trabalho de TAKAHASHI et al (2000). LÜTJEN-DRECOLL et al (1998) avaliaram a expressão da proteína codificada pelo gene TIGR/MYOC através de análise por imunohistoquímica e anticorpos policlonais e fluorescentes e observaram um aumento da fluorescência em olhos glaucomatosos (GPAA, glaucoma de pressão normal e glaucoma pseudoexfoliativo) quando comparados a olhos normais pareados por idade. Outro estudo descreveu redução da secreção da proteína TIGR/MYOC na malha trabecular e no humor aquoso em olhos com GPAA associado a mutações no gene GLC1A (JACOBSON et al, 2001).

MERTTS et al (1999) avaliaram a localização intracelular da proteína codificada pelo gene TIGR/MYOC através de análise por deleções da porção amino-terminal do gene, e relacionaram a região compreendida do aminoácido 15 ao aminoácido 138 no exon 1, como responsável pela associação da proteína com os microtúbulos celulares.

Outro estudo (UEDA et al, 2000) avaliando a localização da proteína codificada pelo gene TIGR/MYOC através de análise por *Western blot*, microscopia eletrônica e análise quantitativa por *Immunogold labelling*, identificou a presença desta nas mais diferentes organelas celulares e mesmo no meio extracelular, em cultura de células e tecido trabecular humano exposto e não exposto à dexametasona. A organela onde foi constatada a

maior concentração da proteína foi a mitocôndria, seguido pelas vesículas citoplasmáticas, filamentos de actina, filamento intermediário e citosol.

O'BRIEN, REN, WANG (2000), avaliando células endoteliais do canal de Schlemm expostas à dexametasona, constataram a presença da proteína codificada pelo gene TIGR/MYOC no complexo de Golgi. Analisando a estrutura genômica, os autores observaram que o gene TIGR/MYOC compartilha regiões de homologia com proteínas associadas ao complexo de Golgi tanto na porção amino-terminal como no domínio da olfactomedina nas posições 298 (FEYDL), 369 (FPYS) e 451 (FAYD).

#### **5.4. Rastreamento de Mutações**

Uma vez constatado que alterações na estrutura do gene TIGR/MYOC estão associadas ao GPAA, vários estudos têm sido realizados para avaliar a presença destas alterações na seqüência de aminoácidos no gene TIGR/MYOC em pacientes com GPAA. Estes trabalhos englobam populações de várias origens, tais como norte-americana, européia e asiática, na tentativa de avaliar a prevalência de mutações e determinar as alterações na seqüência do gene TIGR/MYOC. Não existem, no entanto, estudos que investiguem a freqüência e o tipo de mutações no gene TIGR/MYOC em pacientes com GPAA-J na América Latina.

## **6. Objetivos**

Este estudo tem como objetivos:

1. Determinar a frequência e os tipos de mutações encontradas no gene TIGR/MYOC em uma população brasileira de pacientes com GPAA-J.
2. Comparar o perfil clínico entre os pacientes com alteração na sequência do gene TIGR/MYOC e os pacientes sem mutação.
3. Determinar se indivíduos com a mesma mutação no gene TIGR/MYOC têm origem a partir de um ancestral comum.
4. Avaliar a segregação e a penetrância de mutações no gene TIGR/MYOC não descritas previamente na literatura.

## ***II - PACIENTES E MÉTODOS***



## 1. Pacientes

Foram avaliados pacientes com diagnóstico de GPAA-J atendidos consecutivamente no Setor de Glaucoma da Disciplina de Oftalmologia do Hospital das Clínicas da UNICAMP durante o período de julho de 1997 a dezembro de 1999.

### 1.1. Critérios de Inclusão

Os critérios usados para definir GPAA-J foram:

- 1) Dano glaucomatoso do disco óptico caracterizado por pelo menos duas das seguintes alterações: escavação maior que ou igual a 0,7, perda localizada de rima nervosa e assimetria de escavação maior que 0,3.
- 2) Perda de campo visual correspondente às alterações do disco óptico, e que preenchiam os critérios de ANDERSON (COSTA, 1995): a) três pontos adjacentes não periféricos com  $p < 5\%$ , sendo que um deles com  $p < 1\%$  pertencentes ao gráfico de probabilidades do *pattern deviation*; b) *corrected pattern standard deviation* com  $p < 5\%$  e c) *glaucoma hemifield test* apresentando o resultado *borderline* ou *outside normal limits*.
- 3) Ângulo aberto à gonioscopia.
- 4) PIO maior do que 21 mmHg em pelo menos duas medidas documentadas. Pacientes com PIOs menores que 21 mmHg devido a tratamento clínico e/ou cirúrgico de glaucoma foram incluídos no estudo desde que os outros critérios de inclusão fossem preenchidos.
- 5) Idade de diagnóstico inferior a 40 anos.

## **1.2. Critérios de Exclusão**

- 1) Parentesco com indivíduo já incluído no estudo.
- 2) Trauma ocular prévio.
- 3) História de uso de corticóide tópico ou sistêmico.
- 4) Presença de alterações no segmento anterior que pudessem levar a aumento da PIO ou que sugerissem diagnóstico de alguma outra forma de glaucoma secundário, congênito ou de desenvolvimento.

## **1.3. Grupo Controle**

Um grupo controle foi usado para determinar a frequência de novas mutações no gene TIGR/MYOC na população geral. Este grupo era composto de 100 recém-nascidos (50 indivíduos de cor branca e 50 de cor negra), cujas amostras sanguíneas foram obtidas no Hemocentro da UNICAMP no período de 1995 a 1997, fazendo parte de um banco de DNA correspondente a população geral. Os recém-nascidos eram normais, provenientes da Central de Atendimento Integral à Mulher (CAISM) da UNICAMP e representam a população alvo de atendimento do Hospital das Clínicas da UNICAMP.

## **2. Métodos**

### **2.1. Dados Demográficos**

Foram coletados dados referentes ao histórico familiar para glaucoma, assim como antecedentes de tratamento cirúrgico e/ou clínico de glaucoma. Avaliou-se a necessidade de intervenção cirúrgica para controle do glaucoma em dois momentos: na primeira e última visita ao Setor de Glaucoma do Hospital das Clínicas da UNICAMP. Outros dados demográficos como idade ao diagnóstico, sexo e raça também foram obtidos por entrevista.

## **2.2. Exame Oftalmológico**

A avaliação oftalmológica, foi realizada na primeira visita do paciente ao Ambulatório de Oftalmologia do Hospital das Clínicas da UNICAMP e incluiu:

- 1) Medida da acuidade visual realizada sob iluminação constante, utilizando a tabela de Snellen colocada a 5 metros do paciente.
- 2) Medida do erro refracional em ambos os olhos (medido em dioptrias), seguido do cálculo do equivalente esférico. O equivalente esférico foi estimado a partir da divisão pela metade do grau de astigmatismo em dioptrias (lentes cilíndricas negativas), que foi posteriormente somado ao grau esférico.
- 3) Biomicroscopia do segmento anterior realizada com lâmpada de fenda.
- 4) Estudo do seio camerular por meio de gonioscopia de indentação.
- 5) Medida da PIO com tonômetro de aplanção de Goldmann.
- 6) Avaliação do disco óptico sob midríase, realizada em lâmpada de fenda com lente esférica de 78 dioptrias.
- 7) Perimetria computadorizada em indivíduos com acuidade visual maior que ou igual a 20/400.

As medidas de PIO e acuidade visual foram obtidas do exame inicial do paciente no ambulatório de oftalmologia da UNICAMP.

## **2.3. Biologia Molecular**

### **2.3.1. Extração de DNA**

Coletaram-se 5 ml de sangue periférico da veia antecubital dos pacientes glaucomatosos em frasco estéril, com EDTA 10% como anticoagulante. A extração de DNA e as etapas seguintes a serem descritas foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro da UNICAMP. A amostra foi centrifugada a 2500 rpm por 15

minutos. Após o descarte do plasma, os eritrócitos foram lisados com uma mistura das soluções de cloreto de amônio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) 0,144 M (5 vezes o volume de células) e bicarbonato de amônio ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) 0,01 M (0,5 vez o volume de células). Após repouso à temperatura ambiente por 15 minutos, o hemolisado foi centrifugado por 20 minutos a 2500 rpm, seguido de nova lise de hemácias. O sobrenadante foi removido e o precipitado de leucócitos lisado com a utilização do reagente DNAzol, segundo as instruções do fabricante (Gibco/BRL, Gaithersburg, MD, EUA). A precipitação do ácido nucleico foi obtida pela adição de acetato de sódio 3 M pH 5,2 (10% do volume) e etanol absoluto – 20<sup>0</sup>C (3 vezes o volume).

O DNA foi solubilizado em água destilada estéril e teve sua concentração estimada em espectrofotômetro, através do valor da densidade óptica em comprimento de onda = 260 nm (SAMBROOK et al, 1989).

### **2.3.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**

Confeccionaram-se seis pares de iniciadores para amplificar o exon 1 do gene TIGR/MYOC (composto por 604 pb), um par para amplificar o exon 2 (126 pb) e cinco pares de iniciadores para o exon 3 (782 pb). A PCR foi realizada utilizando-se os seguintes reagentes: 20 pmoles de cada iniciador, tampão da enzima (Tris-HCl 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM)  $\text{MgCl}_2$  1.5 mM, gelatina 0,01%, mistura de nucleotídios (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) 0,2 mM, e 2 unidades de Taq DNA polimerase (GIBCO/BRL, Gaithersburg, MD, EUA – exon 3) ou 2 unidades de Taq DNA polimerase (BIOTOOLS, Madrid, Espanha – exons 1 e 2), com tampão contendo  $\text{MgCl}_2$ , somados a 0,5  $\mu\text{g}$  de DNA genômico. Para todas as regiões do exon 3, utilizou-se formamida 5% na reação. Para os exons 1 e 2 não se

utilizou a formamida, com exceção da região 1 do primeiro exon. A região 5 do exon 1 foi amplificada adicionando-se a Taq DNA polimerase ao final da primeira desnaturação. O volume final da reação de PCR era de 50 µl, sendo que a sequência dos iniciadores, a temperatura de anelamento e o tamanho do fragmento amplificado estão descritos na tabela II. As reações foram submetidas a 35 ciclos de desnaturação (94°C), anelamento (temperatura variável segundo tabela II) e extensão (72°C), todos os passos com um minuto de duração, em aparelho ciclador de temperatura (MJ research, IMC Incorp, EUA). O último ciclo (trigésimo quinto) teve a extensão prolongada por 7 minutos. Finalmente, os produtos da PCR foram separados por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5 % corado com brometo de etídeo e examinados sob luz ultra violeta (UV) (SAIKI et al, 1988).

**Tabela II.** Sequência dos iniciadores, tamanho do fragmento amplificado e temperatura de anelamento utilizados para o rastreamento de mutações nos 3 exons do gene TIGR/MYOC.

Exon/Região	Sequência	Tamanho do Fragmento (pb)	Temperatura de Anelamento
1/1	S - 5' GGCTGGCTCCCCAGTATATA 3' AS - 5' ACAGCTGGCATCTCAGGC 3'	174	50°C
1/2	S - 5' ACGTTGCTGCAGCTTTGG 3' AS - 5' GATGACTGACATGGCCTGG 3'	196	64°C
1/3	S - 5' AGTGGCCGATGCCAGTATAC 3' AS - 5' CTGGTCCAAGGTCAATTGGT 3'	189	55°C
1/4	S - 5' AGGCCATGTCAGTCATCCAT 3' AS - 5' TCTCTGGTTTGGGTTTCCAG 3'	214	57°C
1/5	S - 5' TGACCTTGGACCAGGCTG 3' AS - 5' CCTGGCCAGATTCTCATTTT 3'	200	62°C
1/6	S - 5' TGGAGGAAGAGAAGAAGCGA 3' AS - 5' CTGCTGAACTCAGAGTCCCC 3'	187	66°C
2	S - 5' AACATAGTCAATCCTTGGGCC 3' AS - 5' TAAAGACCACGTGGGCACAA 3'	233	60°C
3/1	S - 5' ATTATGGATTAAGTGGTGCTTCGT 3' AS - 5' TCTTATGACAGTTCTGGACTCAGC3'	353	55°C
3/2	S - 5' ATACTG CCTAGGCCACTGGA 3' AS - 5' CAATGTCCGTGTAGCCACC 3'	190	55°C
3/3	S - 5' AAGATATGAGCTGAATACCGAGAC A 3' AS - 5' CAGATGATGAAGGCATTGGC 3'	251	55°C
3/4	S - 5' GAACTCGAACAAACCTGGGA 3' AS - 5' CATGCTGCTGTACTTATAGCGG 3'	195	55°C
3/5	S - 5' CAAGACCCTGACCATCCCATTTC 3' AS - 5' TCTCCTTCTGCCATTGCCTGTAC 3'	173	55°C

S = sense, AS = antisense, pb = pares de bases

### **2.3.3. Polimorfismo de Conformação de Fita Simples de DNA (SSCP)**

A análise por SSCP de acordo com modificação do método de ORITA et al (1989) foi realizada no aparelho “PhastSystem” (Pharmacia, Uppsala, Suécia). O produto da PCR foi diluído 1: 1(vol : vol) com tampão de corrida (formamida 95%, EDTA 10 mmol/L pH 8,0 e azul de bromofenol 0.1%), desnaturado por 3 minutos e mantido em gelo até a eletroforese em gel homogêneo de poliacrilamida 20% ou 12,5%, com tiras de agarose usadas como tampão. As condições de pré-corrída e aplicação das amostras de PCR das regiões que constituem o gene TIGR/MYOC, baseado nos dados de MOHABEER et al (1991), foram:

#### ***Regiões 1/1, 1/3, 1/6, 3/2, 3/3, 3/4 e 3/5***

1) pré corrida: 400 v, 10mA, 1,0 w, 15<sup>0</sup> C; 10 vh

2) aplicação: 25 v, 10 mA, 1,0 w, 15<sup>0</sup> C; 2 vh

Observação: para a região 1/1 o valor da corrente foi de 5,0 mA.

#### ***Região 1/2***

1) pré corrida: 400 v, 5,0mA, 1,0 w, 4<sup>0</sup> C; 10 vh

2) aplicação: 25 v, 5,0mA, 1,0 w 4<sup>0</sup> C; 2 vh

#### ***Regiões 1/4, 1/5 e 2***

1) pré corrida: 400 v, 10mA, 1,0 w, 10<sup>0</sup> C; 10 vh

2) aplicação: 25 v, 10 mA, 1,0 w, 10<sup>0</sup> C; 2 vh

#### ***Região 3/1***

1) pré corrida: 400 v, 10mA, 1,0 w, 20<sup>0</sup> C; 10 vh

2) aplicação: 25 v, 10 mA, 1,0 w, 20<sup>0</sup> C; 2 vh

Para cada exon foram testadas diferentes condições de temperatura, voltagem e relação voltagem/hora na tentativa de se obter o melhor padrão de migração eletroforética no SSCP.

As condições de corrida para cada uma das regiões que constituem o gene TIGR/MYOC estão descritas na tabela III.

As bandas de DNA foram visibilizadas por meio de coloração pela prata envolvendo lavagens consecutivas em ácido tricloroacético 20% (5 minutos, 20°C), glutaraldeído 5% (5 minutos, 50°C), água (2 lavagens de 30 segundos cada, 30°C), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2,5% e formaldeído 0,013% (4 minutos, 30°C), ácido acético 5% (2 minutos, 50°C) e glicerol 13% (3 minutos, 50°C).

**Tabela III.** Condições de corrida e concentração do gel de poliacrilamida para os 3 exons do gene TIGR/MYOC

Exon/Região	Condições de Corrida	concentração do gel de poliacrilamida
1/1	150 v / 5,0 mA / 1 w / 15°C / 150 vh	20%
1/2	150 v / 5,0 mA / 1,0w / 4°C / 250 vh	20%
1/3	150 v / 10,0 mA / 1,0w / 15°C / 250 vh	20%
1/4	150 v / 10,0 mA / 1,0 w /10°C / 250vh	20%
1/5	150 v / 10,0 mA / 1,0w /10°C / 250 vh	20%
1/6	150 v / 10 mA / 1,0w / 15°C / 250 vh	20%
2	150 v / 10,0 mA / 1,0 w /10°C / 250 vh	20%
3/1	340 v / 10,0 mA / 1,0 w / 20°C / 300 vh	20%
3/2	400 v / 10,0 mA / 1,0 w / 15°C / 350 vh	20%
3/3	400 v / 10,0 mA / 1,0 w / 15°C / 350 vh	12,5%
3/4	400 v / 10,0 mA / 1,0 w / 15°C / 350 vh	20%
3/5	150 v / 10,0 mA / 1,0 w / 15°C / 200 vh	20%

v = volt; mA = mili amper; w = watt; vh = volt-hora.

## 2.3.4. Análise por Seqüenciamento

### 2.3.4.1. Seqüenciamento Manual

Seqüenciaram-se amostras com mobilidade eletroforética anormal detectada pelo SSCP utilizando-se o “kit” de seqüenciamento “Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit” com  $\gamma$ -<sup>32</sup>P dATP (Amersham Life Science, Inc.-Cleveland, Ohio, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Os iniciadores utilizados no seqüenciamento foram os mesmos da reação de PCR.

As etapas do seqüenciamento estão listadas a seguir:

1. O volume de 5  $\mu$ l do produto da reação de PCR foi tratado com 1  $\mu$ l de exonuclease I (100 U/ $\mu$ l) e 1  $\mu$ l de fosfatase alcalina de camarão (2 U/ $\mu$ l). A mistura foi incubada a 37°C por 15 minutos, seguidos de 15 minutos a 80°C, para a inativação das enzimas.
2. Desse total, 2  $\mu$ l foram utilizados para a reação de seqüenciamento, acrescentando-se 10,5  $\mu$ l de água deionizada estéril, 2  $\mu$ l de tampão para “Thermosequenase” (diluído 10 vezes), 1  $\mu$ l do iniciador marcado previamente com  $\gamma$ <sup>32</sup>P-dATP e 2  $\mu$ l da enzima “Thermosequenase”, obtendo-se um volume total de 17,5  $\mu$ l.
3. O volume de 5  $\mu$ l da mistura acima foi adicionado aos tubos previamente identificados e contendo 4  $\mu$ l de cada uma das misturas de terminação (G, A, T e C). Acrescentou-se 1 gota de óleo mineral e as amostras foram submetidas a uma nova reação de PCR, utilizando-se a temperatura de anelamento do PCR original. Após 30 ciclos, a reação foi interrompida com a adição de 4  $\mu$ l de “stop solution” (formamida 95%, EDTA 20mM, azul de bromofenol 0,05% e xileno cianol 0,05%).

A reação de marcação do iniciador foi realizada em um tubo Eppendorf, onde adicionou-se 1,1  $\mu$ l de água deionizada estéril, 0,6  $\mu$ l de tampão para T4 quinase 10X, 0,5

$\mu\text{l}$  do iniciador (20 pmol), 1  $\mu\text{l}$  de  $\gamma^{32}\text{P}$ -dATP (10,0 mCi/ml) e 3  $\mu\text{l}$  de T4 polinucleotídeo quinase (10 U/ $\mu\text{l}$ ). A reação foi incubada por 10 minutos a 37°C e por 5 minutos a 95°C.

O volume de 4 $\mu\text{l}$  do produto da reação de sequenciamento foi desnaturado a 94°C por 2 minutos e aplicado em gel de poliacrilamida 6% em tampão Tris-Taurina-EDTA (TTE) 0,8X e uréia 7 M, em placas de 33x40 cm, com gradiente de espessura de 0,25 a 0,75 mm. A eletroforese foi realizada a 75 W por 2 a 3 horas à 50°C, de acordo com o tamanho do fragmento, utilizando-se como tampão de corrida TTE 0,8X (TTE é igual a Tris 89mM/ tampão taurina 15 mM/ EDTA 0,5 mM, pH 9,0; United States Biochemical).

Secou-se o gel à 80°C por 1 hora em aparelho Bio-Rad modelo 583 (Applied Biosystems, Foster City CA, EUA) e procedeu-se à exposição do mesmo em cassette com filme de raio X, por 16 horas, à temperatura ambiente.

#### **2.3.4.2. Seqüenciamento Automático**

Para o seqüenciamento automático foi utilizado o “Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit” (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). O seqüenciamento automatizado foi realizado no aparelho ABI PRISM 310 (Genetic Analyser, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

##### **2.3.4.2.1. Purificação do Produto da PCR**

Os produtos da PCR que apresentaram mobilidade eletroforética alterada detectada pelo SSCP foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo e posteriormente examinados sob luz UV. Os produtos amplificados foram

purificados com o Kit da QIAGEN (“QIAquick PCR Purification Kit”) segundo o protocolo descrito pelo fabricante.

#### **2.3.4.2.2. Quantificação do Produto Amplificado**

Dois microlitros do material purificado foram aplicados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo, submetidos a eletroforese e examinados sob luz UV. A concentração de DNA da amostra purificada foi estimada a partir da comparação da intensidade da banda do produto purificado com a intensidade da banda do marcador de massa molecular Low Mass DNA Ladder (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, EUA).

#### **2.3.4.2.3. Reação de Seqüenciamento**

Foram utilizados de 15 a 45 ng do produto para uma reação de 10 $\mu$ l, contendo 3 $\mu$ l de “Big Dye Terminator Ready Reaction” (ABI PRISM Big Dye terminator Cycle Sequencing kit, Applied Biosystems Foster City CA, EUA) e 1,6 pmol de um dos oligonucleotídeos iniciadores (sense ou antisense) utilizados na PCR, sendo o volume final completado com água destilada.

As condições da reação de seqüenciamento foram as seguintes: desnaturação inicial a 96°C por 1 minuto, seguida de 25 ciclos de 96°C por 10 segundos, 57°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos. As amostras foram em seguida submetidas à eletroforese no seqüenciador automático “ABI PRISM 310” e os cromatogramas analisados.

### **2.3.5. Digestão com Enzima de Restrição**

Com o objetivo de investigar se a nova alteração Cys433Arg na seqüência do gene TIGR/MYOC estaria presente na população controle, realizou-se digestão com a enzima de restrição *Fok I* nas amostras de 100 indivíduos pertencentes ao grupo controle. Utilizou-se 4U da enzima (4U/ $\mu$ l), 12,5 $\mu$ l do produto da reação de PCR e 1,5 $\mu$ l do tampão da enzima, totalizando um volume final de 15 $\mu$ l. A reação foi incubada por 1 hora a 37<sup>0</sup>C e o produto da digestão aplicado em gel de agarose 3% corado com brometo de etídeo e visibilizados sob luz UV.

### **2.3.6. Análise de Haplótipos**

Para avaliar se indivíduos apresentando uma mesma mutação (Cys433Arg) provinham de um ancestral comum ou se o fenômeno era secundário a eventos recorrentes, realizou-se a análise de haplótipos.

Foram submetidos à análise de haplótipos pacientes e famílias de pacientes que apresentaram a mutação Cys433Arg. Quatro marcadores flanqueando o locus GLC1A foram avaliados (NGA19, D1S1619, D1S2790, D1S210) através da PCR e eletroforese em gel de poliacrilamida 6% desnaturante. Os reagentes utilizados na PCR para cada um dos marcadores foram: 20 pmoles de cada iniciador correspondente aos marcadores estudados, tampão da enzima (Tris-HCl 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub>), gelatina 0,2%, mistura de nucleotídeos (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) 0,2 mM, e 2 unidades de Taq DNA polimerase (BIOTOOLS, Madrid, Espanha) somados a 0,5  $\mu$ g de DNA genômico. Para os marcadores D1S210 e D1S1619 utilizou-se formamida 5% na reação, enquanto que para o marcador NGA19 empregou-se “dimethyl-sulphoxide” 10%. Para os marcadores D1S210 e

D1S1619, foram realizados no termociclador 30 ciclos de 94° C por 30 segundos, 55° C por um minuto e 15 segundos e 72° C por 15 segundos. Para o marcador D1S2790, realizou-se a PCR com 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 58°C por um minuto e 72°C por um minuto. O marcador NGA19 apresentou as seguintes condições da PCR: 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 59°C por 30 segundos e 72°C por um minuto.

### **3. Análise dos Heredogramas**

#### **3.1. Segregação Concomitante**

Os heredogramas de duas famílias com a mutação Cys433Arg no gene TIGR/MYOC foram descritos com o objetivo de avaliar a segregação concomitante desta com o GPAA-J. A segregação concomitante é observada quando os indivíduos portadores da mutação estão também afetados pela moléstia, enquanto aqueles sem a mutação não apresentam a doença.

#### **3.2. Penetrância**

Avaliou-se a penetrância da mutação Cys433Arg no gene TIGR/MYOC em uma das famílias com GPAA-J. A penetrância corresponde à porcentagem de indivíduos afetados que manifestaram a moléstia em um determinado período.

### **4. Análise dos dados**

O rastreamento de alterações na seqüência do gene TIGR/MYOC permitiu determinar a frequência de mutações na população avaliada com GPAA-J. Além disto,

realizou-se um estudo comparativo que avaliou dados clínicos e demográficos nos pacientes portadores e não portadores de mutação no gene TIGR/MYOC.

## **5. Análise Estatística**

Utilizou-se para variáveis quantitativas o teste T de Student não pareado. Para variáveis qualitativas, realizou-se o teste  $\chi^2$  ou o teste de Fischer. Foram considerados estatisticamente significantes valores de P inferiores a 0,05. Todos os dados foram tabulados e analisados através do programa estatístico SPSS (versão 6.3.1 *standard*, SPSS Inc., EUA)

## **6. Aspectos Éticos**

O estudo foi aprovado pela comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. Todos os pacientes com GPAA-J assinaram termo de consentimento previamente à coleta de sangue.



### ***III - RESULTADOS***



## 1. Dados Demográficos

Vinte e oito pacientes com GPAA-J foram avaliados. A média de idade dos pacientes ao diagnóstico foi de  $25,96 \pm 7,49$  anos (variando de 10 a 39 anos). Cinco pacientes (17,86%) foram diagnosticados com GPAA-J antes dos 20 anos, 12 (42,86%) entre 20 e 29 anos e 11 (39,28%) acima de 29 anos. Quinze pacientes eram do sexo masculino (53,57%), e 13 do sexo feminino (46,42%). Quanto à distribuição de acordo com o grupo étnico, 15 pacientes (53,57%) eram brancos, 12 eram negros (42,86%) e um era de origem asiática (3,57%). Dos 28 pacientes, 18 (64,28%) apresentavam história familiar positiva para o glaucoma, sendo 11 de cor branca (11/15 – 73,33%) e sete de cor negra (7/12 – 58,33%) ( $P = 0,95$ ) [Tabela IV].

**Tabela IV.** Identificação, idade ao diagnóstico, sexo, cor e antecedente familiar dos 28 indivíduos com GPAA-J.

<b>Identificação</b>	<b>Idade (anos)</b>	<b>Sexo</b>	<b>Cor</b>	<b>Antecedente Familiar</b>
1. AAS	39	Masculino	Negra	positivo
2. CBF	31	Masculino	Negra	positivo
3. CVD	22	Masculino	Negra	positivo
4. CSS	15	Feminino	Branca	positivo
5. DAJ	10	Masculino	Negra	negativo
6. DPB	32	Masculino	Negra	negativo
7. EMI	25	Masculino	Branca	negativo
8. EAS	25	Feminino	Negra	negativo
9. HGF	30	Feminino	Branca	negativo
10. IS	35	Feminino	Branca	positivo
11. JLU	30	Masculino	Amarela	negativo
12. JMN	31	Masculino	Negra	negativo
13. JGK	33	Feminino	Branca	positivo
14. JL	24	Feminino	Branca	positivo
15. JCS	11	Masculino	Branca	negativo
16. LAB	36	Feminino	Branca	positivo
17. LGS	16	Feminino	Negra	positivo
18. MAN	25	Masculino	Negra	negativo
19. NGS	25	Masculino	Branca	positivo
20. OOL	29	Masculino	Negra	positivo
21. AS	29	Masculino	Branca	positivo
22. SAF	24	Feminino	Branca	positivo
23. SCP	19	Feminino	Branca	negativo
24. SCA	18	Feminino	Branca	positivo
25. TE	34	Feminino	Negra	positivo
26. VF	27	Feminino	Branca	positivo
27. MJN	20	Masculino	Negra	positivo
28. JAR	32	Masculino	Branca	positivo

## 2. Exame Ocular

Vinte e cinco pacientes (89,28%) apresentaram glaucoma em ambos os olhos. Em três pacientes (10,71%), não se detectou alteração glaucomatosa no campo visual em um dos olhos. As médias das PIOs iniciais foram  $30,36 \pm 12,70$  mmHg no olho direito e  $31,32 \pm 13,63$  mmHg no olho esquerdo. Em 14 dos 28 pacientes (50,00%), a PIO inicial foi maior que ou igual a 30 mmHg em pelo menos um dos olhos. Nove olhos (16,07% - 9/56) de sete pacientes apresentaram acuidade visual menor do que conta dedos (CD), 16 olhos (28,57% - 16/56) de 13 pacientes apresentaram acuidade visual variando de CD a 0,3 e 31 olhos (55,35% - 31/56) de 20 pacientes mostraram acuidade visual maior do que 0,3. As médias dos equivalentes esféricos foram de  $-2,37 \pm 5,28$  dioptrias (variando de  $-26,00$  a  $+3,00$ ) no olho direito e  $-2,79 \pm 5,87$  dioptrias (variando de  $-28,00$  a  $+0,50$ ) no olho esquerdo.

Realizou-se o exame de campo visual em 45 olhos (80,36% - 45/56) de 25 pacientes. Em 11 olhos de oito pacientes, a perimetria computadorizada não foi realizada devido à baixa acuidade visual. Ao serem examinados pela primeira vez no ambulatório do Glaucoma da UNICAMP, três pacientes (10,71%) já haviam sido submetidos a procedimento cirúrgico para controle da PIO. Após seguimento médio de  $54,31 \pm 28,13$  meses, 22 (78,06%) indivíduos haviam sido submetidos a procedimento cirúrgico para controle pressórico, sendo que quatro pacientes o fizeram por mais de uma vez no mesmo olho [Tabela V]. Dezoito pacientes (64,28%) com história familiar positiva para o glaucoma apresentaram PIO média inicial de  $32,94 \pm 14,21$  mmHg no olho direito e  $34,89 \pm 14,92$  mmHg no olho esquerdo enquanto os pacientes sem antecedente ( $n = 10$ ), apresentavam PIO média inicial de  $25,70 \pm 8,03$  mmHg e  $24,90 \pm 8,08$  nos olhos direito e esquerdo, respectivamente ( $P = 0,151$  - olho direito e  $P = 0,030$  - olho esquerdo).

**Tabela V.** Identificação, PIO inicial, acuidade visual inicial, equivalente esférico, campo visual inicial e número de cirurgias anti-glaucomatosas ao final do seguimento em cada olho dos 28 indivíduos com GPAA-J.

Identificação	Olho	PIO (mmHg)	Acuidade Visual	Equivalente esférico	Campo Visual	Número de Cirurgias
1. AAS	OD	37	1,0	plano	alterado	2
	OE	42	MM	plano	não disponível	1
2. CBF	OD	36	CD	-0,50	alterado	2
	OE	32	0,8	-0,25	alterado	2
3. CVD	OD	20	CD	plano	alterado	1
	OE	20	0,2	plano	alterado	1
4. CSS	OD	32	0,2	plano	alterado	1
	OE	32	0,8	plano	alterado	0
5. DAJ	OD	24	0,9	+0,75	alterado	0
	OE	24	0,9	+0,50	alterado	0
6. DPB	OD	38	1,0	plano	alterado	1
	OE	40	PL	plano	não disponível	0
7. EMI	OD	30	1,0	-0,50	normal	1
	OE	26	1,0	plano	alterado	1
8. EAS	OD	34	CD	-26,00	não disponível	0
	OE	34	CD	-28,00	não disponível	1
9. HGF	OD	21	0,2	-0,50	alterado	0
	OE	23	CD	plano	alterado	0
10. IS	OD	38	1,0	plano	alterado	1
	OE	38	1,0	plano	alterado	1
11. JLU	OD	12	0,9	-1,25	alterado	1
	OE	12	0,9	-1,75	alterado	1
12. JMN	OD	22	CD	+3,00	alterado	1
	OE	20	0,7	-6,25	alterado	0
13. JGK	OD	28	0,8	-0,50	alterado	1
	OE	18	0,9	-0,25	alterado	1
14. JL	OD	20	0,2	-8,75	alterado	1
	OE	24	0,4	-12,75	alterado	1
15. JCS	OD	20	0,6	plano	alterado	0
	OE	18	0,5	plano	alterado	0
16. LAB	OD	24	MM	-5,00	não disponível	3
	OE	25	SPL	-3,25	não disponível	0
17. LGS	OD	54	PL	-2,50	não disponível	0
	OE	60	MM	-1,50	não disponível	1
18. MAN	OD	22	CD	-1,75	alterado	0
	OE	22	PL	-1,00	não disponível	0
19. NGS	OD	54	0,1	-1,75	alterado	1
	OE	49	1,0	-1,25	normal	1
20. OOL	OD	44	0,6	-2,75	alterado	1
	OE	56	0,1	-2,75	alterado	1
21. AS	OD	60	SPL	-0,75	não disponível	0
	OE	60	0,2	-0,75	alterado	1
22. SAF	OD	41	1,0	-1,50	alterado	1
	OE	52	1,0	-0,50	alterado	1
23. SCP	OD	34	1,0	-1,50	alterado	0
	OE	30	1,0	-1,50	normal	0
24. SCA	OD	07	0,2	-6,50	alterado	1
	OE	28	0,5	-7,25	alterado	1
25. TE	OD	28	1,0	-0,75	alterado	1
	OE	28	1,0	-0,50	alterado	1
26. VF	OD	24	1,0	plano	alterado	0
	OE	24	1,0	plano	alterado	0
27. MJN	OD	32	1,0	plano	alterado	1
	OE	28	1,0	plano	alterado	1

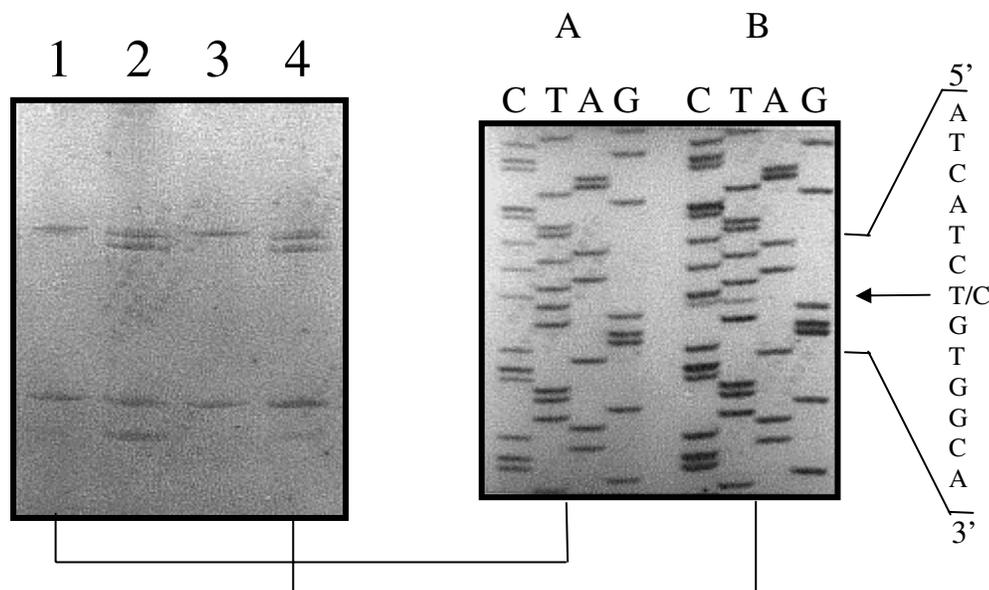
Identificação	Olho	PIO (mmHg)	Acuidade Visual	Equivalente esférico	Campo Visual	Número de Cirurgias
28. JAR	OD	14	MM	-7,25	não disponível	1
	OE	12	0,3	-9,00	alterado	2

Legenda: PIO = Pressão Intraocular, OD = olho direito, OE = olho esquerdo, SPL = sem percepção luminosa, PL = percepção luminosa, MM = movimento de mãos, CD = conta dedos

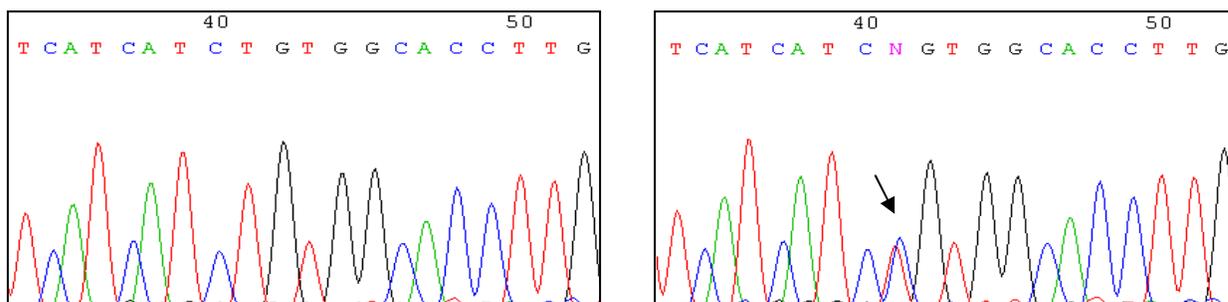
### 3. Mutações no Gene TIGR/MYOC em Indivíduos com GPAA-J

Onze pacientes (39,28%) apresentaram alterações na seqüência do gene TIGR/MYOC. Dos indivíduos com alteração na seqüência do gene, oito (28,57%) eram portadores de uma mutação de ponto no nucleotídeo localizado na posição 1362 (com substituição em heterozigose de timina por citosina), na primeira base do codon 433 da cadeia polipeptídica, levando à troca de cisteína por arginina (TGT para CGT - Cys433Arg) [Figuras 5 e 6]. Os oito pacientes com a mutação Cys433Arg apresentaram média de idade ao diagnóstico de  $27,62 \pm 4,71$  anos (variando de 20 a 35 anos). Cinco pacientes (60%) pertenciam ao sexo masculino e três (40%) ao sexo feminino. Em relação à distribuição étnica destes pacientes, cinco (60%) eram brancos e três (40%) eram negros. Dos oito pacientes, sete (87,50%) apresentavam história familiar positiva para glaucoma. As PIOs médias iniciais foram de  $41,37 \pm 11,50$  mmHg no olho direito e  $43,37 \pm 13,06$  mmHg no olho esquerdo. Um terço (31,25% - 5/16) dos olhos apresentavam acuidade visual menor do que 0,4, dos quais, dois olhos (40% - 2/5), apresentavam visão menor do que movimento de mãos (MM). Doze olhos de sete pacientes (75% - 12/16) haviam sido submetidos a procedimento cirúrgico ao final do seguimento. Dois olhos (12,50% - 2/16), não haviam sido submetidos a procedimento cirúrgico devido à ausência de percepção luminosa (SPL). Assim, somente um paciente (dois olhos) portador da mutação Cys433Arg

não teve necessidade de ser submetido a procedimento cirúrgico para controle da PIO até o momento [Tabela VI].

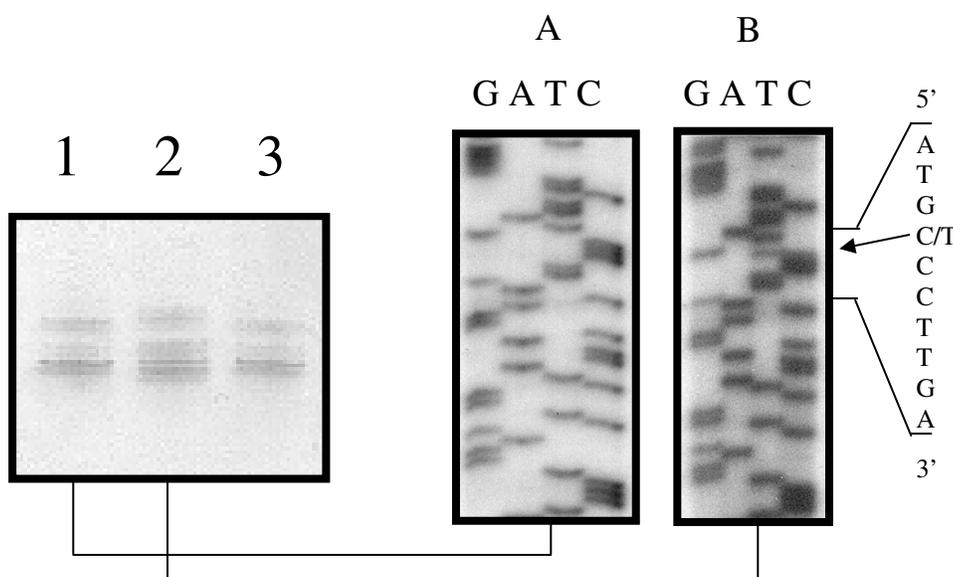


**Figura 5.** À esquerda, SSCP realizado em gel de poliacrilamida 20% do produto da PCR da região 4, exon 3. Amostra controle (1) e amostras de indivíduos com GPAA-J (2 - IS, 3 - MAN e 4 - VF). As amostras 2 e 4 apresentam padrão de mobilidade eletroforética alterada quando comparadas com o controle. À direita, seqüenciamento manual do produto da PCR da região 4 do exon 3 da amostra controle (A) e do paciente 4 (B), mostrando no último a alteração de T para C em heterozigose (indicada pela seta), a qual resulta na troca do aminoácido cisteína por arginina (Cys433Arg).

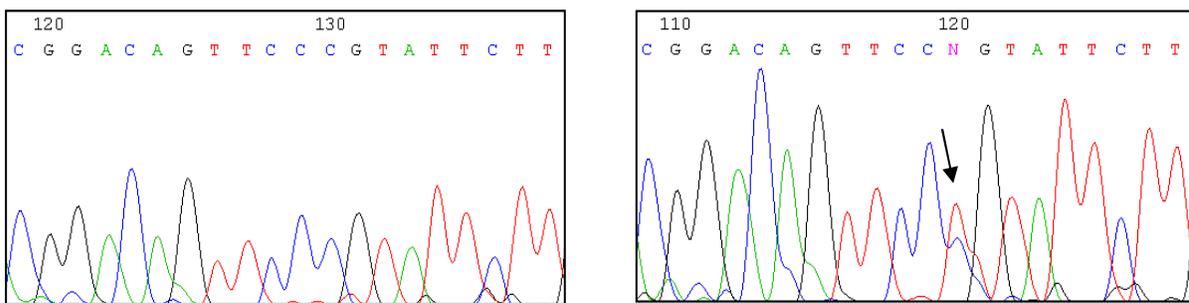


**Figura 6.** Seqüenciamento automático do produto da PCR da região 3/4 (exon 3) do gene TIGR/MYOC de indivíduo normal (à esquerda) e do paciente MJN (à direita) portador da mutação no codon 433 (TGT→CGT, à direita, levando à substituição de uma cisteína por uma arginina). A seta indica o local onde ocorreu a mutação em heterozigose (Cys433Arg).

Além desta mutação, identificou-se em um paciente (3,57%) a transição em heterozigose de citosina para timina na posição 1174, correspondente ao codon 370 do exon 3, codificando leucina ao invés de prolina (CCG para CTG – Pro370Leu) [Figuras 7 e 8]. O paciente que apresentava tal mutação teve seu diagnóstico confirmado aos 22 anos de idade, era do sexo masculino, tinha cor negra e referia antecedente familiar de glaucoma. Este paciente já havia sido submetido a procedimento cirúrgico para controle da PIO (trabeculectomia) em ambos os olhos quando atendido pela primeira vez no Setor de Glaucoma do Hospital das Clínicas da UNICAMP e apresentava acuidade visual de conta dedos e 0,2 nos olhos direito e esquerdo, respectivamente. [Tabela VI].

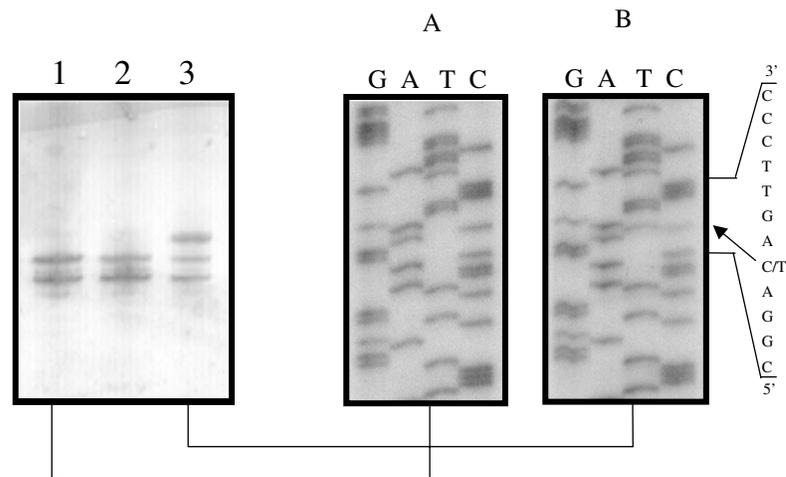


**Figura 7.** À esquerda, SSCP realizado em gel de poliacrilamida 20% do produto da PCR da região 2 do exon 3. Amostra controle (1) e amostras provenientes de indivíduos com GPAA-J (2 - CVD e 3 - HGF). A amostra 2 apresenta padrão de mobilidade eletroforética alterada quando comparada com o controle. À direita, seqüenciamento manual do produto da PCR da região 2 do exon 3 da amostra controle (A) e do paciente 2 (B), mostrando no último a alteração de C para T em heterozigose (indicada pela seta), a qual leva à troca do aminoácido prolina por leucina no codon 370 (Pro370Leu).

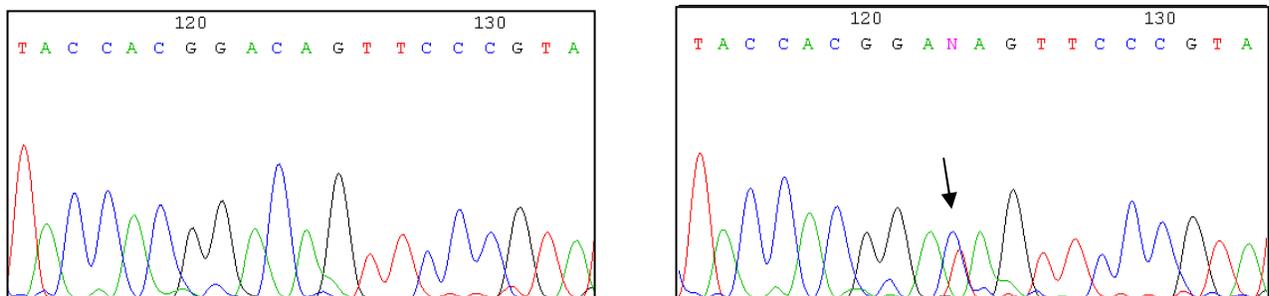


**Figura 8.** Seqüenciamento automático do produto da PCR da região 2 do exon 3 do gene TIGR/MYOC de indivíduo normal (à esquerda) e do paciente CVD (à direita), portador da mutação no codon 370 (CCG→CTG), levando à substituição de uma prolina por uma leucina. A seta indica o local onde ocorreu a mutação em heterozigose (Pro370Leu).

Outra mutação no gene TIGR/MYOC identificada em um paciente (3,57%) foi a troca de glutamina por um codon de terminação na posição 1167 (codon 368) do exon 3 (CAG para TAG – Gln368STOP) [Figuras 9 e 10]. Este paciente apresentava 32 anos de idade ao ser diagnosticado com GPAA-J, era do sexo masculino, de cor branca e apresentava antecedente familiar para glaucoma. A acuidade visual era de MM e 0,3 nos olhos direito e esquerdo. Ao ser examinado no Setor de Glaucoma da UNICAMP, este indivíduo apresentava PIOs de 14 e 12 mmHg nos olhos direito e esquerdo, após ter sido submetido a procedimento cirúrgico para controle da PIO em ambos os olhos. [Tabela VI].

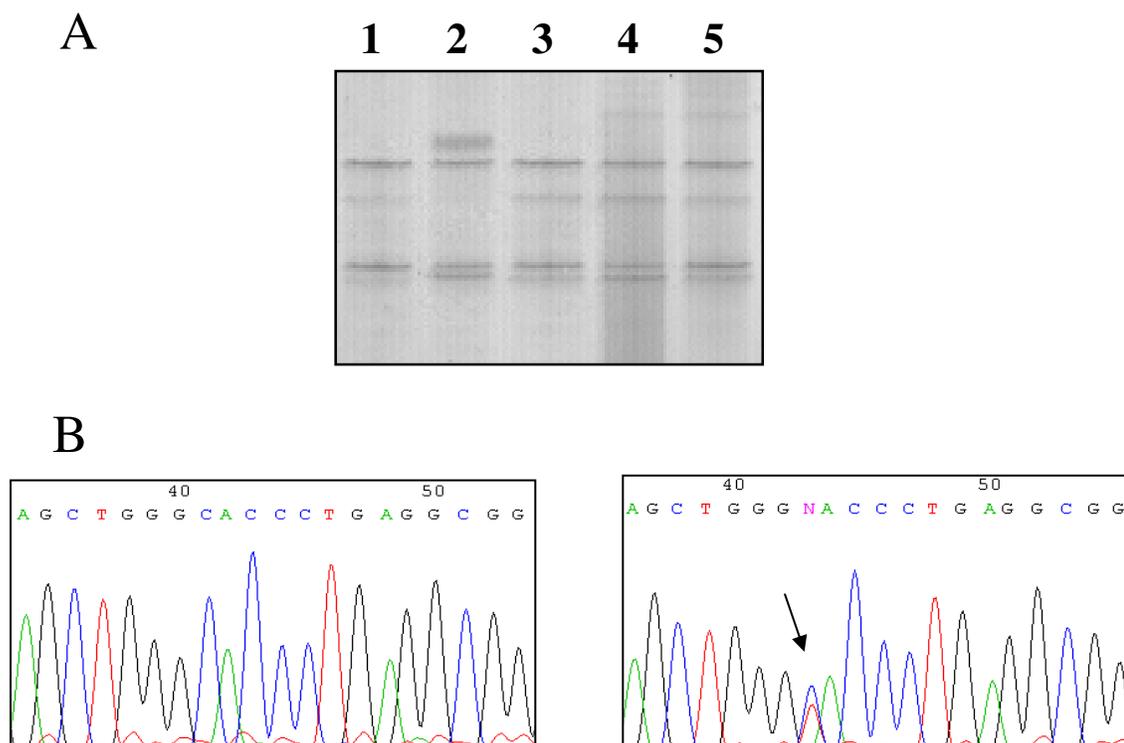


**Figura 9.** À esquerda, SSCP realizado em gel de poliacrilamida 20% do produto da PCR da região 2 do exon 3. Amostra controle (1) e amostras provenientes de indivíduos com GPAA-J (2 - LAB e 3 - JAR). A amostra 3 apresenta padrão de mobilidade eletroforética alterada quando comparada com o controle. À direita, seqüenciamento manual do produto da PCR da região 2 do exon 3 da amostra controle (A) e do paciente 3 (B), mostrando no último a alteração de C para T em heterozigose (indicada pela seta), a qual leva à troca do aminoácido glutamina por um codon de terminação (Gln368 STOP).



**Figura 10.** Seqüenciamento automático do produto da PCR da região 3/2 (exon 3) do gene TIGR/MYOC de indivíduo normal (à esquerda) e do paciente JAR (à direita), portador da mutação no codon 368 (CAG→TAG), levando à substituição de uma glutamina por um codon de terminação. A seta indica o local onde ocorreu a mutação em heterozigose (Gln368STOP).

Em outro paciente, observou-se um polimorfismo no exon 1, posição 430, havendo a troca de citosina por timina (GGC para GGT – codon 122), ambas codificando o aminoácido glicina [Figura 11]. Uma vez que não houve mudança na seqüência do gene TIGR/MYOC, este indivíduo foi considerado como não apresentando mutação neste gene [Tabela VI]. Considerando apenas as alterações na seqüência do gene TIGR/MYOC que resultaram na troca de aminoácidos, a freqüência de mutações foi de 35,71% (10/28) nesta população de indivíduos com GPAA-J.



**Figura 11.** **A.** SSCP realizado em gel de poliacrilamida 20% do produto da PCR da região 5 do exon 1. Amostra controle (1) e amostras provenientes de indivíduos com GPAA-J (2 – CBF, 3 – AAS, 4 – DAJ e 5 - JLU). A amostra 2 apresenta padrão eletroforético alterado quando comparada com o controle. **B.** Sequenciamento automático do produto da PCR da região 1/5 (exon 1) do gene TIGR/MYOC de controle normal (à esquerda) e do paciente CBF (à direita) portador do polimorfismo no codon 122 (GGC→GGT). O aminoácido glicina não sofreu modificação. A seta indica o local onde ocorreu a substituição em heterozigose.

**Tabela VI.** Identificação, idade ao diagnóstico, sexo, cor, antecedente ocular, PIO inicial dos olhos direito e esquerdo, acuidade visual inicial de ambos os olhos e cirurgia antiglaucomatosa de pacientes com GPAA-J e alteração na seqüência do gene TIGR/MYOC.

Identificação	Idade (anos)	Sexo	Cor	Antecedente familiar	PIO OD/OE (mmHg)	Acuidade Visual OD/OE	Cirurgia	TIGR/MYOC Alt. Seq. Gene
DPB	32	masculino	negra	negativo	38/40	1,0/PL	sim	Cys433Arg
IS	35	feminino	branca	positivo	38/38	1,0/1,0	sim	Cys433Arg
NGS	25	masculino	branca	positivo	54/49	0,1/1,0	sim	Cys433Arg
OOL	29	masculino	negra	positivo	44/56	0,6/0,1	sim	Cys433Arg
AS	29	masculino	branca	positivo	60/60	SPL/0,2	sim	Cys433Arg
SAF	24	feminino	branca	positivo	41/52	1,0/1,0	sim	Cys433Arg
VF	27	feminino	branca	positivo	24/24	1,0/1,0	sim	Cys433Arg
MJN	20	masculino	negra	positivo	32/28	1,0/1,0	não	Cys433Arg
CVD	22	masculino	negra	positivo	20/20	CD/0,2	sim	Pro370Leu
JAR	32	masculino	branca	positivo	14/12	MM/0,3	sim	Gln368STOP
CBF	31	masculino	negra	positivo	36/32	CD/1,0	sim	Gly122Gly*

Legenda: PIO = Pressão Intraocular, OD = olho direito, OE = olho esquerdo, SPL = sem percepção luminosa, PL = percepção luminosa, MM = movimento de mãos, CD = conta dedos, \* = polimorfismo, Alt. Seq. Gene = alteração na seqüência do gene

#### 4. Indivíduos com GPAA-J sem Mutação no Gene TIGR/MYOC

A população de indivíduos com GPAA-J sem mutação no gene TIGR/MYOC incluía 18 (64,28%) pacientes. A média de idade desta população ao diagnóstico era de  $25,11 \pm 8,64$  anos. Oito pacientes (44,44%) pertenciam ao sexo masculino, enquanto 10 (55,55%) eram do sexo feminino. Nove (50%) eram brancos, oito (44,44%) eram negros e havia um (5,55%) indivíduo de origem asiática. Destes pacientes, nove (50%) referiam história familiar positiva para o glaucoma. As médias das PIOs iniciais registradas foram de  $26,94 \pm 10,49$  mmHg no olho direito e de  $27,67 \pm 10,62$  mmHg no olho esquerdo. A acuidade visual era maior do que 0,3 em 20 olhos (55,55%) de 13 pacientes, de CD a 0,3 em 10 olhos (27,78%) de oito pacientes e menor do que CD em seis olhos (16,67%) de

quatro pacientes. Houve necessidade de realizar cirurgia para controle pressórico em 21 olhos (58,33%) de 13 pacientes. Três olhos (8,33%) de diferentes pacientes não foram submetidos a procedimento cirúrgico devido à baixa acuidade visual. Um terço dos olhos de pacientes onde não foi constatada mutação no gene TIGR/MYOC não teve indicação cirúrgica para controle pressórico do glaucoma [Tabela VII].

**Tabela VII.** Identificação, idade ao diagnóstico, sexo, cor, antecedente ocular, PIO inicial dos olhos direito e esquerdo, acuidade visual inicial de ambos os olhos e cirurgia antiglaucomatosa de pacientes com GPAA-J e sem alteração na seqüência do gene TIGR/MYOC.

Identificação	Idade (anos)	Sexo	Cor	Antecedente familiar	PIO OD/OE (mmHg)	Acuidade Visual OD/OE	Cirurgia
AAS	39	masculino	negra	positivo	37/42	1,0/MM	sim
CSS	15	feminino	branca	positivo	32/32	0,2/0,8	sim
DAJ	10	masculino	negra	negativo	24/24	0,9/0,9	não
EMI	25	masculino	branca	negativo	30/26	1,0/1,0	sim
EAS	25	feminino	negra	negativo	34/34	CD/CD	sim
HGF	30	feminino	branca	negativo	21/23	0,2/CD	não
JLU	30	masculino	amarela	negativo	12/12	0,9/0,9	sim
JMN	31	masculino	negra	negativo	22/20	CD/0,7	sim
JGK	33	feminino	branca	positivo	28/18	0,8/0,9	sim
JL	24	feminino	branca	positivo	20/24	0,2/0,4	sim
JCS	11	masculino	branca	negativo	20/18	0,6/0,5	não
LAB	36	feminino	branca	positivo	24/25	MM/SPL	sim
LGS	16	feminino	negra	positivo	54/60	PL/MM	sim
MAN	25	masculino	negra	negativo	22/22	CD/PL	não
SCP	19	feminino	branca	negativa	34/30	1,0/1,0	não
SCA	18	feminino	branca	positivo	7/28	0,2/0,5	sim
TE	34	feminino	negra	positivo	28/28	1,0/1,0	sim

Legenda: PIO = Pressão Intraocular, OD = olho direito, OE = olho esquerdo, SPL = sem percepção luminosa, PL = percepção luminosa, MM = movimento de mãos, CD = conta dedos.

## **5. Comparação entre Indivíduos com GPAA-J Apresentando a Mutação Cys433Arg e Indivíduos com GPAA-J sem Mutação no Gene TIGR/MYOC.**

Quando comparou-se o grupo de pacientes com a mutação Cys433Arg com o grupo de pacientes sem mutação no gene TIGR/MYOC, não houve diferenças estatisticamente significantes em relação à média de idade ao diagnóstico, sexo, raça, acuidade visual, e necessidade de procedimento cirúrgico para controle pressórico. A PIO média inicial do olho direito de indivíduos com a mutação Cys433Arg ( $41,37 \pm 11,56$  mmHg) foi significativamente maior que a PIO média inicial do olho direito de indivíduos sem a mutação no gene TIGR/MYOC ( $26,94 \pm 10,49$  mmHg) ( $P = 0,004$ ). A PIO média inicial do olho esquerdo de indivíduos com a mutação Cys433Arg ( $43,37 \pm 13,06$  mmHg) foi significativamente maior que a PIO média inicial do olho esquerdo de indivíduos sem a mutação no gene TIGR/MYOC ( $27,67 \pm 10,62$  mmHg) ( $P = 0,003$ ). O número de pacientes com antecedente familiar positivo e submetidos a procedimento cirúrgico para controle da PIO no grupo de pacientes portador da mutação Cys433Arg foi maior do que no grupo sem mutação, mas esta diferença não alcançou valor estatisticamente significativa [tabela VIII]. Devido ao número reduzido de portadores das mutações Pro370Leu e Gln368STOP, não realizamos comparações entre o perfil clínico desses pacientes e o grupo de pacientes com GPAA-J sem mutação.

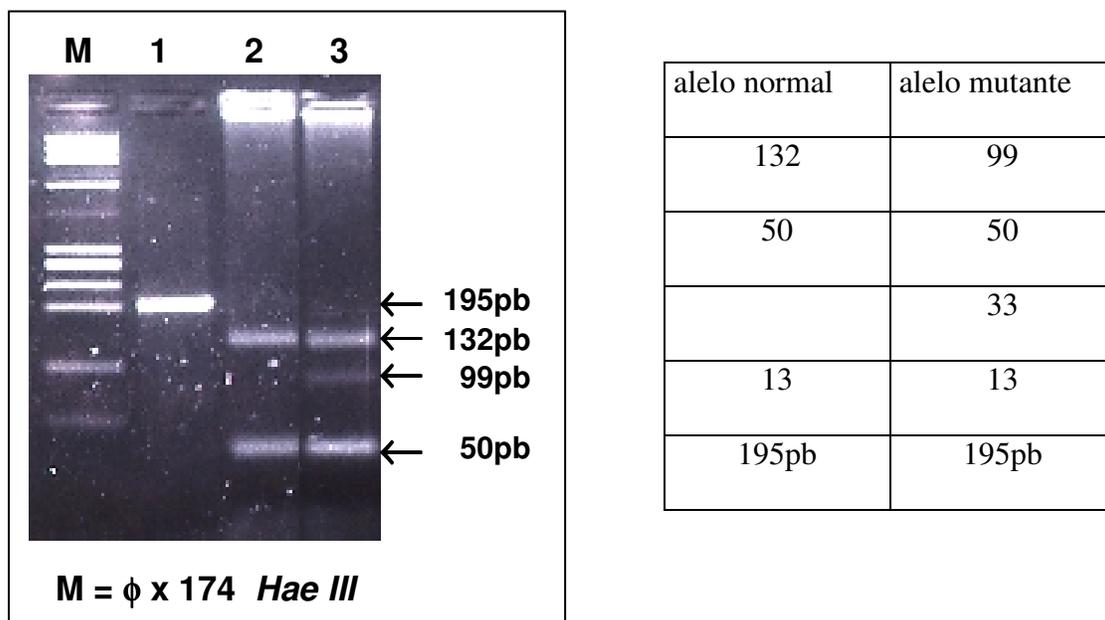
**Tabela VIII.** Comparação dos dados clínicos e demográficos entre pacientes com a mutação Cys433Arg e sem mutação no gene TIGR/MYOC.

	Mutação Cys433Arg (n = 8)	Sem Mutação (n = 18)	P
Idade (anos)	27,62 ± 4,71	25,11 ± 8,64	0,45
Sexo	m = 5, f = 3	m = 8, f = 10	0,67
Cor	B = 5, N = 3	B = 5, N = 3, A = 1	0,61
Antecedente familiar	positivo = 7, negativo = 1	positivo = 9, negativo = 9	0,09
PIO - OD (mmHg)	41,37 ± 11,56	26,94 ± 10,49	0,004*
PIO - OE (mmHg)	43,37 ± 13,06	27,67 ± 10,62	0,003*
Acuidade visual	SPL - MM = 2	SPL - MM = 6	0,66
OD/OE	CD - 0,3 = 3, > 0,3 = 11	CD - 0,3 = 10, > 0,3 = 20	
Procedimento cirúrgico	Sim = 7 Não = 1	Sim = 13 Não = 5	0,62

Legenda: PIO = Pressão Intraocular, OD = olho direito, OE = olho esquerdo, SPL = sem percepção luminosa, MM = movimento de mãos, CD = conta dedos, m = masculino, f = feminino, B = branca, N = negra, A = amarela, \* = estatisticamente significante (P < 0,05)

## 6. Grupo Controle

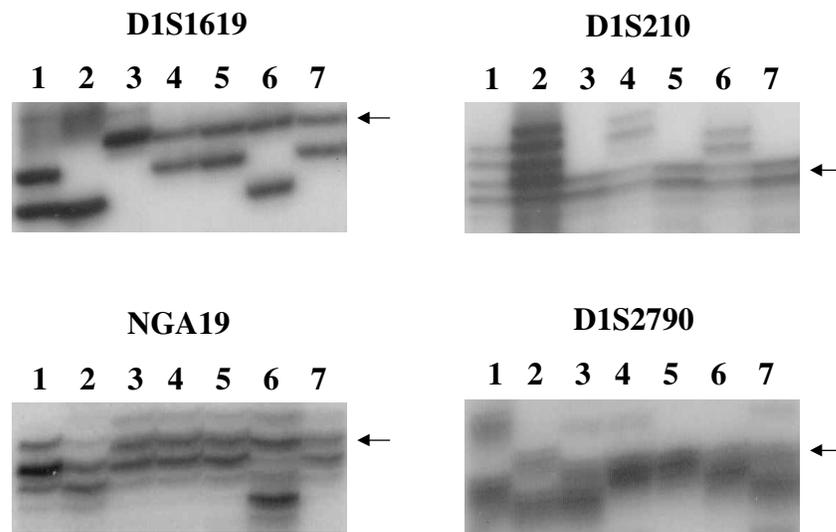
A mutação Cys433Arg criou um novo sítio de restrição durante o processo de digestão com a enzima de restrição *Fok I*. A presença da mutação, no produto da PCR com 195pb (região 4 do exon 3) origina quatro fragmentos (de 13, 33, 99 e 50 pb), enquanto nas amostras de pacientes sem a mutação, três fragmentos (de 13, 50 e 132pb) são formados (**Figura 12**). Após submeter as amostras de DNA do grupo controle à ação da enzima de restrição *Fok I*, não se constatou a presença da mutação Cys433Arg no gene TIGR/MYOC em nenhuma amostra.



**Figura 12.** Gel de agarose 3% representando a digestão com a enzima de restrição *Fok I*. M. marcador de peso molecular. 1. Produto da PCR com 195 pb compreendendo os aminoácidos 412 a 476 do gene TIGR/MYOC, sem digerir. 2. Amostra de um paciente controle (representante da população geral) com dois fragmentos. 3. Amostra de um paciente com GPAA-J com a mutação em heterozigose, com três fragmentos. Os fragmentos de 13 pb e 33pb não podem ser visibilizados no gel. À direita, quadro com o número de pb de cada fragmento criado pela ação da enzima *Fok I* em um alelo normal e alelo mutante.

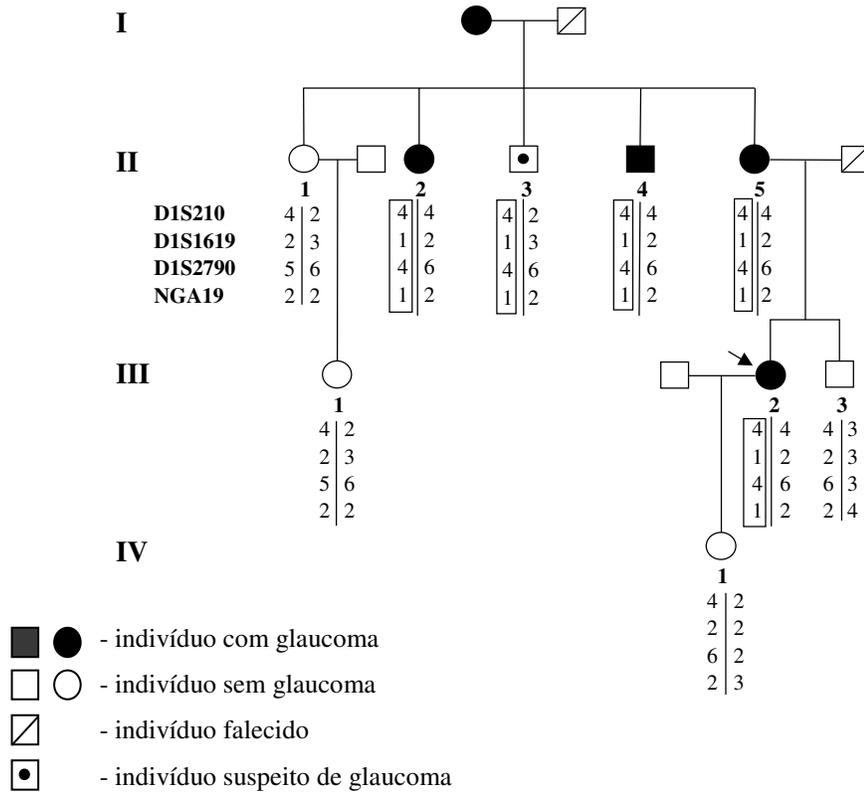
## 7. Análise de Haplótipos

Por meio da análise de haplótipos, constatou-se que todos os pacientes portadores da mutação Cys433Arg provinham de um ancestral comum. Os pacientes portadores da mutação Cys433Arg apresentaram os mesmos alelos (100%) dos marcadores D1S210, D1S1619, D1S2790 e NGA19, fato não observado entre outros indivíduos com GPAA-J e familiares sem a mutação no gene TIGR/MYOC (**Figura 13**).

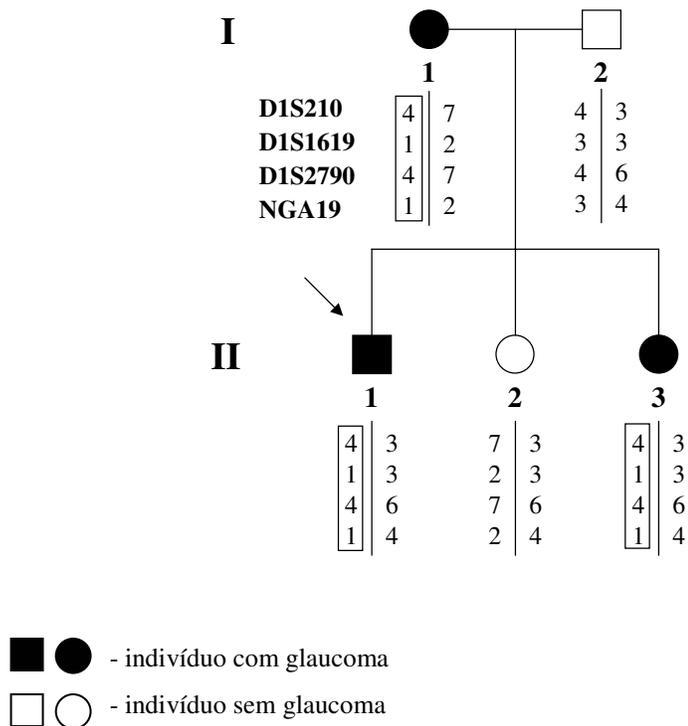


**Figura 13.** Eletroforese em gel de poliacrilamida 6% do produto da amplificação da região dos marcadores D1S1619, D1S210, NGA19 e D1S2790 que flanqueiam o gene TIGR/MYOC. Amostras 1 e 2: controles. Amostras 3 a 7: indivíduos com GPAA-J portadores da mutação Cys433Arg. As setas indicam as bandas correspondentes aos alelos compartilhados pelos indivíduos portadores da mutação Cys433Arg.

Dois heredogramas de duas famílias de pacientes com GPAA-J portadores da mutação Cys433Arg mostraram segregação concomitante da moléstia, da mutação e do haplótipo correspondente aos marcadores D1S210, D1S1619, D1S2790 e NGA19 (**Figuras 14 e 15**). Cada marcador apresenta vários padrões determinados pelo número de repetições de dinucleotídeos, que é representada por um perfil distinto de corrida eletroforética. As diferentes bandas correspondentes aos diferentes padrões são designadas por números (a partir de 1) para cada marcador avaliado.



**Figura 14.** Heredograma I: Família de um dos pacientes (VF) com GPAA-J, indicado pela seta, compreendendo 4 gerações (I a IV). Símbolos preenchidos indicam membros com glaucoma e portadores da mutação Cys433Arg. O indivíduo II-3 é hipertenso ocular, também portador da mutação Cys433Arg e não desenvolveu glaucoma. Quatro marcadores (microssatélites) flanqueando o gene MYOC/TIGR foram usados para a análise de haplótipos. O haplótipo associado ao glaucoma nesta família está circundado por moldura.



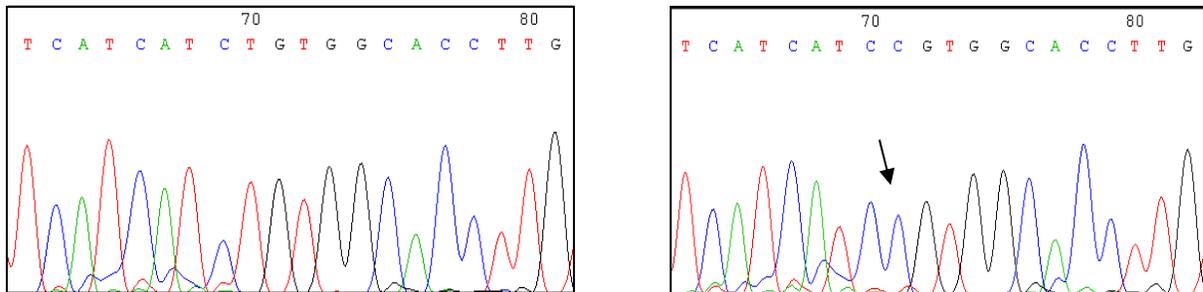
**Figura 15:** Heredograma II: Ramo da família do paciente MJN com GPAA-J, compreendendo duas gerações. Símbolos preenchidos indicam membros com glaucoma e portadores da mutação Cys433Arg. Quatro marcadores (microssatélites) flanqueando o gene MYOC/TIGR foram usados para a análise de haplótipos. O haplótipo associado ao glaucoma nesta família está circundado por moldura.

## 8. Heredograma

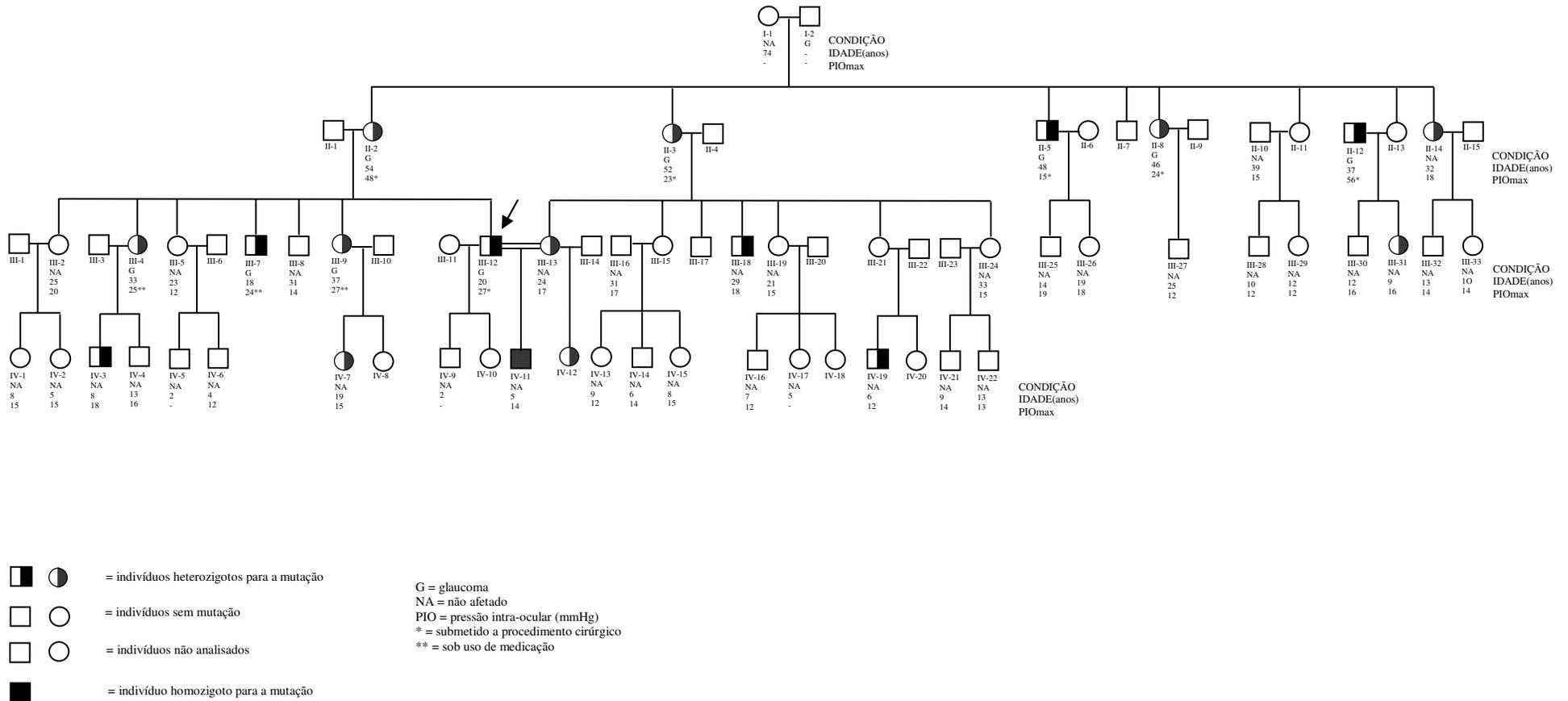
A família do paciente MJN apresenta um heredograma com padrão AD de transmissão. Avaliando-se 44 membros de quatro gerações desta família, 15 (34%) apresentavam a mutação Cys433Arg. Destes, 9 (60%) eram pacientes com diagnóstico de GPAA-J. Nenhum dos 29 indivíduos sem a mutação era portador da moléstia. A mutação manifestava-se em heterozigose em 14 indivíduos e em homozigose em um indivíduo

**(Figura 16).** O indivíduo portador da mutação em homozigose é uma criança de cinco anos que não apresenta diagnóstico de glaucoma até o momento.

Dos nove pacientes com GPAA, cinco haviam sido submetidos a procedimento cirúrgico, incluindo os quatro pacientes acima dos 40 anos. A penetrância da mutação nos indivíduos menores que 10 anos de idade foi de 0% (0/2), na faixa etária de 11 a 30 anos foi de 40% (2/5), atingiu 75% (3/4) entre 31 e 40 anos e foi de 100% nos pacientes acima de 40 anos (4/4) **(Figura 17)**. A mutação Cys433Arg no gene TIGR/MYOC apresentou segregação concomitante neste heredograma.



**Figura 16.** Sequenciamento automático do produto da PCR da região 3/4 (exon 3) do gene TIGR/MYOC do paciente HN. À esquerda controle normal e à direita paciente portador da mutação no codon 433 (TGT→CGT), levando à substituição de uma cisteína por uma arginina. A seta indica o local onde ocorreu a mutação em homozigose.



**Figura 17.** Heredograma III: Família do paciente MJN (seta indicando MJN). Os indivíduos examinados dispõem de informação quanto à presença ou não de glaucoma, idade, PIO, necessidade de tratamento cirúrgico e/ou clínico. Tal informação se encontra abaixo do respectivo símbolo.

## ***IV - DISCUSSÃO***



## **1. Glaucoma Primário de Ângulo Aberto Juvenil – Dados Demográficos**

O primeiro autor a descrever o GPAA-J foi NETTLESHIP (1888), que classificou os glaucomas que surgiam nos primeiros anos de vida em: 1. buftalmo, 2. glaucoma secundário à ceratite associado à sífilis congênita e 3. glaucoma primário em crianças e adultos jovens. Posteriormente, LÖHLEIN (1913) foi o primeiro a considerar como uma entidade distinta o glaucoma que surgia antes dos 40 anos de idade e que diferia do glaucoma congênito (buftalmo) e do glaucoma decorrente de distúrbios de desenvolvimento.

O GPAA-J é uma entidade rara, com uma freqüência entre os glaucomas de 1 para 150-500 casos (GOLDWYN et al, 1970; LEYDHECKER, 1979). A média de idade de diagnóstico da nossa população de 28 pacientes com GPAA-J foi de 25,96 anos, variando de 10 a 39 anos, sendo que a maioria (42,86%) desenvolveu glaucoma entre 20 e 29 anos. A idade dos indivíduos com GPAA-J variou de 6 a 35 anos na série de casos de HAAG (1915) e de 9 a 30 anos na série de LÖHLEIN (1913). Enquanto neste último estudo mais de um terço dos indivíduos (38,80%) apresentava idade variando entre 15 e 20 anos, GOLDWYN et al (1970) observaram que mais da metade dos pacientes por eles descritos apresentaram glaucoma mais tardiamente, mas ainda assim antes dos 30 anos. Outros estudos confirmaram que a faixa etária em que indivíduos com GPAA-J são diagnosticados se situa em torno dos 8 a 45 anos de idade (LEYDHECKER, 1979; LOTUFO et al, 1989; JONAS & BUDDE, 2000).

LÖHLEIN (1913) observou discreto predomínio do GPAA-J em indivíduos do sexo masculino, o que também foi observado por GOLDWYN et al (1970) e LOTUFO et al (1989). Outros autores constataram equilíbrio na distribuição por sexo, como HAAG (1915), LEYDHECKER (1979) e JONAS & BUDDE (2000). O nosso estudo mostrou

distribuição homogênea por sexo, com 15 pacientes pertencentes ao sexo masculino (53,57%) e 13 (46,42%) pacientes do sexo feminino.

Quanto à distribuição por raça, os estudos de LÖHLEIN (1913), GOLDWYN et al (1970), LEYDHECKER (1979) e JONAS & BUDDE (2000) incluíram apenas pacientes brancos. LOTUFO et al (1989) observaram que, entre os 43 pacientes descritos, 20 (47%) eram negros, 16 (37%) brancos e 7 (16%) hispânicos. Em nossa população de pacientes, a maioria era constituída por indivíduos brancos (53,57%) seguidos pelos pacientes da raça negra (42,86%) e de origem asiática (3,57%).

História familiar de glaucoma estava presente em 42,80%, 40% e 37% dos indivíduos avaliados por GOLDWYN et al (1970), LEYDHECKER (1979) e LOTUFO et al (1989), respectivamente. Neste último relato, os pacientes da raça negra apresentavam uma proporção maior de antecedente familiar positivo (52%) do que os indivíduos de cor branca (25%). Entre os pacientes avaliados em nosso estudo, 18 (64,28%) apresentaram história familiar positiva para glaucoma. No entanto, apesar de observarmos uma maior frequência de história familiar positiva entre indivíduos de cor branca (11/15 ou 73,33%) do que em indivíduos de cor negra (7/12 ou 58,33%), esta diferença não foi estatisticamente significativa ( $P = 0,95$ ).

Considerando os valores de PIO entre os pacientes com GPAA-J, LEYDHECKER (1979) constatou que nove de 15 (60%) pacientes de sua casuística apresentavam PIO acima de 30 mmHg, sendo que os níveis mais altos estavam entre aqueles com história familiar positiva. A PIO média entre os pacientes com GPAA-J foi de  $36,8 \pm 9,2$  mmHg no estudo de LOTUFO et al (1989) e mostrou-se frequentemente acima dos 30 mmHg antes do início da terapêutica na série de pacientes publicada por JONAS & BUDDE (2000). Em

concordância com a literatura, o presente estudo constatou que a média da PIO foi de 30,36  $\pm$  12,70 mm Hg no olho direito e 31,32  $\pm$  13,63 mm Hg no olho esquerdo, apresentando-se maior do que 30 mmHg em pelo menos um dos olhos de 14 dos 28 (50%) indivíduos avaliados. Os valores médios da PIO obtidos em ambos os olhos eram maiores entre os pacientes com antecedente familiar positivo (32,94  $\pm$  14,21 mmHg – olho direito e 34,89  $\pm$  14,92 mmHg – olho esquerdo) comparados aos indivíduos sem antecedente familiar (25,70  $\pm$  8,03 mmHg - olho direito e 24,90  $\pm$  8,08 mmHg – olho esquerdo) (P = 0,151 – olho direito e P = 0,030 – olho esquerdo).

Aproximadamente um terço dos pacientes da nossa população era composta por indivíduos míopes, o que também foi observado por LÖHLEIN (1913) e GOLDWYN et al (1970). A maior porcentagem de indivíduos míopes (72,3%) foi observada na série de LOTUFO et al (1989). Enquanto o presente estudo revelou que os equivalentes esféricos médios na nossa população foram de - 2,37  $\pm$  5,28 dioptrias no olho direito e - 2,79  $\pm$  5,87 dioptrias no olho esquerdo, JONAS & BUDDE (2000) obtiveram entre seus 28 pacientes a média de - 0,89 +/- 1,65 dioptrias (- 5,00 a 0,75). A predominância de miopia no GPAA-J observada em nosso estudo e nos demais contrasta com o averiguado para a população geral e com GPAA do tipo adulto (MITCHELL et al, 1999).

## **2. Mutações no Gene TIGR/MYOC**

Entre as diversas populações analisadas quanto à presença de mutações no gene TIGR/MYOC, a norte-americana foi a primeira a ser avaliada no estudo pioneiro de STONE et al (1997). Neste estudo, os autores avaliaram oito famílias com GPAA-J, identificando alterações na seqüência do gene TIGR/MYOC em cinco famílias (62,50%).

As mutações no gene TIGR/MYOC descritas por STONE et al (1997) incluíram: Tyr437His, Gln368STOP e Gly364Val. A frequência de mutações observada por estes autores foi artificialmente elevada devido à inclusão de indivíduos pertencentes a quatro famílias previamente ligadas ao locus GLC1A. Em 1998, WIGGS(b) et al avaliaram 25 pacientes com GPAA-J e 127 pacientes com GPAA. Os autores obtiveram uma prevalência de mutações no gene TIGR/MYOC entre os pacientes com GPAA-J de 8% (2/25) (Tyr437His e Pro370leu) e entre os pacientes com GPAA-A de 3,93% (5/127). SHIMIZU et al (2000), avaliando pacientes de origem norte-americana, sendo 25 com GPAA-J e 49 com GPAA-A, encontraram uma taxa de mutações no gene TIGR/MYOC de 36% (9/25) e 4,08% (2/49), respectivamente.

ALWARD et al (1998b) investigaram a presença de alterações no gene TIGR/MYOC em 716 pacientes com GPAA (não fazendo distinção entre GPAA-J e GPAA-A) e 596 indivíduos pertencentes a um grupo controle. Para que uma mutação fosse considerada associada ao glaucoma, os autores utilizaram os seguintes critérios: estar presente em um ou mais pacientes glaucomatosos e em menos de 1% da população geral, levar à alteração da seqüência de aminoácidos do gene TIGR/MYOC e estar ausente entre os indivíduos sem glaucoma. Dezesseis mutações foram identificadas em 33 pacientes, totalizando 4,6% da população com GPAA, sendo que seis mutações foram observadas em mais de um indivíduo.

Um estudo para avaliar a ocorrência de alterações na seqüência do gene TIGR/MYOC entre pacientes espanhóis com GPAA (n = 79) e um grupo representando a população geral (n = 90) revelou prevalências de 7,5% (8/79) e 2,22% (2/90), respectivamente (VASQUES et al, 2000). Cem pacientes com GPAA do tipo esporádico e duas famílias com GPAA-J de descendência alemã foram avaliadas para alterações na

seqüência do gene TIGR/MYOC por MICHELS-RAUTENSTRAUSS et al (1998). Ambas as famílias com GPAA-J apresentaram mutação (Pro370Leu e Gly367Arg). Entre os 100 pacientes com GPAA-A, indentificou-se o polimorfismo Tyr347Tyr em dois pacientes, porém nenhuma mutação foi encontrada.

Alterações na seqüência do gene TIGR/MYOC na população chinesa foram descritas por LAM et al (2000). Entretanto, tais alterações não foram consideradas associadas ao GPAA, uma vez que estavam presentes em 19% (17/91) dos pacientes com GPAA e 26% (34/132) do grupo controle. Outro estudo (YOON et al, 1999) avaliando 45 pacientes coreanos com GPAA, identificou dois pacientes com mutações no gene TIGR/MYOC: um paciente com GPAA-J (Arg46STOP em homozigose) e outro com GPAA-A (Thr353Ile). SUZUKI et al (1997) realizaram um rastreamento de mutações no gene TIGR/MYOC em 50 pacientes japoneses com GPAA e observaram duas alterações na seqüência do gene (4%). Um paciente com GPAA-J apresentava a mutação Pro370Leu e o outro com GPAA mostrava a mutação Gly367Arg. Outro estudo avaliando uma população de 140 pacientes japoneses com GPAA constatou a presença de 10 variações na seqüência do gene TIGR/MYOC (KUBOTA et al, 2000). Destas, quatro foram consideradas mutações, o que representa uma freqüência nesta amostra de 2,85%.

Usando os mesmos critérios para definir mutação do estudo de ALWARD et al (1998b), um rastreamento de mutações no gene TIGR/MYOC foi realizado em 1703 pacientes com GPAA (FINGERT et al, 1999) provenientes do estado de Iowa (EUA), Nova York (EUA, pacientes negros), Japão, Canadá e Austrália. Os autores identificaram um total de 61 alterações da seqüência do gene TIGR/MYOC, das quais 21 foram consideradas como associadas ao glaucoma. As prevalências de mutações no gene TIGR/MYOC foram de 4,26% (31/727) entre os norte-americanos caucasóides, 2,56%

(8/312) entre os negros norte-americanos de Nova York, 2,80% (3/107) na população japonesa, 2,99% (5/167) na população canadense e 2,82% (11/390) entre os australianos. Considerando-se a população como um todo, a frequência de mutações no gene TIGR/MYOC foi de 3,4%.

VASCONCELLOS et al (1998) avaliaram uma população brasileira de 52 indivíduos com GPAA-A e identificaram dois pacientes (3,85%) portadores de mutação no gene TIGR/MYOC (Gln368STOP e Cys433Arg). Este número poderia ter sido maior, uma vez que o rastreamento incluiu somente parte do exon 3. A frequência de mutações no gene TIGR/MYOC observada em nossa população de pacientes com GPAA-J foi de 35,71% (10/28). A revisão da literatura confirmou que este foi o primeiro estudo de rastreamento de mutações no gene TIGR/MYOC realizado em pacientes glaucomatosos na América Latina. Os tipos de mutação presentes em nossa população de pacientes com GPAA-J foram: Cys433Arg (8/28), Pro370Leu (1/28) e Gln368STOP (1/28). Além disso, identificou-se uma alteração na sequência do gene TIGR/MYOC que não produzia troca de aminoácidos e que, portanto, foi considerada como polimorfismo. Este polimorfismo, Gly122Gly, já havia sido descrito em outros estudos englobando as populações branca e negra norte americana e australiana (AIWARD et al, 1998b; FIGERT et al, 1999).

A prevalência de mutações no gene TIGR/MYOC descrita neste grupo de pacientes com GPAA-J (35,71%) foi semelhante à observada por SHIMIZU et al (2000). Contudo, enquanto em nossa amostra foram identificados três tipos de mutação (Cys433Arg, Pro370Leu e Gln368STOP), SHIMIZU et al (2000) descreveram oito tipos de mutação no gene TIGR/MYOC (Ile499Ser, Ile477Asn, Val426Phe, Thr377Met, Pro370Leu, Glu323Lys, Arg272Gly e Gly252Arg). A alta prevalência de mutações no gene TIGR/MYOC descrita nesta amostra deve-se, em parte, ao fato de termos incluído em

nosso estudo apenas pacientes com GPAA-J, entidade onde mutações neste gene foram inicialmente identificadas (STONE et al, 1997). Além disto, identificamos uma nova alteração na seqüência do gene localizada no exon 3 (Cys433Arg), até o momento descrita somente na população brasileira e que isoladamente representou 80% (8/10) do total de mutações. O estudo de haplótipos, revelando que pacientes com a mutação Cys433Arg eram provenientes de um ancestral comum, pode ter contribuído para explicar a maior freqüência de mutações no gene TIGR/MYOC em relação a outras populações. Ao avaliar-se a presença desta mutação em um grupo controle de 100 indivíduos representando a população geral, da mesma região e com a mesma distribuição étnica, não se identificou nenhum portador desta. O fato da mutação Cys433Arg, apresentar segregação concomitante com GPAA-J em dois heredogramas avaliados reforça a associação importante entre esta mutação e a moléstia.

A maioria das alterações na seqüência do gene TIGR/MYOC associadas ao GPAA descritas até o momento encontram-se no exon 3 e no domínio da olfactomedina. A olfactomedina é uma glicoproteína identificada por SNYDER et al (1991), localizada no neuroepitélio olfatório de sapos e com peso molecular de 57 kDa. Trata-se da principal glicoproteína secretada na matriz extracelular do neuroepitélio olfatório (BAL & ANHOLT, 1993), apresentando regiões altamente conservadas na região carboxi-terminal, incluindo resíduos de cisteína essenciais na formação de homopolímeros através de pontes dissulfeto (YOKOE & ANHOLT, 1993; KARAVANICH & ANHOLT<sup>a</sup>, 1998; KARAVANICH & ANHOLT<sup>b</sup>, 1998). É interessante observar que esta proteína está presente desde os anelídeos (*caenorhabditis elegans*), peixes, anfíbios e mamíferos até os seres humanos, mostrando que deve ter uma função importante no metabolismo, particularmente do sistema nervoso central (KARAVANICH & ANHOLT, 1998a;

KARAVANICH & ANHOLT, 1998b). Nos seres humanos, existem até o presente momento seis diferentes genes pertencentes à família da olfactomedina. O gene TIGR/MYOC é um dos componentes desta família, que se completa com a hOlfA, expresso no tecido cerebral, hOlfB, expresso no pâncreas e próstata, hOlfC, expresso no cerebelo e hOlfD, sintetizado no cólon, intestino delgado e próstata (KULKARNI et al, 2000).

O gene TIGR/MYOC encontra-se expresso tanto no meio intracelular como no extracelular (UEDA et al, 2000) de diversas estruturas oculares, particularmente no seio cameral, incluindo a matriz extracelular, as células trabeculares e as células endoteliais do canal de Schlemm (STAMER et al, 1998; KARALI et al, 2000; WANG & JOHNSON, 2000; UEDA et al, 2000). A glicoproteína codificada pelo gene TIGR/MYOC também foi observada no humor aquoso de olhos submetidos à extração de catarata e cirurgia antiglaucomatosa (RUSSELL et al, 2001). O mecanismo exato da participação deste gene na homeostase do humor aquoso e conseqüentemente no controle da PIO não está ainda esclarecido (WORDINGER & CLARK, 1999; WANG & JOHNSON, 2000). CABALLERO et al (1999) sugerem que mecanismos intra e extracelulares possam estar envolvidos no distúrbio da homeostase do humor aquoso induzido por alterações do gene TIGR/MYOC.

Considerando as estruturas intracelulares, MERTTS et al (1999) observaram que esta proteína estava associada ao citoesqueleto celular. O estudo de UEDA et al (2000) constatou a presença da proteína codificada pelo gene TIGR/MYOC nos filamentos intermediários e fibras de actina, ambos componentes do citoesqueleto celular. Esta estrutura intracelular têm participação no formato da célula, na comunicação intracelular entre diferentes organelas, no transporte de proteínas secretórias e na adesão e migração das células eucarióticas (MERTTS et al, 1999; UEDA et al, 2000). Modificações na estrutura

terciária da proteína TIGR/MYOC decorrentes de mutações na seqüência de seu gene poderiam alterar a forma das células trabeculares e sua interação com outras células, interferindo com a homeostase do humor aquoso (MERTTS et al, 1999).

Além disto, estudo realizado por O'BRIEN et al (2000) observou a presença da proteína TIGR/MYOC no retículo endoplasmático e complexo de Golgi. Os autores argumentaram que possíveis alterações na estrutura proteica interfeririam com as funções do complexo de Golgi, como transporte, armazenamento e secreção de proteínas. Tais alterações poderiam diminuir a viabilidade das células trabeculares e resultar em redução do número destas, fato bem documentado entre os pacientes com GPAA (ALVARADO, MURPHY, JUSTER, 1984; MCMENAMIN, LEE, AITKEN, 1986).

Finalmente, ZIMMERMAN et al (1999) sugeriram que eventos pós-tradução (adição de grupos de açúcares, fosforilação, ajuste da estrutura terciária da proteína e associação de sub-unidades da proteína), que ocorrem no retículo endoplasmático, estariam retardados nas proteínas que apresentam mutações de ponto no domínio da olfactomedina do gene TIGR/MYOC. Mutações nesta região poderiam influenciar a capacidade da proteína codificada pelo gene TIGR/MYOC em alcançar ou interagir com seus sítios de ação intra e extracelulares (ZIMMERMAN et al, 1999).

Evidências em cultura de tecidos da malha trabecular (NGUYEN et al, 1998) e no humor aquoso de bovinos, macacos e humanos (RUSSELL et al, 2001) mostraram que a proteína codificada pelo gene TIGR/MYOC na sua forma extracelular pode também apresentar-se como um polímero. Esta conformação é possível graças à formação de pontes dissulfeto através do aminoácido cisteína localizado na posição 433 do gene TIGR/MYOC e pelo zíper de leucina localizado no exon 1 (NGUYEN et al, 1998). Mutações afetando o domínio que inclui este resíduo poderiam alterar a oligomerização da proteína, interferindo

na sua interação ao nível da matriz extracelular e superfície celular, o que potencialmente comprometeria o escoamento do humor aquoso pela malha trabecular (NGUYEN et al, 1998).

Entre os indivíduos avaliados neste estudo, a mutação Cys433Arg em heterozigose (que leva à troca de um resíduo de cisteína por uma arginina) foi a mais freqüente. A cisteína apresenta um grupo sulfidril (-SH), que pode oxidar-se, formando uma ponte dissulfeto (-S-S-) com uma segunda cisteína da mesma proteína (participando de sua estrutura terciária), ou de outra proteína (formando polímeros) (YOKOE & ANHOLT, 1993; LODISH et al, 1999). A cisteína na posição 433 (seqüência em seres humanos) do gene TIGR/MYOC é uma das mais conservadas entre as espécies, estando presente em bovinos, ratos, camundongos e seres humanos (KARAVANICH & ANHOLT, 1998a; KARAVANICH & ANHOLT, 1998b; TANIGUCHI et al, 2000; TAGUCHI et al, 2000; NGUYEN et al, 1998). Portanto, alterações neste resíduo, como descrito pela primeira vez em nossa população, poderiam levar à disfunção da proteína TIGR/MYOC modificando sua conformação terciária (RICHARDS, 2000) e reduzindo sua capacidade de formação de polímeros (NGUYEN et al, 1998). Estes aspectos talvez justifiquem o fato desta mutação estar associada a um glaucoma de instalação precoce (média de idade de diagnóstico do glaucoma =  $27,62 \pm 4,71$  anos), com PIO elevada (PIO =  $41,37 \pm 11,56$  mmHg – OD e  $43,37 \pm 13,06$  mmHg - OE) e de difícil controle pressórico (sete entre oito pacientes necessitaram de procedimento cirúrgico).

Ao compararmos os pacientes portadores da mutação Cys433Arg com os pacientes sem mutação no gene TIGR/MYOC, constatamos que a PIO era significativamente maior no grupo de pacientes portador da mutação Cys433Arg do que entre os pacientes com

GPAA-J sem a mutação ( $P = 0,004$  para olho direito e  $P = 0,003$  para olho esquerdo) (**Tabela VIII**). Além disto, a porcentagem de pacientes submetidos a procedimento cirúrgico para controle da PIO foi maior no grupo com a mutação Cys433Arg (87,50%) do que no grupo sem a mutação (72,22%), apesar desta diferença não ser estatisticamente significativa ( $P = 0,62$ ). Estes achados sugerem que os pacientes com GPAA-J portadores da mutação Cys433Arg podem estar sujeitos a um controle mais difícil desta moléstia.

Outra mutação identificada em nossa população foi a troca de uma prolina por uma leucina, em heterozigose, no codon 370 do exon 3 do gene TIGR/MYOC (Pro370Leu). Esta mutação foi relatada na literatura pela primeira vez em 1997 por SUZUKI et al, ao rastrear alterações na seqüência do gene TIGR/MYOC em uma população japonesa de 52 pacientes com GPAA. Esta mutação estava presente em um paciente que desenvolveu glaucoma aos 16 anos de idade, e a herdou de seu pai, que manifestou o glaucoma aos 26 anos de vida. Em nosso estudo, o paciente portador da mutação Pro370Leu pertencia ao sexo masculino, era de cor branca, e apresentava história familiar positiva para o glaucoma, que foi diagnosticado aos 22 anos de idade. Este paciente foi submetido a procedimento cirúrgico em ambos os olhos para controle pressórico. O quadro clínico associado à mutação Pro370Leu é caracterizado pelo aparecimento precoce do glaucoma, pelos altos níveis de PIO e pela necessidade freqüente de procedimento cirúrgico para seu controle (ADAM et al, 1997; MICHELS-RAUTENSTRAUSS et al, 1998; ROZSA et al, 1998; STOILOVA et al, 1998; WIGGS et al, 1998b). Nosso estudo confirmou a ampla distribuição desta mutação em pacientes com GPAA-J, fato previamente documentado em outras populações.

Duas famílias francesas com GPAA-J apresentaram a mutação Pro370Leu (ADAM et al, 1997). Os pacientes destas famílias foram diagnosticados com a média de idade de 10

anos (variando de 6 a 14 anos) e 11 anos (de 7 até 27 anos), respectivamente. Uma outra família de origem franco-canadense apresentou uma média de idade de desenvolvimento de GPAA-J de 12 anos (variando de 9 a 14 anos) e valores de PIO situando-se entre 35 e 55 mmHg (STOILOVA et al, 1998). A mesma mutação foi identificada na população norte-americana em um paciente com GPAA-J (diagnóstico aos 6 anos e PIO de 38 mmHg) (WIGGS et al, 1998b) e em outra família, que apresentou média de idade ao diagnóstico de 12 anos e média da PIO de 45 mmHg (ROZSA et al, 1998). Na população alemã, MICHELS-RAUTENSTRAUSS et al (1998) avaliaram uma família com GPAA-J, onde sete dos 21 indivíduos portadores da mutação Pro370Leu já haviam sido submetidos à cirurgia para controle do glaucoma antes dos 15 anos de idade.

A mutação Pro370Leu também ocorre no domínio da olfactomedina, onde a maioria das mutações associadas ao glaucoma foram identificadas (SUZUKI et al, 1997). Entretanto, diferente do resíduo de cisteína, o aminoácido prolina no codon 370 não se mostra conservado nas diferentes espécies (ADAM et al, 1997). Isto pode indicar que a correlação entre importância funcional e conservação do resíduo durante o processo evolutivo da proteína nem sempre é necessário e que este fato pode representar uma especialização da função proteica ao longo da evolução (ADAM et al, 1997). Em outras palavras, o fato deste resíduo estar presente apenas na estrutura da proteína codificada pelo gene TIGR/MYOC em mamíferos (ADAM et al, 1997; TANIGUCHI et al, 2000; TAGUCHI et al 2000) sugere uma possível especialização da função desta proteína graças à presença do aminoácido prolina nesta região, o que tornaria sua manutenção na estrutura proteica importante nestas espécies. ROZSA et al (1998) avaliaram a estrutura da proteína codificada pelo gene TIGR/MYOC, observando que a mutação Pro370Leu ocorre próxima a um sítio de ligação de uma enzima denominada caseína quinase II. Entretanto, os autores

sugeriram que a mudança na conformação da proteína TIGR/MYOC devido à mutação Pro370Leu não está restrita a ação no sítio caseína quinase II, uma vez que esta mutação leva a uma forma de glaucoma mais severa do que outras alterações localizadas na mesma região.

Um paciente da nossa população apresentou a mutação Gln368STOP em heterozigose. Este indivíduo, do sexo masculino, cor branca e antecedente familiar para a moléstia, teve seu glaucoma diagnosticado aos 32 anos de idade e foi submetido à cirurgia antiglaucomatosa para controle pressórico em ambos os olhos. Esta alteração na seqüência do gene TIGR/MYOC foi a mais freqüente das mutações descritas por STONE et al (1997), ocorrendo em 2,64% (6/227) de pacientes com glaucoma e antecedente familiar, em 2,91% (3/103) de pacientes com glaucoma não selecionados, em 0,26% (1/380) de indivíduos representando a população geral e em 0% de voluntários normais. O mesmo estudo avaliou a população norte-americana e identificou outras duas alterações na seqüência do gene TIGR/MYOC: uma troca de glicina por valina no codon 364, presente em 0,88% (2/227) dos pacientes pertencentes ao grupo de glaucoma com antecedente familiar positivo e a mutação Tyr437His (troca de tirosina por histidina no codon 437), também presente em 0,88% (2/227) do mesmo grupo.

Outros estudos populacionais de rastreamento de mutações no gene TIGR/MYOC (ALWARD et al, 1998b; WIGGS et al, 1998b; FINGERT et al, 1999) confirmaram que a mutação Gln368STOP é a mais freqüentemente observada. WIGGS et al (1998b) obsevaram-na em três dos cinco pacientes com GPAA-A portadores de mutação no gene TIGR/MYOC. ALWARD et al (1998b) constataram-na em 2,09% (15/716) dos pacientes avaliados, enquanto FINGERT et al (1999) verificaram que a mutação Gln368STOP estava presente em canadenses, norte-americanos e australianos, porém não foi detectada em

japoneses e negros. Os autores concluíram que, se os seus achados de prevalência da mutação Gln368STOP refletirem sua real prevalência no mundo, esta representaria a causa de glaucoma mais comum de base molecular conhecida. Em nossa população de pacientes com GPAA-J, esta mutação ocorreu em 3,57% (1/28) dos indivíduos. Numa população brasileira com GPAA-A, a frequência da mutação Gln368STOP foi de 1,92% (1/52) (VASCONCELLOS et al, 1998). Estes fatos confirmam que a mutação Gln368STOP também se encontra amplamente distribuída em diferentes populações. Esta mutação apresenta um fenótipo clinicamente menos agressivo do que o observado na mutação Pro370Leu, com os pacientes apresentando glaucoma mais tardiamente (WIGGS et al, 1998), com idade de diagnóstico variando de 36 a 77 anos (média de 59 anos) e PIO média em torno de 30 mmHg (ALWARD et al, 1998b). SHIMIZU et al (2000), observaram a mutação Gln368STOP em dois probandos caucasóides norte americanos com GPAA-A. Ao avaliarem as duas famílias destes pacientes, os autores constataram que as mesmas continham indivíduos acometidos pela mutação e apresentando GPAA-J e GPAA-A, com média de idade ao diagnóstico variando de 28 a 49 anos e média de PIO em torno de 36 mmHg. Um estudo restrito a 29 famílias de pacientes com GPAA-A de origem norte-americana descreveu a mutação Gln368STOP em aproximadamente 10% delas (ALLINGHAM et al, 1998b). Este aumento na frequência da mutação Gln368STOP nesta população específica é provavelmente decorrente da inclusão de indivíduos com GPAA-A e antecedente familiar positivo (casos esporádicos não foram avaliados).

A mutação Gln368STOP em heterozigose leva à síntese (por um dos alelos) de uma proteína truncada em 135 aminoácidos na porção carbóxi-terminal da proteína TIGR/MYOC, comprometendo aproximadamente metade do domínio da olfactomedina (ALLINGHAM et al, 1998b). Tanto as alterações do tipo sem sentido (truncamento da

síntese de uma cadeia polipeptídica através da inserção de um codon de terminação) como de sentido trocado (mutações de ponto levando a troca de um aminoácido na seqüência codificadora do gene) podem levar a alterações na estrutura terciária da proteína, o que, por sua vez, pode alterar sua função, meia vida e interação com outras proteínas (ALLINGHAM et al, 1998b; LODISH et al, 1999).

As diferenças de fenótipos entre a mutação sem sentido Gln368STOP e as mutações de ponto (sentido trocado) como a Pro370Leu e Cys433Arg, provavelmente devem-se ao fato de as alterações na seqüência do gene TIGR/MYOC atuarem predominantemente através de um mecanismo dominante negativo (presença de proteína anormal) e não pela insuficiência de haplótipo (observada na síntese proteica truncada). Se o fenótipo do glaucoma dependesse apenas da redução da quantidade normal do produto do gene TIGR/MYOC (insuficiência de haplótipo), não se esperariam diferenças clínicas entre os indivíduos acometidos pelos diferentes tipos de mutação. Por outro lado, se o produto mutado do gene TIGR/MYOC participasse ativamente do desenvolvimento da moléstia (efeito dominante negativo), diferenças clínicas entre os vários tipos de mutação seriam constatadas (ALWARD et al, 1998b). De fato, como mencionado, diferentes mutações no gene TIGR/MYOC estão associadas a fenótipos que variam em termos de severidade, época de instalação e níveis pressóricos.

Até o presente momento, várias mutações no gene TIGR/MYOC já foram descritas nas mais diversas populações [tabela IX]. Das 48 mutações no gene TIGR/MYOC descritas, oito (16,67%) estão localizadas no exon 1, seis (12,50%) no exon 3 fora do domínio da olfactomedina e as 34 restantes (70,83%) no domínio da olfactomedina. Na população chinesa e japonesa há uma distribuição mais homogênea de mutações nos três exons do gene TIGR/MYOC (FINGERT et al, 1999; KUBOTA et al, 2000; LAM et al,

2000), ao passo que, entre os coreanos, as alterações na seqüência do gene TIGR/MYOC associadas ao glaucoma são restritas ao exon 1 (YAN et al, 1999; PANG et al, 2000). Nas populações caucasianas norte-americana, européia e australiana as mutações encontram-se predominantemente no exon 3 no domínio da olfactomedina (ADAM et al, 1997; STOILOVA et al, 1997; STONE et al, 1997; ALLIGHAN et al, 1998b; ALWARD et al, 1998b; ANGIUS et al, 1998; KENNAN et al, 1998; MANSERGH et al, 1998; MICHELS-RAUTENSTRAUSS et al, 1998; MOURISSETE et al, 1998; ROSZA et al, 1998; STOILOVA et al, 1998; WIGGS et al, 1998b; FINGERT et al 1999; SHIMIZU et al, 2000). Três mutações foram identificadas entre negros norte americanos, todas no exon 3 do gene TIGR/MYOC, sendo duas no domínio da olfactomedina (FINGERT et al, 1999). Onze mutações (22,91%) estão presentes em mais de uma população, enquanto 37 (77,0%) são específicas para determinadas regiões. A maioria das mutações no gene TIGR/MYOC foi identificada em indivíduos com idade de instalação compatível com GPAA-J e GPAA-A. No entanto, alguns tipos de mutação estão associados à instalação precoce do glaucoma (ex: Pro370Leu e Gly246Arg), enquanto outras alterações na seqüência do gene associam-se à instalação mais tardia, compatível com GPAA (**Tabela IX**).

A tabela IX incluiu apenas alterações na seqüência do gene TIGR/MYOC consideradas associadas ao GPAA. Alterações onde não ocorreram troca de aminoácidos na proteína, ou alterações com troca de aminoácidos, porém com distribuição equilibrada entre a população de pacientes com glaucoma e a população geral foram consideradas como polimorfismos e não foram incluídas na tabela. (STONE et al, 1997; ALLINGHAM et al, 1998b; ALWARD et al, 1998b; MICHELS-RAUTENSTRAUSS et al, 1998; STOILOVA et al, 1998; FINGERT et al, 1999; KUBOTA et al, 2000; LAM et al, 2000; SHIMIZU et al, 2000; VASCONCELLOS et al, 2000; VASQUEZ et al, 2000).

**Tabela IX.** Tipos de mutação identificados no gene TIGR/MYOC.

Tipo de mutação	Idade ao diagnóstico (anos)	PIO (mmHg)	População	Referência
<b>Gln19His*</b>	ND	ND	australiana, americana	ALWRAD et al (1998b)
<b>Arg46STOP*</b>	12 -46	17 - 30	coreana, chinesa, japonesa	YOON et al (1999), LAM et al (2000), FINGERT et al (1999)
Arg46Ter*	ND	ND	japonesa	KUBOTA et al (2000)
Val53Ala*	ND	ND	coreana	PANG et al (2000)
Arg76Lys*	21	32 - 44	turca	STOILOV et al (1998)
<b>Arg82Cys*</b>	ND	ND	australiana, americana	ALWARD et al (1998), FINGERT et al (1999)
Arg91STOP*	ND	ND	chinesa	LAM et al (2000)
Arg158Gln*	ND	ND	japonesa	KUBOTA et al (2000)
Gly246Arg♦	11 - 28	ND	francesa	ADAM et al (1997)
<b>Gly252Arg♦</b>	21 - 36	28 - 62	americana, escocesa	ROZSA et al (1998), BOOTH et al (2000)
Arg272Gly♦	29 - 45	60 - 65	caucasiana	SHIMIZU et al (2000)
Trp286Arg♦	ND	ND	americana	ALWARD et al (1998b)
<b>Thr293Lys♦</b>	ND	ND	americana (caucasóide e negra)	ALWARD et al (1998b), FINGERT et al (1999)
Gln323Lys♦	9 - 43	23 - 59	panamenha	ROZSA et al (1998)
Pro334Ser♦	ND	ND	coreana	KEE & AHN (1997)
Gln337Arg♣	< 35	ND	alemã	STOILOVA et al (1997)
Gln352Lys♣	> 40	ND	americana	ALLINGHAN et al (1998b), FINGERT et al (1999)
<b>Thr353Ile♣</b>	> 40	ND	coreana, japonesa	YOON et al (1999), FINGERT et al (1999)
Ile360Asn♣	ND	ND	japonesa	KUBOTA et al (2000)
Pro361Ser♣	ND	ND	americana	ALWARD et al (1998b)
Ala363Thr♣	ND	ND	japonesa	KUBOTA et al (2000)
Gly364Val♣	22 - 48	15 - 65	ameicana	STONE et al (1997), ALWARD et al (1998b)
<b>Gly367Arg♣</b>	14 - 40	< 36	irlandesa e alemã	MICHELS-RAUTENSTRAUSS et al (1998), MANSERGH et al (1998)
<b>Gln368Stop♣</b>	28 - 77	21 - 57	americana,australiana, canadense	STONE et al (1997), ALLINGHAN et al (1998b), WIGGS et al (1998b), ALWARD et al (1998b), FINGERT et al (1999), SHIMIZU et al (2000)
<b>Pro370Leu♣</b>	5 - 27	25 - 66	japonesa,francesa,alemã, americana	SUZUKI (1997)et al, ADAM et al (1997), MICHELS-RAUTENSTRAUSS et al (1998), STOILOVA et al (1998), ROZSA et al (1998), WIGGS et al (1998b)
Gly/Gln1177Val♣	8 - 54	8 - 54	italiana	ANGIUS et al (1998)
Thr377Met♣	20 - 60	20 - 50	americana	WIGGS et al (1998b), ALWARD et al (1998b), ALLINGHAN et al (1998b), SHIMIZU et al (2000)
<b>Asp380Ala♣</b>	21 - 35	30 - 47	britânica e espanhola	STOILOVA et al (1998), KENNAN et al (1998)
Asp380Gly♣	ND	ND	caucasóide	ALWARD et al (1998b)
Ser393Arg♣	ND	ND	americana (nergra)	FINGERT et al (1999)
396INS397♣	19 - 31	12 - 60	caucasóide	ALWARD et al (1998b)
Arg422His♣	ND	ND	caucasóide	ALWARD et al (1998b)
Lys423Gly♣	8 - 62	22 - 64	franco-canadense	MOURISSETE et al (1998)
<b>Val426Phe♣</b>	10 - 46	30 - 52	espanhola e americana	MANSERGH et al (1998), ROZSA et al (1998)
Cys433Arg	< 40		brasileira	VASCONCELLOS et al (2000)
Thr437His♣	8 - 41	14 - 77	americana	STONE et al (1997), WIGGS et al (1998b), ALWARD et al (1998b)
Ala445Val♣	ND	ND	australiana	ALWARD et al (1998b)
Ile465Met♣	ND	ND	japonesa	FINGERT et al (1999)
Arg470Lys♣	ND	ND	americana	ALWARD et al (1998b)
Ile477Asn♣	4 - 80	20 - 52	americana	ALWARD et al (1998b)
Ile477Ser♣	11 - 51		francesa	ADAM et al (1997)
Asn480Lys♣	10 - 65	22 - 50	francesa	ADAM et al (1997)
Pro481Thr	ND	ND	americana	FINGERT et al (1999)
Pro481Leu♣	ND	ND	americana (negra)	FINGERT et al (1999)
Glu483Stop♣	ND	ND	canadense	FINGERT et al (1999)
Ile499Phe♣	20 - 40	23 - 40	francesa	ADAM et al (1997)
Ile499Ser♣	25 - 31	16 - 17	caucasina	SHIMIZU et al (2000)
Lys500Arg♣	ND	ND	caucasiana	ALWARD et al (1998b)
Ser502Pro♣	12 - 33	ND	britânica	STOILOVA et al (1998)

Legenda: \* = exon 1, ♦ = exon 3 fora do domínio da olfactomedina, ♣ = exon 3 dentro do domínio da olfactomedina, negrito = presença da mutação em mais de uma população, ND =não disponível.

A mutação Cys433Arg foi, até o momento, descrita exclusivamente na população brasileira de pacientes com GPAA-J e foi também identificada em um (1/52 – 1,92%) paciente com GPAA-A (VASCONCELLOS et al, 1998, 2000). A mutação Cys433Arg foi observada tanto em pacientes da raça negra (3/8 - 40%) como em pacientes brancos (5/8 – 60%). A única mutação até o momento a manifestar-se em ambas as raças foi a Thr293Lys, descrita por FINGERT et al em 1999.

Avaliaram-se 44 indivíduos da família do paciente MJN, portador da mutação Cys433Arg, quanto à presença desta e idade de diagnóstico do glaucoma, a fim de se obter a penetrância desta mutação nas diferentes faixas etárias. A penetrância desta mutação foi de 0% nos indivíduos abaixo de 10 anos de idade, 40% entre 11 e 30 anos, 75% entre 30 e 40 anos e alcançou 100% entre os pacientes com mais de 40 anos. Estes dados situam a mutação Cys433Arg em um patamar intermediário de penetrância entre os diversos tipos de alteração na seqüência do gene TIGR/MYOC. A mutação Pro370Leu, por exemplo, esteve associada à penetrância de 100% entre os indivíduos com mais de 27 anos no estudo de SHIMIZU et al (2000) e a partir dos 20 anos de idade no estudo de ROSZA et al (1998). O estudo conduzido por BRÉSIN et al (1998) observou que a penetrância da mutação Asn480Lys foi de 25% aos 19 anos de idade, 50% aos 26 anos, 75% aos 32 anos e maior que 95% aos 57 anos em uma família francesa. ALLINGHAN et al (1998b) observaram que em pacientes acima de 70 anos portadores da mutação Gln368STOP, 78% (7/9) apresentavam glaucoma e 100% (9/9) cursavam com PIO elevada. MORISSETTE et al (1998) avaliaram uma família franco-canadense de 622 indivíduos, sendo que, destes, 83 apresentavam diagnóstico de GPAA associado à mutação Lys423Glu. Um dos ramos desta família apresentou penetrância de 10% entre os indivíduos menores do que 20 anos, 74% entre 20 e 40 anos e 90% nos indivíduos acima de 40 anos. Em outro ramo desta família, a

taxa de penetrância observada para esta mutação foi de 30%, 67% e 100% para as mesmas faixas etárias, respectivamente. Todos os quatro membros desta família que apresentavam a mutação Lys423Glu em homozigose se encontravam na quinta década de vida, porém nenhum desenvolveu glaucoma, fato improvável dada a alta taxa de penetrância desta mutação em heterozigose. MORISSETTE et al (1998) sugeriram que a mutação Lys423Arg pode ser a primeira a causar uma moléstia autossômica dominante específica em heterozigose.

Dois estudos, um envolvendo a população coreana e outro a população chinesa, constataram a presença da mutação Arg46STOP em homozigose. Em um destes estudos, tal alteração era compatível com o fenótipo de GPAA-J (YOON et al, 1999). LAM et al, (2000) descreveram a mesma mutação em homozigose em um paciente com 77 anos de idade que não manifestava glaucoma, sugerindo a interferência de outros fatores genéticos e ambientais. No heredograma do paciente MJN, uma criança com cinco anos de idade apresentou a mutação Cys433Arg em homozigose (proveniente de casamento consanguíneo) e não apresenta evidências de glaucoma ao exame oftalmológico. O acompanhamento desta criança portadora da mutação Cys433Arg em homozigose será fundamental para avaliar a possibilidade de doença autossômica dominante específica em heterozigose como sugerido por MORISSETTE et al (1998) para a mutação Lys423Arg no gene TIGR/MYOC.

Como mencionado anteriormente, a mutação Cys433Arg foi a mais prevalente entre as alterações na seqüência do gene TIGR/MYOC em nossa população de GPAA-J (8/10 – 80%). Estudo de haplótipos, utilizando quatro marcadores flanquendo o locus GLC1A em pacientes portadores da mutação Cys433Arg, indicou que esta era proveniente de um ancestral comum. Outros estudos também investigaram se determinadas mutações

provinham de um ancestral comum ou eram decorrentes de eventos distintos (ADAM et al, 1997; BRESIN et al, 1998; WIGGS et al, 1998b; FINGERT et al, 1999). ADAM et al (1997), avaliaram 15 marcadores em portadores da mutação Pro370Leu e indentificaram diferentes haplótipos, indicando que os indivíduos não eram originários de um fundador comum. O mesmo não aconteceu com a mutação Asn480Lys, identificada em três famílias que compartilhavam o mesmo haplótipo, sugerindo que esta mutação provinha de um ancestral comum. Posteriormente, BRESIN et al (1998) investigaram 26 marcadores que cobriam uma região de 8 cM em seis famílias e em um paciente portador da mutação Asn480Lys e determinaram que esta também era proveniente de um fundador comum. No estudo de WIGGS et al (1998b), a mutação Gln368STOP mostrou ser decorrente de eventos distintos em três famílias avaliadas. Seis marcadores flanqueando o gene TIGR/MYOC foram utilizados por FINGERT et al (1999) para avaliarem esta mesma mutação (Gln368STOP) em 27 probandos e seus familiares além de um grupo controle normal. Os autores constataram uma forte evidência de que esta mutação era decorrente de um fundador comum, uma vez que quatro marcadores estavam presentes em 100% do indivíduos estudados, um outro marcador em 89% e o outro em 67% dos pacientes, enquanto na população normal a prevalência destes marcadores era de 74, 78, 0, 63, 56 e 30%, respectivamente.

O mecanismo pelo qual as alterações no gene TIGR/MYOC e o produto deste participam no desenvolvimento do glaucoma permanece incerto. Estudo recente observou o aumento da expressão do gene TIGR/MYOC na malha trabecular de pacientes com GPAA-A e glaucoma pseudoexfoliativo comparado a olhos normais de indivíduos da mesma faixa etária (LUTJEN-DRECOLL et al, 1998). Além disto, TAMM et al (1999) observaram que estímulo mecânico (aumento da PIO), que resultava na deformação da malha trabecular,

pode aumentar a expressão do gene TIGR/MYOC. Isto significaria que quantidades aumentadas da proteína codificada pelo gene TIGR/MYOC na malha trabecular poderiam ser uma consequência e não causa do aumento da PIO. FAUTSCH et al (2000) observaram aumento da resistência do fluxo do humor aquoso no segmento anterior de olhos humanos na presença de DNA recombinante do gene TIGR/MYOC, sugerindo que interações deste com a malha trabecular poderiam aumentar a PIO. Outro estudo constatou a diminuição da secreção da proteína TIGR/MYOC em culturas de células da malha trabecular portadoras de cinco tipos de mutação no gene TIGR/MYOC comparadas com células normais da malha trabecular (JACOBSON et al, 2001). O mesmo estudo não observou a presença da proteína TIGR/MYOC no humor aquoso de pacientes portadores da mutação Gln368STOP. Baseados nestes achados, os autores sugeriram que o mecanismo do glaucoma associado a alterações no gene TIGR/MYOC poderia ser devido a níveis insuficientes de proteína secretada ou ao comprometimento da função das células da malha trabecular causada pela congestão do seu sistema secretório (complexo de Golgi, retículo endoplasmático) onde a proteína codificada pelo gene TIGR/MYOC já foi identificada (ZIEMMERMAN et al, 1999; O'BRIEN et al, 2000; UEDA et al, 2000; JACOBSON et al, 2001).

O estudo genético tem como objetivo não somente identificar novos genes associados ao glaucoma, mas principalmente, através do estudo do produto destes genes, proporcionar meios para um melhor entendimento da fisiopatologia do dano glaucomatoso. Desta forma, terapias mais seletivas e precoces poderiam ser ministradas aos indivíduos acometidos pelo glaucoma, melhorando seu controle e impedindo perdas funcionais significativas. Além disto, o rastreamento genético pode ajudar a identificar mais precocemente grupos de risco para o desenvolvimento do glaucoma e até mesmo permitir, no futuro, o emprego da terapia gênica com o intuito de evitar a manifestação das alterações

induzidas pelas diversas mutações, impedindo a evolução da doença antes do aparecimento de dano anatômico e funcional.

## ***V - CONCLUSÕES***



Este estudo permitiu concluir que:

1. A frequência de alterações na seqüência do gene TIGR/MYOC é de 39,28% (11/28) entre pacientes com GPAA-J. Considerando-se somente as alterações que resultam na troca de aminoácido, este valor foi de 35,71% (10/28).
2. Os tipos de mutação identificados nesta população são: Gln368STOP (1/28 – 3,57%), Pro370Leu (1/28 – 3,57%) e Cys433Arg (8/28 – 28,57%). Também identificou-se o polimorfismo Gly122Gly (1/28 – 3,57%).
3. Os pacientes com GPAA-J portadores da mutação Cys433Arg apresentaram níveis de PIO significativamente maiores do que o grupo de indivíduos com GPAA-J sem mutação no gene TIGR/MYOC.
4. Os pacientes portadores da mutação Cys433Arg identificados neste estudo provinham de um ancestral comum.
5. A mutação Cys433Arg apresentou segregação concomitante com o GPAA-J e mostrou penetrância de 0% entre indivíduos menores do que 10 anos de idade, de 40% na faixa etária de 10 a 30 anos, atingiu 75% entre 31 e 40 anos e foi de 100% entre os indivíduos acima dos 40 anos de idade em uma das famílias avaliadas.



## ***VI - SUMMARY***



Glaucoma is one of the major causes of irreversible blindness in the world. Recently, molecular biology allowed the identification of the gene TIGR/MYOC as one of the genes associated with primary open-angle glaucoma (POAG). Several studies in different populations determined that 3 to 5 percent of patients with POAG show mutations in the TIGR/MYOC gene. The purpose of this study is to evaluate the frequency and the type of mutations in the TIGR/MYOC gene among Brazilian patients with juvenile POAG (POAG-J). The genomic DNA of 28 consecutive patients with POAG-J was extracted from peripheral blood. Subsequently, PCR and SSCP were performed to identify possible mutations in the TIGR/MYOC gene, which were confirmed by sequence analysis. Clinical features of patients with and without mutations in the TIGR/MYOC gene were also evaluated. Among the 28 patients with POAG-J, 10 (35.71%) showed a mutation in the TIGR/MYOC gene. One patient harbored the mutation Pro370Leu (3.57%), another patient (3.57%) showed the Gln368STOP and eight patients (28.57%) presented with the Cys433Arg mutation described for the first time in the literature. A haplotype analysis revealed that all patients harboring the Cys433Arg mutation originated from a common founder. Patients who carried this mutation showed significantly higher mean IOPs than patients without a mutation ( $P = 0.0044$  – right eye and  $P = 0.0034$  – left eye). When a pedigree of a family carrying the Cys433Arg mutation was analysed, the penetrance was 0%, 40%, 75%, and 100% in individuals younger than 10 years old, between 10 and 30 years old, between 31 and 40 years old, and older than 40 years old, respectively.



## ***VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***



- ADAM, M.F.; BELMOUDEN, A.; BINISTI, P.; BRÉZIN, A.P.; VALTOT, F.;  
BÉCHETOILLE, A.; DASCOTTE, J.C.; COPIN, B.; GOMEZ, L.; CHAVENTRÉ,  
A.; BACH, J.F.; GARCHON, H.J. - Recurrent mutations in a single exon encoding  
the evolutionarily conserved olfactomedin-homology domain of TIGR in familial  
open-angle glaucoma. **Hum. Mol. Genet.**, **6**:2091-2097, 1997.
- AKARSU, A.N.; TURACLI, M.E.; AKTAN, S.G.; BARSOUM-HOMSY, M.;  
CHEVRETTE, L.S.B.S.; SARFARAZI, M. – A second locus (GLC3B) for primary  
congenital glaucoma (buphthalmos) maps to the 1p36 region. **Hum. Mol. Genet.**,  
**5**:1199-1203, 1996.
- ALLEN T. D. & ACKERMAN, W.G. - Hereditary glaucoma in a pedigree of three  
generations. **Arch. Ophthalmol.**, **27**:139-157, 1942.
- ALLIKMETS, R.; SINGH, N.; SUN, H.; SHROYER, N.F.; HUTCHINSON, A.;  
CHIDAMBARAM, A.; GERRARD, B.; BAIRD, L.; STAUFFER, D.; PEIFFER, A.;  
RATTNER, A.; SMALLWOOD, P.; LI, Y.; ANDERSON, K.L.; LEWIS, R.A.;  
NATHANS, J.; LEPPERT, M.; DEAN, M.; LUPSKI, J.R. - A photoreceptor cell-  
specific ATP-binding transporter gene (ABCR) is mutated in recessive Stargardt  
macular dystrophy. **Nat. Genet.**, **15**:236-246, 1997.
- ALLINGHAM, R.R.; WIGGS, J.L.; DAMJI, K.F.; HERNDON, L.; YOUN, J.; TALLETT,  
D.A.; JONES, K.H.; DEL BONO, E.A.; REARDON, M.; HAINES, J.L.; PERICAK-  
VANCE, M.A. - Adult-onset primary open angle glaucoma does not localize to  
chromosome 2cen-q13 in North American families. **Hum. Hered.**, **48**:251-255,  
1998a.
- ALLINGHAM, R.R.; WIGGS, J.L.; DE LA PAZ, M.; VOLLRATH, D.; TALLETT, D.A.;  
BROOMER, B.; JONES, K.H.; DEL BONO, E.A.; KERN, J.; PATTERSON, K.;

- HAINES, J.L.; PERICAK-VANCE, M.A. - Gln368stop myocilin mutation in families with late-onset primary open-angle glaucoma. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, **39**:2288-2295, 1998b.
- ALVARADO, J.; MURPHY, C.; JUSTER, R. - Trabecular meshwork cellularity in primary open-angle glaucoma and nonglaucomatous normals. **Ophthalmology**, **91**:564-579, 1984.
- ALWARD, W.L.M.; FINGERT, J.H.; COOTE, M.A.; JOHNSON, T.; LERNER, S.F.; JUNQUA, D.; DURCAN, F.J.; MCCARTNEY, P.J.; MACKAY, D.A.; SHEFFIELD, V.C.; STONE, E.M. - Clinical features associated with mutations in the chromosome 1 open-angle glaucoma gene (GLC1A). **N. Engl. J. Med.**, **338**:1022-1027, 1998b.
- ALWARD, W.L.M.; SEMINA, E.V.; KALENAK, J.W.; HÉON, E.; SHETH, B.P.; STONE, E.M.; MURRAY, J.C. - Autosomal dominant iris hypoplasia is caused by a mutation in the Rieger syndrome (RIEG/PITX2) gene. **Am.J.Ophthalmol.**, **125**(1):98-103, 1998a.
- ANDERSEN, J.S.; PARRISH, R.; GREENFIELD, D.; DELBONO, E.A.; HAINES, J.L.; WIGGS, J.L. - A second locus for the pigment dispersion syndrome and pigmentary glaucoma maps to 18q11-q21. **Am. J. Hum. Genet.**, **63**:279, 1998. (Abstract, 1611)
- ANDERSEN, J.S.; PRALEA, A.M.; DELBONO, E.A.; HAINES, J.L.; GORIN, M.B.; SCHUMAN, J.S.; MATTOX, C.G.; WIGGS, J.L. - A gene responsible for the pigment dispersion syndrome maps to chromosome 7q35-q36. **Arch.Ophthalmol.**, **115**:384-388, 1997.
- ANGIUS, A.; DE GIOIA, E.; LOI, A.; FOSSARELLO, M.; SOLE, G.; ORZALESI, N.; GRIGNOLO, F.; CAO, A.; PIRASTU, M. - A novel mutation in the GLC1A gene

- causes juvenile open-angle glaucoma in 4 families from the Italian region of Puglia. **Arch. Ophthalmol.**, **116**:793-797, 1998.
- ARMALY, M. F. – Genetic factors related to glaucoma. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, **151**:861-875, 1968.
- ARMALY, M.F. – Inheritance of dexamethasone hypertension and glaucoma. **Arch. Ophthalmol.**, **77**: 747-751, 1967a.
- ARMALY, M. F. - Statistical attributes of the steroid hypertensive response in the clinically normal eye. **Invest. Ophthalmol.**, **4**:187-197, 1965.
- ARMALY, M. F. – The genetic determination of ocular pressure in the normal eye. **Arch. Ophthalmol.**, **78**:187-192, 1967b.
- ARMALY, M.F.; KRUEGER, D.E.; MAUNDER, L.; BECKER, B.; HETHERINGTON, J.; KOLKER, A.E.; LEVENE, R.Z.; MAUMENEE, A.E.; POLLACK, I.P.; SHAFFER, R.N. - Biostatistical analysis of the collaborative glaucoma study. **Arch. Ophthalmol.**, **98**:2163-2171, 1980.
- AVRAMOPOULOS, D.; KITSOS, G.; ECONOMOU-PETERSEN, E.; GRIGORIADOU, M.; VASSILOPOULOS, D.; PAPAGEORGIOU, C.; PSILAS, K.; PETERSON, M.B. - Exclusion of one pedigree affected by adult onset primary open angle glaucoma from linkage to the juvenile glaucoma locus on chromosome 1q21-q31. **J. Med. Genet.**, **33**:1043-1044, 1996.
- AXENFELD, Apud, SHIELDS, M.B. Axenfeld-Rieger Syndrome. In: RITCH, R.; SHIELDS, M.B.; KRUPIN, T. **The Glaucomas**. 2 ed. Saint Louis. Mosby-Year Book, 1996. v.2 p.875-885.

- BAL, R.S. & ANHOLT, R.R. – Formation of the extracellular mucous matrix of olfactory neuroepithelium: identification of partially glycosylated and non glycosylated precursors of olfactomedin. **Biochemistry**,**32**:1047-1053,1993.
- BARRETT, D.J.; SPARKES, R.S.; GORIN, M.B.; BHAT, S.P.; SPENCE, M.A.; MARAZITA, M.L.; BATEMAN, J.B. – Genetic linkage analysis of autosomal dominant congenital cataracts with lens specific DNA probes and polymorphic phenotypic markers. **Ophthalmology**, **95**:538-544, 1988.
- BECKER, B. - Intraocular pressure response to topical corticosteroids. **Invest. Ophthalmol.**, **4**:198-205, 1965.
- BECKER, B.; KOLKER, A.E.; ROTH, F.D. - Glaucoma family study. **Am.J.Ophthalmol.**, **50**:557-567, 1960.
- BEEBE, D.C. Homeobox genes and vertebrate eye development. **Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.**, **35**:2897-2900, 1994.
- BEJANI B.A.; LEWIS, R.A.; TOMEY, K.F.; ANDERSON, K.L.; DUEKER, d.k.; JABAK, M.; ASTLE, W.F.; OTTERUD, B.; LEPPERT, M.; LUPSKI, J.R. Mutations in CYP1B1, the gene for cytochrome P4501B1, are the predominant cause of primary congenital glaucoma in Saudi Arabia. **Am.J.Hum.Genet.**, **62**:325-333, 1998.
- BELL, A. Apud BRIGGS, A.H. - Familial primary glaucoma in adults. **Br. J. Ophthalmol.**, **23**:649-659, 1939.
- BELMOUDEN, A.; ADAM, M.F.; DINECHIN, S.D.; BRÉZIN, A.P.; RIGAULT, P.; CHUMAKOV, I.; BACH, J.F.; GARCHON, H.J. - Recombinational, and physical mapping of the locus for primary open-angle glaucoma (GLC1A) on chromosome 1q23-q25. **Genomics**, **39**:348-358, 1997.

- BENEDICT, Apud, COURTNEY, R.H. & HILL, E. - Hereditary juvenile glaucoma simplex. **J. Am. Med. Assoc.**, **97**:1602-1609, 1931.
- BENGTSSON, B. - The prevalence of glaucoma. **Br. J. Ophthalmol.**, **65**:46-49, 1981.
- BENNETT, S.R.; ALWARD, W.L.M.; FOLBERG, R. - An autosomal dominant form of low-tension glaucoma. **Am. J. Ophthalmol.**, **108**:238-244, 1989.
- BERG, F. - Erbliches jungendliches glaukom. **Acta. Ophthalmol.**, **10**:568-587, 1932.
- BESSANT, D.A.R.; PAYNE, ANNETTE, M.P.; MITTON, K.P.; QING-LIANG, W.; SWAIN, P.K.; PLANT, C.; BIRD, A.C.; ZACK, D.J. - A mutation in NRL is associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa. **Nat. Genetics**, **21**:355-356, 1999.
- BIRÓ, I. - Notes on the heredity of glaucoma. **Ophthalmologica**, **98**:43-50, 1939.
- BIRÓ, I. - Notes upon the question of hereditary glaucoma. **Ophthalmologica**, **122**:228-238, 1951.
- BOOTH, A.; CHURCHILL, A.; ANWAR, R.; MENAGE, M.; MARKHAM, A. - The genetics of primary open angle glaucoma. **Br. J. Ophthalmol.**, **81**:409-414, 1997.
- BRÉZIN, A.P.; ADAM, M.F.; BELMOUDEN, A.; LUREAU, M.A.; CHAVENTRÉ, A.; COPIN, B.; GOMEZ, L.; DINECHIN, S.D.; BERKANI, M.; VALTOT, F.; ROULAND, J.F.; DASCOTTE, J.C.; BACH, J.F.; GARCHON, H.J. - Founder effect in GLC1A-linked familial open-angle glaucoma in northern France. **Am. J. Med. Genet.**, **76**:438-445, 1998.
- BRÉZIN, A.P.; BÉCHETOILLE, A.; HAMARD, P.; VALTOT, F.; BERKANI, M.; BELMOUDE, A.; ADAM, M.F.; DINECHIN, S.D.; BACH, J.F.; GARCHON, H.J. - Genetic heterogeneity of primary open angle glaucoma and ocular hypertension:

- linkage to GLC1A associated with an increased risk of severe glaucomatous optic neuropathy. **J. Med. Genet.**, **34**:546-552, 1997.
- BRIARD, M.L.; FEINGOLD, J.; KAPLAN, J.; BONAITI, C.; ARON, J.J.; BLANCK, M.F.; DELTHIL, S.; FRESAL J. – The genetics of congenital glaucomas: a study of 231 cases. **J. Genet. Hum.**, **24**:107-123, 1976.
- CABALLERO, M.; ROWLETTE, L.L.S.; BORRÁS, T. – Altered secretion of a TIGR/MYOC mutant lacking the olfactomedin domain. **Biochem. Biophys. Acta.**, **1502**:447-460, 2000.
- CAMPBELL, D.G. - Pigmentary dispersion and glaucoma. **Arch. Ophthalmol.**, **97**:1667-1672, 1979.
- CASLHOUN, F.P. - The report, with operative notes, of three generations of one family. **J. Am. Med. Assoc.**, **63**:209-215, 1914.
- CHARLIAT, G.; JOLLY, D.; BLANCHARD, F. - Genetic risk factor in primary open-angle glaucoma: a case-control study. **Ophthalmic Epidemiol.**, **1**:131-138, 1994.
- CLARK, A.F. – Steroids, ocular hypertension and glaucoma. **J. Glaucoma.**, **4**:354-369, 1995.
- COFFEY, M.; REIDY, A.; WORMALD, R.; XIAN, W.X.; WRIGHT, L.; COURTNEY, P. - Prevalence of glaucoma in the west of Ireland. **Br. J. Ophthalmol.**, **77**:17-21, 1993.
- CONLEY, Y.P.; ERTTURK, D.; KEVERLINE, A.; MAH, T.S.; KERAVALA, A.; BARNES, L.R.; BRUCHIS, A.; HESS, J.F.; FITZGERALD, P.G.; WEEKS, D.E.; FERRELL, R.E.; GORIN, M.B. - A juvenile-onset, progressive cataract locus on chromosome 3q21-22 is associated with a missense mutation in the beaded filament structural protein-2. **Am.J.Hum.Genet.**, **66**:1426-1431, 2000.

- COSTA, V.P. Defeitos de campo visual no paciente glaucomatoso. In: \_\_\_\_\_ - **Perimetria computadorizada**. Rio de Janeiro. RioMed, 1995. p.73-89.
- CÔTÉ, G.; AUDET, J.; DUGRÉ, J.; PERRON, J. - Une étude sur le glaucome familial. **Canad. J. Ophthalmol.**, **3**:331-336, 1968.
- COURTNEY, R.H. & HILL, E. - Hereditary juvenile glaucoma simplex. **J. Am. Med. Assoc.**, **97**:1602-1609, 1931.
- CROMBIE, A.L. & CULLEN, J.F. - Hereditary glaucoma : occurrence in five generations of an Edinburgh family. **Br. J. Ophthalmol.**, **48**:143-147, 1964.
- DAMJI, K.F. & ALLINGHAM, R.R. - Molecular genetics is revolutionizing our understanding of ophthalmic disease. **Am. J. Ophthalmology.**, **124**:530-543, 1997.
- DAMJI, K.F.; STEFANSSON, D.E.; LOFTSDOTTIR, M.; SVERRISSON, T.; THORGEIRSSON, E.; JONASSON, F.; GOTTFREDSOTTIR, M.; BAINS, H.S.; ALLINGHAM, R.R. - Maternal inheritance in pseudoexfoliation syndrome: a new observation. **Am. J. Hum. Genet.**, **63**:324, 1998. (Abstract, 1871).
- DANCIGER, M.; BLANEY, J.; GAO, Y.Q.; ZHAO, D.Y.; HECKENLIVELY, J.R.; JACOBSON, S.G.; FARBER, D.B. - Mutations in the PDE6B gene in autosomal recessive retinitis pigmentosa. **Genomics**, **30**:1-7, 1995.
- DATSON, N.A.; SEMINA, E.; VAN STAALDUINEN, A.A.A.; DAUWERSE, H.G.; MEERSHOEK, E.J.; HEUS, J.J.; FRANTS, R.R.; DEN DUNNEN, J.T.; MURRAY, J.C.; VAN OMMEN, G.J.B. - Closing in on Rieger syndrome gene on 4q25:mapping translocation breakpoints within a 50-kb region. **Am.J.Hum.Genet.**, **59**:1297-1305, 1996.
- DAVID, R.; LIVINGSTON, D.G.; LUNTZ, M.H. - Ocular hypertension - a long-term follow-up of treated and untreated patients. **Br. J. Ophthalmol.**, **61**:668-674, 1977.

- DELUISE, V.P. & ANDERSON, D. R. - Primary infantile glaucoma (congenital glaucoma). **Surv. Ophthalmol.**, **28**:1-19, 1983.
- DIAS, J.F.P. Anomalias do desenvolvimento e glaucoma. In: DIAS, J.F.P. – **Glaucoma**. Rio de Janeiro. Cultura Médica, 1998. p.179-200.
- DIELEMANS, I.; VINGERLING, J.R.; WOLFS, R.C.W.; HOFMAN, A.; GROBBEE, D.E.; DE JONG, P.T.V.M. - The prevalence of primary open-angle glaucoma in a population-based study in the Netherlands : the Rotterdam Study. **Ophthalmology**, **101**:1851-1855, 1994.
- ELÇIOGLU, N.; ELÇIOGLU, M; FUHRMANN, W. - The frequency of genetic eye diseases in a genetic counseling center. **Genet. Counsel.**, **6**:329-342, 1995.
- ESKDALE, J. & GALLAGHER, G. – A polymorphic dinucleotide repeat in the human IL-10 promoter. **Immunogenetics**, **42**:444-445, 1995.
- FAUTSCH, M.P.; BAHLER, C.K.; JEWISON, D.J.; JOHNSON, D.H. - Recombinant TIGR/MYOC increases outflow resistance in the human anterior segment. **Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.**, **41**:4163-4168, 2000.
- FELLMAN, R.L. Gonioscopy. In: CHOPLIN, N.T. & LUNDY, D.C. – **Atlas of Glaucoma**. London. Martin Dunitz, 1998. p.39-55.
- FINGERT, J.H.; HÉON, E.; LIEBMANN, J.M.; YAMAMOTO, T.; CRAIG, J.E.; RAIT, J.; KAWASE, K.; HOH, S.T.; BUYS, Y.M.; DICKISON, J.; HOCKEY, R.R.; WILLIAMS-LYN, D.; TROPE, G.; KITAZAWA, Y.; RITCH, R.; MACKEY, D.A.; ALWARD, W.L.M.; SHEFFIELD, V.C.; STONE, E.M. - Analysis of myocin mutations in 1703 glaucoma patients from five different populations. **Hum. Mol. Genet.**, **8**:899-905, 1999.

- FRANÇOIS, J. - Congenital glaucoma and its inheritance. **Ophthalmologica**, **181**:61-73, 1980.
- FRIEDMAN, J.S.; WALTER, M.A. – Glaucoma genetics, present and future. **Clin. Genet.**, **55**:71-79, 1999.
- FRIEND, S.H.; HOROWITZ, J.M.; GERBER, M.R.; WANG, X.F.; BOGENMAN, E.; LI, F.P.; WEINBERG, R.A. – Deletions of DNA sequence in retinoblastomas and mesenchymal tumors: organization of the sequence and its encoded protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **84**: 9059-9063, 1987.
- GARBE, E.; LELORIER, J.; BOIVIN, J.F.; SUISSA, S. - Risk of ocular hypertension or open-angle glaucoma in elderly patients on oral glucocorticoids. **Lancet**, **350**:979-982, 1997.
- GENCIK, A. – Epidemiology and genetics of primary congenital glaucoma in Slovakia. Description of a form of primary congenital gypsies with autosomal-recessive inheritance and complete penetrance. **Dev. Ophthalmol.**, **16**:76-115, 1989.
- GENCIK, A.; GENCIKOVA, A.; FERAK, V. - Population genetical aspects of primary congenital glaucoma. **Hum. Genet.**, **61**:193-197, 1982.
- GOLDWYN, R.; WALTMAN, S.R.; BECKER, B. - Primary open-angle glaucoma in adolescents and young adults. **Arch. Ophthalmol.**, **84**:579-582, 1970.
- GRAFF, C.; JERNDAL, T.; WADELIUS, C. Fine mapping of the gene for autosomal dominant juvenile-onset glaucoma with iridogoniodysgenesis in 6p25-tel. **Hum.Genet.**, **101**:130-134, 1997.
- GRAFF, C.; URBAN, S.F.; JERNDAL, T.; WADELIUS, C. - Confirmation of linkage to 1q21-31 in a Danish autosomal dominant juvenile-onset glaucoma family and evidence of genetic heterogeneity. **Hum. Genet.**, **96**:285-289, 1995.

- GREEN, J. S.; BEAR, J.C.; JOHNSON, G.J. - The burden of genetically determined eye disease. **Br. J. Ophthalmol.**, **70**:696-699, 1986.
- GULLO, M.R.; COSTA, V.P.; BERNARDI, L.; KARA-JOSE, N. – Condições visuais de pacientes glaucomatosos em um hospital universitário. **Arq. Bras. Oftalmol.**,**59**:147-150, 1996.
- HAAG. Apud, COURTNEY, R.H. & HILL, E. - Hereditary juvenile glaucoma simplex. **J. Am. Med. Assoc.**, **97**:1602-1609, 1931.
- HARLAN, H. - A case of hereditary glaucoma. **J. Am. Med. Assoc.**, **5**:285-286, 1885.
- HATTENHAUER, M.G.; JOHNSON, D.H.; ING, H.H.; HERMAN, D.C.; HODGE, D.O.; YAWN, B. P.; BUTTERFIELD, L.CL.; GRAY, D.T. - The probability of blindness from open-angle glaucoma. **Ophthalmology**, **105**:2099-2104, 1998.
- HEON, E.; MATHERS, W.D.; ALWARD, W.L.; WEISENTHAL, R.W.; SUNDEN, S.L.; FISHBAUGH. J.A.; TAYLOR, C.M.; KRACHMER, J.H.; SHEFFIELD, V.C.; STONE, E.M. - Linkage of posterior polymorphous corneal dystrophy to 20q11. **Hum. Mol. Genet.**, **4**:485-488, 1995a.
- HEON, E.; SHETH, B.P.; KALENAK, J.W.; SUNDEN, S.L.; STREB, L.M.; TAYLOR, C.M.; ALWARD, W.L.; SHEFFIELD, V.C.; STONE, E.M. - Linkage of autosomal dominant iris hipoplasia to the region of the Rieger syndrome locus (4q25). **Hum. Mol. Genet.**, **4**:1435-1439, 1995b.
- HOLLOWS, F.C.; GRAHAM, P.A. – Intra-ocular pressure, glaucoma, and glaucoma suspects in a defined population. **Br. J. Ophthalmol.**,**50**:570-586,1966.
- HOVDING, G. & AESVED, H. - Prognostic factors in the development of manifest open angle glaucoma: A long-term follow-up study of hypertensive and normotensive eyes. **Acta Ophthalmol.**, **64**:601-608, 1986.

- HOWELL, N., MCCULLOUGH, D. – An example of Leber hereditary optic neuropathy not involving a mutation in the mitochondrial ND4 gene. **Am. J. Hum. Genet.**, **1990**:629-634, 1990.
- HUANG, S.H.; PITLLER, S.J.; HUANG, X.; OLIVEIRA, L.; BERSON, E.L.; DRYJA, T.P. – Autosomal recessive retinitis pigmentosa caused by mutations in the alpha subunit of rod cGMP phosphodiesterase. **Nat. Genet.**, **11**:468-471, 1995.
- INGLEHEARN, C.F.; LESTER, D.H.; BASHIR, R.; ATIF, U.; KEEN, T.J.; SERTEDAKI, A.; LINDSEY, J.; JAY, M.; BIRD, A.C.; FARRAR, G.J. - Recombination between rhodopsin and locus D3S47 (C17) in rhodopsin retinitis pigmentosa families. **Am. J. Hum. Genet.**, **50**:590-597, 1992.
- IRVINE, A.D.; CORDEN, L.D.; SWENSSON, O.; SWENSSON, B.; MOORE, J.E.; FRAZER, D.G.; SMITH, F.J.; KNOWLTON, R.G.; CHRISTOPHERS, E.; ROCHELS, R.; UITTO, J.; MCLEAN, W.H. - Mutations in cornea-specific keratin K3 or K12 genes cause Meesmann's corneal dystrophy. **Nat. Genet.**, **16**:184-187, 1997.
- JACOBSON, N.; ANDREWS, M.; SHEPARD, A.R.; NISHIMURA, D.; SEARBY, C.; FINGERT, J.H.; HAGEMAN, G.; MULLINS, R.; DAVIDSON, B.L.; KWON, Y.H.; ALWARD, W.L.; STONE, E.M.; CLARK, A.F.; SHEFFIELD, V.C. - Non-secretion of mutant proteins of the glaucoma gene myocilin in cultured trabecular meshwork cells and in aqueous humor. **Hum. Mol. Genet.**, **10**:117-125, 2001.
- JAVITT, J.C. – Preventing blindness in Americans: the need for eye health education. **Surv. Ophthalmol.**, **40**:41-44, 1995.
- JAY, B. & PATERSON, G. - The genetics of simple glaucoma. **Tr. Ophthalmol. Soc. UK**, **90**:161-171, 1970.

- JOHNSON, A.T.; DRACK, A.V.; KWITEK, A.E.; CANNON, R.L.; STONE, E. M.; ALWARD, W.L.M. - Clinical features and linkage analysis of a family with autosomal dominant juvenile glaucoma. **Ophthalmology**, **100**:524-529, 1993.
- JOHNSON, A.T.; RICHARDS, J.E.; BOEHNKE, M.; STRINGHAM, H.M.; HERMAN, S.B.; WONG, D.J.; LICHTER, P.R. - Clinical phenotype of juvenile-onset primary open-angle glaucoma linked to chromosome 1q. **Ophthalmology**, **103**:808-814, 1996.
- JONAS, J.B. & BUDDE, W.M. - Optic nerve head appearance in juvenile-onset chronic high-pressure glaucoma and normal-pressure glaucoma. **Ophthalmology**, **107**:704-711, 2000.
- KAIMBO, D.K.; BUNTINX F.; MISSOTTEN, L. - Risk factors for open-angle glaucoma: a case-control study. **J. Clin. Epidemiol.**, **54**:166-171, 2001.
- KAJIWARA, K.; BERSON, E.L.; DRYJA, T.P. – Digenic retinitis pigmentosa due to mutations at the unlinked peripherin/RDS and Rom1 loci. **Science**,**10**:1604-1608,1994.
- KALENAK, J.W. & PAYDAR, F. - Correlation of intraocular pressures in pairs of monozygotic and dizygotic twins. **Ophthalmology**, **102**:1559-1664, 1995.
- KAMPIK, A.; GREEN, W.R.; QUIGLEY, H.A.; PIERCE, H. – Scanning and transmission electron microscopic studies of two cases of pigment dispersion syndrome. **Am. J. Ophthalmol.**, **91**:573-587, 1981.
- KARALI, A.; RUSSELL, P.; STEFANI, F.H.; TAMM, E.R. - Localization of myocilin/trabecular meshwork-inducible glucocorticoid response protein in the human eye. **Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.**, **41**:729-740, 2000.
- KARAVANICH, C. & ANHOLT, R.R. - Evolution of olfactomedin: structural constraints and conservation of primary sequence motifs. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, **855**:294-300, 1998a.

- KARAVANICH, C. A. & ANHOLT, R.R. - Molecular evolution of olfactomedin. **Mol. Biol. Evol.**, **15**:718-726, 1998b.
- KASS, M.A.; HART, W.M.; GORDON, M.; MILLER, P. - Risk factors favoring the development of glaucomatous visual field loss in ocular hypertension. **Surv. Ophthalmol.**, **25**:155-162, 1980.
- KAUFMANN, E.; KNOCHEL, W. – Five years on the wings of fork head. **Mech. Dev.**, **57**:3-20, 1996.
- KEE, C.; AHN, B.H. – TIGR gene in primary open-angle glaucoma and steroid induced glaucoma. **Korean J. Ophthalmol.**, **57**:3-20, 1996. (Abstract).
- KELLERMAN, L. & POSNER, A. - The value of heredity in the detection and study of glaucoma. **Am. J. Ophthalmol.**, **40**:681-685, 1955.
- KENNAN, A.M.; MANSERGH, F.C.; FINGERT, J.H.; CLARK, T.; AYUSO, C.; KENNA, P.F.; HUMPHRIES, P.; FARRAR, G.J. - A novel Asp380Ala mutation in the GLC1A/myocilin gene in a family with juvenile onset primary open angle glaucoma. **J. Med. Genet.**, **35**:957-960, 1998.
- KIMURA, R. & HONDA, M. - Effect of orally administered hydrocortisone on the rate of aqueous flow in man. **Acta Ophthalmol.**, **60**:584-589, 1982.
- KIRSTEIN, L.; CVEKL, A.; CHAUHAN, B.K.; TAMM, E.R. - Regulation of human myocilin/TIGR gene transcription in trabecular meshwork cells and astrocytes: role of upstream stimulatory factor. **Genes Cells**, **5**:661-676, 2000.
- KITAZAWA, Y. & HORIE, T. - The prognosis of corticosteroid-responsive individuals. **Arch. Ophthalmol.**, **99**:819-823, 1981.

- KLEIN, B.E.K.; KLEIN, R.; SPONSEL, W.E.; FRANKE, T.; CANTOR, L.B.; MARTONE, J.; MENAGE, M.J. - Prevalence of glaucoma : the Beaver Dam eye study. **Ophthalmology**, **99**:1499-1504, 1992.
- KUBOTA, R.; KUDOH, J.; MASHIMA, Y.; ASAKAWA, S.; MINOSHIMA, S.; HEJMANCIK, J.F.; OGUCHI, Y.; SHIMIZU, N. - Genomic organization of the human myocilin gene (MYOC) responsible for primary open angle glaucoma (GLC1A). **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, **242**:396-400, 1998.
- KUBOTA, R.; MASHIMA, Y.; OHTAKE, Y.; TANINO, T.; KIMURA, T.; HOTTA, Y.; KANAI, A.; TOKUOKA, S.; AZUMA, I.; TANIHARA, H.; INATANI, M.; INOUE, Y.; KUDOH, J.; OGUCHI, Y.; SHIMIZU, N. - Novel mutations in the myocilin in Japanese glaucoma patients. **Hum. Mutat.**, **16**:270, 2000.
- KUBOTA, R.; NODA, S.; WANG, Y.; MINOSHIMA, S.; ASAKAWA, S.; KUDOH, J.; MASHIMA, Y.; OGUCHI, Y.; SHIMIZU, N. - A novel myosin-like protein (myocilin) expressed in the connecting cilium of the photoreceptor: molecular cloning, tissue expression, and chromosomal mapping. **Genomics**, **41**:360-369, 1997.
- KULAK, S.C.; KOZLOWSKI, K.; SEMINA, E.V.; PEARCE, W.G.; WALTER, M.A. - Mutation in the RIEG1 gene in patients with iridogoniodysgenesis syndrome. **Hum.Mol.Genet.**, **7**:1113-1117, 1998.
- KULKARNI, N.H.; KARAVANICH, C.A.; ATCHLEY, W.R.; ANHOLT, R.R. - Characterization and differential expression of a human gene family of olfactomedin-related proteins. **Genet. Res.**, **76**:41-50, 2000.
- LAM, D.S.C.; LEUNG, Y.F.; CHUA, J.K.H.; BAUM, L.; FAN, D.S.P.; CHOY, K.W.; PANG, C.P. - Truncations in the TIGR gene in individuals with and without primary open-angle glaucoma. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, **41**:1386-1391, 2000.

- LEIGHTON, D.A. - Survey of the first-degree relatives of glaucoma patients. **Trans. Ophthalmol. Soc. UK**, **96**:28-32, 1976.
- LESKE, M.C. - The epidemiology of open-angle glaucoma: a review. **Am. J. Epidemiol.**, **118**:166-191, 1983.
- LESKE, M.C.; CONNELL, A.M.S.; SCHACHAT, A.P.; HYMAN, L. The Barbados eye study. **Arch.Ophthalmol.**, **112**:821-829, 1994.
- LESKE, M.C.; CONNELL, A.M.S.; WU, S.Y.; HYMAN, L.G.; SCHACHAT, A.P.; - Risk factors for open-angle glaucoma: the Barbados eye study. **Arch. Ophthalmol.**, **113**:918-924, 1995.
- LESKE, M.C.; NEMESURE, B.; HE, QIMEI.; WU, S.Y.; HEJTMANCIK, J.F.; HENNIS, A. - Patterns of open-angle glaucoma in the Barbados family study. **Ophthalmology**, **108**:1015-1022, 2001.
- LESKE, M.C.; WARHEIT-ROBERTS, L.; WU, S.Y. - Open-angle glaucoma and ocular hypertension: the Long Island glaucoma case-control study. **Ophthalm. Epidemiol.**, **3**:85-96, 1996.
- LEWIS, J.M.; PRIDY, T.; JUDD, J.; GORDON, M.O.; KASS, M.A.; KOLKER, A.E.; BECKER, B. - Intraocular pressure response to topical dexamethasone as a predictor for the development of primary open-angle glaucoma. **Am. J. Ophthalmol.**, **106**:607-612, 1988.
- LEYDHECKER, W. - Simple glaucoma before the age of 30 years. **Ophthalmologica**, **178**:32-36, 1979.
- LICHTER, P.R.; RICHARDS, J.E.; BOEHNKE, M.; OTHMMAN, M.; CAMERON, B.D.; STRINGHAM, H.M.; DOWNS, C.A.; LEWIS, S.B.; BOYD, B.F. - Juvenile

- glaucoma linked to the GLCA gene on chromosome 1q in a Panamanian family. **Am. J. Ophthalmol.**, **123**:413-416, 1997.
- LITT, M.; CARRERO-VALENZUELA, R.; LAMORTICELLA, D.M.; SCHULTZ, D.W.; MITCHELL, T.N.; KRAMER, P.; MAUMENEE, I.H. - Autosomal dominant cerulean cataract is associated with a chain termination mutation in the human beta-crystallin gene CRYBB2. **Hum. Mol. Genet.**, **6**:665-668, 1997.
- LITT, M.; KRAMER, P.; LAMORTICELLA, D.M.; MURPHEY, W.; LOVRIEN, E.W.; WELEBER, R.G. - Autosomal dominant congenital cataract associated with a missense mutation in the human alpha crystallin gene CRYAA. **Hum. Mol. Genet.**, **7**:471-474, 1998.
- LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S.L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J.E. Protein structure and function. In: \_\_\_\_\_-**Molecular Cell Biology**. 4 ed. New York W. H. Freeman and Company, 2000. p.51-67.
- LOHLEIN, H. – Das glaukon der jugendlichen. **Arch. F. Ophth.**, **85**:393-488,1913.
- LOTUFO, D.; RITCH, R.; SZMYD, L.; BURRIS, J.E. - Juvenile glaucoma, race, and refraction. **J. Am. Med. Assoc.**, **261**:249-252, 1989.
- LÜTJEN-DRECOLL, E.; MAY, C.A.; POLANSKY, J.R.; JOHNSON, D.H.; BLOEMENDAL, H.; NGUYEN, T.D. - Localization of the stress proteins  $\alpha$ B-crystallin and trabecular meshwork inducible glucocorticoid response protein in normal and glaucomatous trabecular meshwork. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, **39**:517-525, 1998.

- MACKAY, D.; IONIDES, A.; KIBAR, Z.; ROULEAU, G.; BERRY, V.; MOORE, A.; SHIELS, A.; BHATTACHARYA, S. - Connexin46 mutations in autosomal dominant congenital cataract. **Am.J.Hum.Genetic.**, **64**:1357-1364, 1999.
- MANSENGH. F.C.; KENNA, P.F.; AYUSO, C.; KIANG, A.S.; HUMPHRIES, P.; FARRAR, G.J. - Novel mutations in the TIGR gene in early and late onset open angle glaucoma. **Hum. Mut.**, **11**:244-251, 1998.
- MASON, R.P.; KOSOKO, O.; WILSON, M.R.; MARTONE, J.F.; COWAN, C.L.; GEAR, J.; ROSS-DEGNAN, D. - National survey of the prevalence and risk factors of glaucoma in St. Lucia, West Indies. **Ophthalmology**, **96**:1363-1368, 1989.
- MCKUSICK, V.A. - Presidential address, eighth international congress of human genetics: human genetics: the last 35 years, the present, and the future. **Am. J. Hum. Genet.**, **50**:663-670, 1992.
- MCMENAMIN, P.G.; LEE, W.R.; AITKEN, D.A.N. - Age-related changes in human outflow apparatus. **Ophthalmology**, **93**:194-209, 1986.
- MEARS, A.J.; JORDAN, T.; MIRZAYANS, F.; DUBOIS, S.; KUME, T.; PARLEE, M.; RITCH, R.; KOOP, B.; KUO, W-L.; COLLINS, C.; MARSHALL, J.; GOULD, D.B.; PEARCE, W.; CARLSSON, P.; ENERBÄCK, S.; MORISSETTE, J.; BHATTACHARYA, S.; HOGAN, B.; RAYMOND, V.; WALTER, M.A. - Mutations of the forkhead/winged-helix gene, FKHL7, in patients with Axenfeld-Rieger anomaly. **Am.J.Hum.Genet.**, **63**:1316-1328, 1998.
- MEARS, A.J.; MIRZAYANS, F.; GOULD, D.B.; PEARCE, W.G.; WALTER, M.A. - Autosomal dominant iridogoniodysgenesis anomaly maps to 6p25. **Am.J.Hum.Genet.**, **59**:1321-1327, 1996.

- MEINDL, A.; DRY, K.; HERRMANN, K.; MANSON, F.; CICCODICOLA, A.; EDGAR, A.; CARVALHO, M.R.; ACHATZ, H.; HELLEBRAND, H.; LENNON, A.; MIGLIACCIO, C.; PORTER, K.; ZRENNER, E.; BIRD, A.; JAY, M.; LORENZ, B.; D'URSO, M.; MEITINGER, T.; WRIGHT, A. - A gene (RPGR) with homology to the RCC1 guanine nucleotide exchange factor is mutated in X-linked retinitis pigmentosa (RP3). **Nat. Genet.**, **13**:35-42, 1996.
- MERIN, S.; MORIN, D. - Heredity of congenital glaucoma. **Br.J.Ophthalmol.**, **56**:414-417, 1972.
- MERTTS, M.; GARFIELD, S.; TANEMOTO, K.; TOMAREV, S.I. - Identification of the region in the N-terminal domain responsible for the cytoplasmic localization of myoc/tigr and its association with microtubules. **Lab. Invest.**, **79**:1237-1245, 1999.
- MEYER, A.; BÉCHETOILLE, A.; VALTOT, F.; DINECHIN, S.D.; ADAM, M.F.; BELMOUDEN, A.; BRÉZIN, A.P.; GOMEZ, L.; BACH, J.F.; GARCHON, H.J. - Age-dependent penetrance and mapping of the locus for juvenile and early-onset open-angle glaucoma on chromosome 1q (GLC1A) in a French family. **Hum. Genet.**, **98**:567-571, 1996.
- MICHELS-RAUTENSTRAUSS, K.G.; MARDIN, C.Y.; BUDDE, W.M.; LIEHR, T.; POLANSKY, J.; NGUYEN, T.; TIMMERMAN, V.; BROECKHOVEN, C.V.; NAUMANN, G.O.H.; PFEIFFER, R.A.; RAUTENSTRAUSS, B.W. - Juvenile open angle glaucoma: fine mapping of the TIGR gene to 1q24.3-q25.2 and mutation analysis. **Hum. Genet.**, **102**:103-106, 1998.
- MILLER, S.J.H. – Genetic of closed-angle glaucoma. **J. Med. Genet.**, **7**:250-252, 1970.
- MILLER, S.J.H. - Genetics of glaucoma and family studies. **Tr. Ophthalm. Soc. UK**, **98**:290-292, 1978.

- MINTZ-HITTNER, H.A. - Aniridia. In: RITCH, R.; SHIELDS, M.B.; KRUPIN, T. **The Glaucomas**. 2 ed. Saint Louis. Mosby-Year Book, 1996. v.2 p.859-874.
- MITCHELL, P.; CUMMING, R.G.; MACKEY, D.A. - Inhaled corticosteroids, family history, and risk of glaucoma. **Ophthalmology**, **106**:2301-2306, 1999.
- MITCHELL, P.; HOURIHAN, F.; SANDBACH, J.; WANH, J.J. – The relationship between glaucoma and myopia. **Ophthalmology**, **106**:2010-2015, 1999.
- MITCHELL, P.; SMITH, W.; ATTEBO, K.; HEALEY, P.R. – Prevalence of open-angle glaucoma in Australia. **Ophthalmology**, **103**:1661-1669., 1996.
- MOHABEER, A.J.; HITI, A.L.; MARTIN, W.J. - Non-radioactive single strand conformation polymorphism (SSCP) using the Pharmacia “PhastSystem”. **Nucleic Acids Res.**, **19**:3154, 1991.
- MORISSETE, J.; CLÉPET, C.; MOISAN, S.; DUBOIS, S.; WINSTALL, E.; VERMEEREM, D.; NGUYEN, T.D.; POLANSKY, J.R.; CÔTÉ, G.; ANCTIL, J.L.; AMYOT, M.; PLANTE, M.; FALARDEAU, P., RAYMOND, V. - Homozygotes carrying an autosomal dominant TIGR mutation do not manifest glaucoma. **Nat. Genet.**, **19**:319-321, 1998.
- MORISSETE, J.; CÔTÉ, G.; ANCTIL, J.L.; PLANTE, M.; AMYOT, M.; HÉON, E.; TROPE, G.E.; WEISSENBACH, J.; RAYMOND, V. - A common gene for juvenile and adult-onset primary open-angle glaucoma confined on chromosome 1q. **Am. J. Genet.**, **56**:1431-1442, 1995.
- MORUMURA, H.; FISHMAN, G.A.; GROVER, S.A.; FULTON, A.B.; BERSON, E.L.; DRYJA, T.P. - Mutations in the RPE65 gene in patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa or Leber congenital amaurosis. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA**, **95**:3088-3093, 1998.

- MUNIER, F.L.; KORVATSKA, E.; DJEMAÏ, A.; LE PASLIER, D.; ZOGRAFOS, L.; PESCIA, G.; SCHORDERET, D.F. - Kerato-epithelin mutations in four 5q31-linked corneal dystrophies. **Nat. Genet.**, **15**:247-251, 1997.
- MURRAY, J.C.; BENNET, S.R.; KWITEK, A.E.; SMALL, K.W.; SCHINZEL, A.; ALWARD, W.L.; WEBER, J.L.; BELL, G.I.; BUETOW, K.H. - Linkage of Rieger syndrome to the region of epidermal growth factor gene on chromosome 4. **Nat. Genet.**, **2**:46-49, 1992.
- MUSARELLA, M.A. - Gene mapping of ocular diseases. **Surv. Ophthalmol.**, **36**:285-312, 1992.
- NAUMANN, G.O.H.; SCHLÖTZER-SCHREHARDT, U.; KÜCHLE, M. - Pseudoexfoliation syndrome for the comprehensive ophthalmologist. **Ophthalmology**, **105**: 951-968, 1998.
- NEMESURE, B.; HE, Q.; MENDELL, N.; WU, S.Y.; HEJTMANCIK, J.F.; HENNIS, A.; LESKE M.C. - Inheritance of open-angle glaucoma in the Barbados. **Ophthalmology**, **105**: 951-968, 1998.
- NETELLESHP. Apud, CASLHOUN, F.P. - The report, with operative notes, of three generations of one family. **J. Am. Med. Assoc.**, **63**:209-215, 1914.
- NETHLAND, P.A.; WIGGS, J.L.; DREYER, E.B. - Inheritance of glaucoma and genetic counseling of glaucoma patients. **Int. Ophthalmol. Clin.**, **33**:101-120, 1993.
- NGUYEN R.L.; RAJA, S.C.; TRABOULSI, E.I. - Screening relatives of patients with familial chronic open angle glaucoma. **Ophthalmology**, **107**:1294-1297, 2000.
- NGUYEN, T.D.; CHEN, P.; HUANG, W.D.; CHEN, H.; JOHNSON, D.; POLANSKY, J.R. - Gene structure and properties of TIGR, an olfactomedin-related glycoprotein

- cloned from glucocorticoid-induced trabecular meshwork cells. **J. Biol. Chem.**, **273**:6341-6350, 1998.
- NISHIMURA, D.Y.; SWIDERSKI, R.E.; ALWARD, W.L.M.; SEARBY, C.C.; PATIL, S.R.; BENNET, S.R.; KANIS, A.B.; GASTIER, J.M.; STONE, E.M.; SHEFFIELD, V.C. - The forkhead transcription factor gene FKHL7 is responsible for glaucoma phenotypes which map to 6p25. **Nat. Genet.**, **19**:140-147, 1998.
- NORTH, M.A.; NAGGERT, J.K.; YAN, Y.; NOBEN-TRAUTH, K.; NISHINA, P.M. - Molecular characterization of TUB, TULP1, and TULP2, members of the novel tubby gene family and their possible relation to ocular diseases. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA**, **94**:3128-3133, 1997.
- O'BRIEN, E.T.; REN, X.; WANG, Y. - Localization of myocilin to the Golgi apparatus in Schlemm's canal cells. **Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.**, **41**:3842-3849, 2000.
- ORITA, M.; SUZUKI, Y.; SEKIYA, T.; HAYASHI, K. - Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. **Genomics**, **5**:874-879, 1989.
- ORTEGO, J.; ESCRIBANO, J.; COCA-PRADOS, M. - Cloning and characterization of subtracted cDNAs from a human ciliary body library encoding TIGR, a protein involved in juvenile open angle glaucoma with homology to myosin and olfactomedin. **Fed.Eur. Biochem. Soc.**, **413**:349-353, 1997.
- PANG, C.P.; LEUNG, Y.F.; CHUA, J.K.; BAUM, L.; FAN, D.S. Novel TIGR. - Sequence alteration Val153Ala. **Br. J. Ophthalmol.**, **15**:122, 2000.
- PERKINS, E.S. - Blindness from glaucoma and the economics of prevention. **Tr. Ophthalmol. Soc. UK**, 293-295, 1978.
- PERKINS, E.S. - Family studies in glaucoma. **Br. J. Ophthalmol.**, **58**:529-534, 1974.

- PERKINS, E.S. The Bedford glaucoma survey. **Br.J.Ophthalmol.** **57**:179-185, 1973.
- PERRAULT, I.; ROZET, J.M.; CALVAS, P. GERBER, S.; CAMUZAT, A.;  
DOLLFUS, H.; CHÂTELIN, S.; SOUÏED, E.; GHAZI, I.; LEOWSKI, C.;  
BONNEMAISON, M.; LE PASLIER, D.; FRÉZAL, J.; DUFIER, J-L.; PITTLER, S.;  
MUNNICH, A.; KAPLAN, J. - Retinal-specific guanylate cyclase gene mutations in  
Leber's congenital amaurosis. **Nat. Genet.**, **14**:461-464, 1996.
- PETRUKHIN, K.; KOISTI, M.J.; BAKALL, B.; LI, W.; XIE, G.; MARKNELL, T.;  
SANDGREN, O.; FORSMAN, K.; HOLMGREN, G.; ANDREASSON, S.; VUJIC,  
M.; BERGEN, A.A.; MCGARTY-DUGAN, V.; FIGUEROA, D.; AUSTIN, C.P.;  
METZKER, M.L.; CASKEY, C.T.; WADELIUS, C. - Identification of the gene  
responsible for best macular dystrophy. **Nat. Genet.**, **19**:241-247, 1998.
- PHILLIPS, J.C.; DEL BONO, E.A.; HAINES, J.L.; PRALEA, A.M.; COHEN, J.S.;  
GREFF, L.J.; WIGGS, J.L. - A second locus for Rieger syndrome maps to  
chromosome 13q14. **Am.J.Hum.Genet.**, **59**:613-619, 1996.
- PIEDRA, M.E.; ICARDO, J.M.; ALBAJAR, M.; RODRIGUEZ-REY, J.C.; ROS, M.A. -  
Pitx2 participates in the late phase of the pathway controlling left-right asymmetry.  
**Cell**, **94**:319-324, 1998.
- PIERCE, E.A.; QUINN, T.; MEEHAN, T.; MCGEE, T.L.; BERSON, E.L.; DRYJA, T.P. -  
Mutations in a gene encoding a new oxygen-regulated photoreceptor protein cause  
dominant retinitis pigmentosa. **Nat. Genet.**, **22**:248-254, 1999.
- PLÁSILOVÁ, M.; STOILOV, I.; SARFARAZI, M.; KÁDASI, L.; FERÁKOVÁ, E.;  
FERÁK, V. - Identification of a single ancestral CYP1B1 mutation in Slovak Gypsies  
(Roms) affected with primary congenital glaucoma. **J.Med.Genet.**, **36**:290-294, 1999.

- POLANSKY, J.R.; FAUSS, D.J.; CHEN, P.; CHEN, H.; LÜTJEN-DRECOLL, E.; JOHNSON D.; KURTZ, R.M.; MA, Z.D.; BLOOM, E.; NGUYEN, T.D. - Cellular pharmacology and molecular biology of the trabecular meshwork inducible glucocorticoid response gene product. **Ophthalmologica**, **211**:126-138, 1997.
- POLANSKY, J.R.; FAUSS, D.J.; ZIMMERMAN, C.C. - Regulation of TIGR/MYOC gene expression in human trabecular meshwork cells. **Eye**, **14**:503-514, 2000.
- POLANSKY, J.R.; KURTZ, R.M.; ALVARADO, J.A.; WEINREB, R.N.; MITCHELL, M.D. - Eicosanoid production and glucocorticoid regulatory mechanisms in cultured human trabecular meshwork cells. **Prod. Clin. Biol. Res.**, **312**:113-138, 1989.
- POSNER, A. & SCHLOSSMAN, A. - Role of inheritance in glaucoma . **Arch. Ophthalmol.**, **41**:125-150, 1949.
- QUIGLEY, H.A. - Number of people with glaucoma worldwide. **Br. J. Ophthalmol.**, **80**:389-393, 1996.
- QUIGLEY, H.A. - Open-angle glaucoma. **N. Engl. J. Med.**, **328**:1097-1106, 1993.
- QUIGLEY, H.A.; ENGER, C.; KATZ, J.; SOMMER, A.; SCOTT. R.; GILBERT, D. - Risk factors for the development of glaucomatous visual field loss in ocular hypertension. **Arch. Ophthalmol.**, **112**:664-649, 1994.
- QUIGLEY, H.A. & VITALE, S. - Models of open-angle glaucoma prevalence and incidence in the United States. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, **38**:83-91, 1997.
- RAYMOND, V. – Molecular genetics of the glaucomas: mapping of the first five “GLC” loci. **Am. J. Hum. Genet.**, **60**:296-304, 1997.
- RICHARDS, J.E. - Comunicação escrita. Department of Ophthalmology and Visual Science. The University of Michigan, 2000.

- RICHARDS, J.E.; LICHTER, P.R.; BOEHNKE, M.; URO, J.L.A.; TORREZ, D.; WONG, D.; JOHNSON, T. - Mapping of a gene for autosomal dominant juvenile-onset open-angle glaucoma to chromosome 1q. **Am. J. Genet.**, **56**:62-70, 1994.
- RICHARDS, J.E.; LICHTER, P.R.; HERMAN, S.; HAUSER, E.R.; HOU, Y.C.; JOHNSON, A.T.; BOEHNKE, M. - Probable exclusion of GLC1A as a candidate glaucoma gene in a family with middle-age-onset primary open-angle glaucoma. **Ophthalmology**, **103**:1035-1040, 1996.
- RICHTER, C.U.; RICHADSON, T.M.; GRANT, W.M. – Pigmentary dispersion syndrome and pigmentar glaucoma. **Arch. Ophthalmol.**, **104**:211-215, 1986.
- RIEGER, Apud, SHIELDS, M.B. Axenfeld-Rieger Syndrome. In: RITCH, R.; SHIELDS, M.B.; KRUPIN, T. **The Glaucomas**. 2 ed. Saint Louis. Mosby-Year Book, 1996. v.2 p.875-885.
- RITCH, R. - Going forward to work backward. **Arch.Ophthalmol.**, **115**:404-406, 1997.
- RITCH, R.; LOWE, R.F. - Angle-closure glaucoma: clinical types. In: RITCH, R.; SHIELDS, M.B.; KRUPIN, T. **The Glaucomas**. 2 ed. Saint Louis. Mosby-Year Book, 1996. v.2 p.821-840.
- ROSENTHAL, A.R. & PERKINS, E.S. Family studies in glaucoma. **Br.J.Ophthalmol.**, **69**:664-667, 1985.
- ROZSA, F.W.; SHIMIZU, S.; LICHTER, P.R.; JOHNSON, A.T.; OTHMAN, M.I.; SCOTT, K.; DOWNS, C.A.; NGUYEN, T.D.; POLANSKY, J.; RICHARDS, J.E. - GLC1A mutations point to regions of potential functional importance on the TIGR/MYOC protein. **Molec. Vis.**, **4**:20-35, 1998.

- RUSSEL, P.; TAMM, E.R.; GREHN, F.J.; PICHT, G.; JOHNSON, M. - The presence and properties of myocilin in the aqueous humor. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, **42**:983-986, 2001.
- SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUSHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. **Science**, **239**:487-491, 1988.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning, a Laboratory Manual**, 2a edição, Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- SANDVIG, K. - Pseudoglaucoma of autosomal, dominant inheritance: a report on three families. **Acta. Ophthalmol.**, **39**:33-43, 1961.
- SARFARZI, M. - Recent advances in molecular genetics of galucomas. **Hum. Molec. Genet.**, **6**:1667-1677, 1997.
- SARFARAZI, M.; AKARSU, A.N.; HOSSAIN, A.; TURACLI, M.E.; AKTAN, S.G.; BARSOUM-HOMSY, M.; CHEVRETTE, L.; SAYLI, B.S. Assignment of a locus (GLC3A) for primary congenital glaucoma (Buphthalmos) to 2p21 and evidence for genetic heterogeneity. **Genomics** **30**:171-177, 1995.
- SARFARAZI, M.; CHILD, A.; STOILOVA, D.; BRICE, G.; DESAI, T.; TRIFAN, O.C.; POINOOSAWMY, D.; CRICK, R. P. - Localization of the fourth locus (GLC1E) for adult-onset primary open-angle glaucoma to the 10p15-p14 region. **Am. J. Hum. Genet.**, **62**:641-652, 1998.
- SCHMIDT-RIMPLER, Apud, POSNER, A. & SCHLOSSMAN, A. - Role of inheritance in glaucoma . **Arch. Ophthalmol.**, **41**:125-150, 1949.

- SCHOTTENSTEIN, E.M. - Peter's anomaly. In: RITCH, R.; SHIELDS, M.B.; KRUPIN, T. **The Glaucomas**. 2 ed. Saint Louis. Mosby-Year Book, 1996. v.2 p.887-897.
- SCHWAHN, U.; LENZNER, S.; DONG, J.; FEIL, S.; HINZMANN, B.; VAN DUIJNHOFEN, G.; KIRSCHER, R.; HEMBERGER, M.; BERGEN A.A.; ROSENBERG, T.; PINCKERS, A.J.; FUNDELE, R.; ROSENTHAL, A.; CREMERS, F.P.; ROPERS, H.H.; BERGER, W. - Positional cloning of the gene for X-linked retinitis pigmentosa 2. **Nat. Genet.**, **19**:327-332, 1998.
- SCHWARTZ, M.D.; REULING, F.H.; FEINLEIB, M.; GARRINSON, M.S.; COLLIE, D.J. - Twin study on ocular pressure after topical dexamethasone. **Am. J. Ophthalmol.**, **76**:126-136, 1973a.
- SCHWARTZ, M.D.; REULING, F.H.; FEINLEIB, M.; GARRINSON, M.S.; COLLIE, D.J. b - Twin study on ocular pressure following topically applied dexamethasone. **Arch. Ophthalmol.**, **90**:281-286, 1973b.
- SEMINA, E.V.; FERREL, R.E.; MINTZ-HITTNER, H.A.; BITUON, P.; ALWARD, W.L.; REITER, R.S.; FUNKHAUSER, C.; DAACK-HIRSCH, S.; MURRAY, J.C. - A novel homeobox gene PITX3 is mutated in families with autosomal-dominant cataracts and ASMD. **Nat. Genet.**, **19**:167-170, 1998.
- SEMINA, E.V.; REITER, R.; LEYSENS, N.J.; ALWARD, W.L.M.; SMALL, K.W.; DATSON, N.A.; SIEGEL-BARTELT, J.; BIERKE-NELSON, D.; BITOUN, P.; ZABEL, B.U.; CAREY, J.C.; MURRAY, J.C. Cloning and characterization of a novel bicoid-related homeobox transcription factor gene, RIEG, involved in Rieger syndrome. **Nat. Genet.**, **14**:392-399, 1996.

- SHEFFIELD, V.C.; STONE, E.M.; ALWARD, W.L.M.; DRACK, A.V.; JOHNSON, A.T.; STREB, L.M.; NICHOLS, B.E. - Genetic linkage of familial open angle glaucoma to chromosome 1q21-q31. **Nat. Genet.**, 4:47-50, 1993.
- SHIELDS, M.B. - Axenfeld-Rieger Syndrome. In: RITCH, R.; SHIELDS, M.B.; KRUPIN, T. **The Glaucomas**. 2 ed. Saint Louis. Mosby-Year Book, 1996. v.2 p.875-885.
- SHIELDS, M.B., RITCH, R., KRUPIN, T. - Classification of glaucomas. In: RITCH, R.; SHIELDS, M.B.; KRUPIN, T. **The Glaucomas**. 2 ed. Saint Louis. Mosby-Year Book, 1996. v.2 p.717-725.
- SHIELS, A.; MACKAY, D.; IONIDES, A.; BERRY, V.; MOORE, A.; BHATTACHARYA, S. - A missense mutation in the human connexin 50 gene (GJA8) underlies autosomal dominant "zonular pulverulent" cataract on chromosome 1q. **Am. J. Hum. Genet.**, 62:526-532, 1998.
- SHIMIZU, S.; LICHTER, P.R.; JOHNSON, A.T.; ZHOU, A.; HIGASHI, M.; GOTTFREDSOTTIR, M.; OTHMAN, M.; MOROI, S.E.; ROZSA, F.W.; SCHERTZER, R.M.; CLARKE, M.S.; SCHWARTZ, A.L.; DOWNS, C.A.; VOLLRATH, D.; RICHARDS, J.E. - Age-dependent prevalence of mutations at the GCL1A locus in primary open-angle glaucoma. **Am. J. Ophthalmol.**, 130:165-177, 2000.
- SHIN, D.H.; BECKER, B.; KOLKER, A.E. - Family history in primary open-angle glaucoma. **Arch. Ophthalmol.**, 95:598-600, 1977.
- SHIOSE, Y.; KITAZAWA, Y., TSUKAHARA, S., AKAMATSU, T.; MIZOKAMI, K.; FUTA, R; KATSUSHIMA, H.; KOSAKI, H – Epidemiology of glaucoma in japan: a nationwide glaucoma survey. **Jpn. J. Ophthalmol.**,:133-155,1991. (Abstract).

- SKUTA, G.L.; MORGAN, R.K. - Corticosteroid-induced glaucoma. In: RITCH, R.; SHIELDS, M.B.; KRUPIN, T. **The Glaucomas**. 2 ed. Saint Louis. Mosby-Year Book, 1996. v.2 p.1177-1188.
- SMITH, A.F. & SMITH, J.G. - The economic burden of global blindness: a price too high!. **Br. J. Ophthalmol.**, **80**:276-277, 1996.
- SNYDER, D.A.; RIVERS, A.M.; YOKOE, H.; MENCO, B.P.; ANHOLT, R.R. - Olfactomedin: purification, characterization, and localization of a novel olfactory glycoprotein. **Biochemistry**, **30**:9143-9153, 1991.
- SOHOCKI, M.M.; SULIVAN L.S.; MINTZ-HITTNER, H.A.; BIRCH, D.; HECKENLIVELY, J.R.; FREUND, C.L.; MCINNES, R.R.; DAIGER, S.P. - A range of clinical phenotypes associated with mutations in CRX, a photoreceptor transcription-factor gene. **Am. J. Hum. Genet.**, **63**:1307-1315, 1998.
- SOMMER, A.; TIELSCH, J.M.; KATZ, J.; QUIGLEY, H. A.; GOTTSCH, J.D.; JAVITT, J.C.; MARTONE, J. F.; ROYALL, R. M.; WITT, K.A.; EZRINE, S. - Racial differences in the cause-specific prevalence of blindness in east Baltimore. **N. Engl. J. Med.**, **325**:1412-1417, 1991.
- SPAETH, G.L. -The acute glaucomas: diagnosis and management. **Curr. Conc. Ophthalmol.**, **3**:24-33, 1995.
- STAMER, W.D.; ROBERTS, B.C.; HOWELL, D.N.; EPSTEIN, D.L. – Isolation, culture, and characterization of endothelial cells from schlemm’s canal. **Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.**, **39**:1804-1812, 1998.
- STEPHAN, D.A.; GILLANDERS, E.; VANDERVEEN, D.; FREAS-LUTZ, D.; WISTOW, G.; BAXEVANIS, A.D.; ROBBINS, C.M.; VANAUKEN, A.; QUESENBERRY, M.I.; BAILEY-WILSON, J.; JUO, S-H.H.; TRENT, J.M.; SMITH,

- L.; BROWNSTEIN, M.J. - Progressive juvenile-onset punctate cataracts caused by mutation of the  $\gamma$ D-crystallin gene. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA**, **96**:1008-1012, 1999.
- STOILOV, I.R.; AKARSU, A.N.; SARFARAZI, M. - Identification of three different truncating mutations in cytochrome P4501B1 (CYP1B1) as the principal cause of primary congenital glaucoma (Buphthalmos) in families linked to the GLC3A locus on chromosome 2p21. **Hum.Mol.Genet.**, **6**:641-647, 1997.
- STOILOV, I.R.; COSTA, V.P.; VASCONCELLOS, J.P.C.; MELO, M.B.; BETINJANE, A.J.; CARANI, J.C.E.; OLTROGGE, E.V.; SARFARAZI, M. – Mutation screening of the CYP1B1 gene and phenotype-genotype correlation in primary congenital glaucoma cases from Brazil. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**,**42**:530,2001. (Abstract, 2848).
- STOILOV, I.R.; NURTEN, A.; ALOZIE, I.; CHILD, A.; BARSOUM-HOMSY, M.; TURACLI, M.E.; OR, M.; LEWIS, R.A.; OZDEMIR, N.; BRICE, G.; AKTAN, S.G.; CHEVRETTE, L.; COCA-PRADOS, M.; SARFARAZI, M. - Sequence analysis and homology modeling suggest that primary congenital glaucoma on 2p21 results from mutations disrupting either the hinge region or the conserved core structures of cytochrome P450B1. **Am.J.Hum.Genet.**, **62**:573-584, 1998.
- STOILOVA, D.; CHILD, A.; BRICE, G.; CRICK, R.P.; FLECK, B.W.; SARFARAZI, M. - Identification of a new 'TIGR' mutation in a family with juvenile-onset primary open angle glaucoma. **Ophthalm. Genet.**, **18**:109-118, 1997.
- STOILOVA, D.; CHILD, A.; BRICE, G.; DESAI, T.; BARSOUM-HOMSY, M.; OZDEMIR, N.; CHEVRETTE, L.; ADAM, M.F.; GARCHON, H.J.; CRICK, R.P.;

- SARFARAZI, M. - Novel TIGR/MYOC mutations in families with juvenile onset primary open angle glaucoma. **J. Med. Genet.**, **35**:989-992, 1998.
- STOILOVA, D.; CHILD, A.; TRIFAN, O.C.; CRICK, R.P.; COAKES, R.L.; SARFARAZI, M. - Localization of a locus (GLC1B) for adult-onset primary open angle glaucoma to the 2cen-q13 region. **Genomics**, **36**:142-150, 1996.
- STOKES, W. H. - Hereditary primary glaucoma : a pedigree with five generations. **Arch. Ophthalmol.** 885-909, 1940.
- STONE, E.M.; FINGERT, J.H.; ALWARD, W.L.M.; NGUYEN, T.D.; POLANSKY, J.R.; SUNDEN, S.L.F.; NISHIMURA, D.; CLARK, A.F.; NYSTUEN, A.; NICHOLS, B.E.; MACKEY, D.A.; RITCH, R.; KALENAK, J.W.; CRAVEN, E.R.; SHEFFIELD, V.C. - Identification of a gene that causes primary open angle glaucoma. **Science**, **275**:668-670, 1997.
- STONE, E.M.; NICHOLS, B.E.; KIMURA, A.E.; WEINGEIST, T.A.; DRACK, A.; SHEFFIELD, V.C. - Clinical features of a Stargardt-like dominant progressive macular dystrophy with genetic linkage to chromosome 6q. **Arch.Ophthalmol.** **112**:765-772, 1994.
- SUZUKI, Y.; SHIRATO, S.; TANIGUSHI, F.; OHARA, K.; NISHIMAKI, K.; OHTA, S. - Mutations in the TIGR gene in familial primary open-angle glaucoma in Japan. **Am. J. Hum. Genet.**, **61**:1202-1204, 1997. [letter]
- SVEISSON, K. - Glaucoma and heredity in Iceland. **Acta. Ophthalmol (Copenh)**:191-198, 1959.
- SWIDERSKI, R.E.; ROSS, J.L.; FINGERT, J.H.; CLARK, A.F.; ALWARD, W.L.M., STONE, E.M.; SHEFFIELD, V.C. - Localization of MYOC transcripts in human eye

- and optic nerve by in situ hybridization. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, **41**:3420-3428, 2000.
- TAGUCHI, M.; KANNO, H.; KUBOTA, R.; MIWA, S.; SHISHIBA, Y.; OZAWA, Y. - Molecular cloning and expression profile of rat myocilin. **Molec. Genet. Met.**, **70**:75-80, 2000.
- TAKAHASHI, H.; NODA, S.; MASHIMA, Y.; KUBOTA, R.; OHTAKE, Y.; TANINO, T.; KUDOH, J.; MINOSHIMA, S.; OGUCHI, Y.; SHIMIZU N. – The myocilin gene expression I the human trabecular meshwork. **Curr. Eye. Res.**,**20**:81-84, 2000.
- TAMM, E.R.; RUSSEL, P.; EPSTEIN, D.L.; JOHNSON, D.H.; PIATIGORSKY, J. – Modulation of myocilin/TIGR expression in human trabecular meshwork. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, **40**:2577-2582, 1999.
- TANIGUCHI, F.; SUZUKI, Y.; KURIHARA, H.; KURIHARA, Y.; KASAI, H.; SHIRATO, S.; ARAIE, M. - Molecular cloning of the bovine MYOC and induction of its expression in trabecular meshwork cells. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, **41**:2070-2075, 2000.
- TEIKARI, J.M. - Closed-angle glaucoma in 20 pairs of twins. **Can.J.Ophthalmol.**, **23**:14-16, 1988.
- TEIKARI, J.M. - Genetic factors in open-angle (simple and capsular) glaucoma. **Acta Ophthalmol.**, **65**:715-720, 1987.
- TEIKARI, J.M. – Genetic influences in open-angle glaucoma. **Int. Ophthalmol. Clin.**,**30**:161-168,1990.
- TEIKARI, J.M.; AIRAKSINEN, P.J.; KAPRIO, J.; KOSKENVUO, M. - Primary open-angle glaucoma in 2 monozygotic twin pairs. **Acta Ophthalmol.**, **65**:607-611, 1987.

- THOMPSON & THOMPSON. - O mapa de genes humanos: mapeamento gênico e análise de ligações. In: \_\_\_\_\_-**Genética Médica**. 5 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1993b. p.115-137.
- THOMPSON & THOMPSON. - Padrões de herança monogênica. In: \_\_\_\_\_-**Genética Médica**. 5 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1993a. p.38-68.
- THYLEFORS, B. - The role of international ophthalmology in blindness prevention. **Am. J. Ophthalmol.**, **119**:229-230, 1995.
- TIELSCH, J.M.; KATZ, J.; SOMMER, A.; QUIGLEY, H. A.; JAVITT, J.C. - Family history and risk of primary open angle glaucoma. **Arch. Ophthalmol.**, **112**:69-73, 1994.
- TIELSCH, J.M.; SOMMER, A.; KATZ, J.; ROYALL, R.M.; QUIGLEY, H.A.; JAVITT, J. - Racial variations in the prevalence of primary open-angle glaucoma : the Baltimore eye survey. **J. Am. Med. Assoc.**, **266**:369-374, 1991.
- TOMAREV, S.I.; CALLAERTS, P.; KOS, L.; ZINOVIEVA, R.; HALDER, G.; GEHRING, W.; PIATIGORSKI, J. - Squid Pax-6 and eye development. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA**, **94**:2421-2426, 1997.
- TON, C.C.T.; HIRVONEN, H.; MIWA, H.; WEIL, M.W.; MONAGHAN, P; JORDAN, T.; HEYNINGEN V.; HASTIE, N.D.; MEIJERS-HEIJBOER, H.; DRECHSLER, M.; ROYER-POKORA, B.; COLLINS, F.; SWAROOP, A.; STRONG, L.C.; SAUNDERS, G.F. – Positional cloning and characterization of a paired box-and homeobox- containing gene from the aniridia region. **Cell**, **67**:1059-1074, 1991.
- TRIFAN, O.C.; TRABOUSI, E.I.; STOILOVA, D.; ALOZIE, I.; NGUYEN, R.; RAJA, S.; SARFARAZI, M. - A third locus (GLC1D) for adult-onset primary open-angle glaucoma maps to the 8q23 region. **Am. J. Ophthalmol.**, **126**:17-28, 1998.

- UEDA, J.; WENTZ-HUNTER, K.K.; CHENG, E.L.; FUKUCHI, T.; ABE, H.; YUE, B.Y.J.T. - Ultrastructural localization of myocilin in human trabecular meshwork cells and tissues. **J. Histochem. Cytochem.**, **48**:1321-1329, 2000.
- UHM, K.B.; SHIN, D.H. - Positive family history of glaucoma is a risk factor for increase IOP rather glaucomatous. **Kor. J. Ophthalmol.**, **6** :100-114, 1992.
- VANCE, J.M.; JONASSON, F.; LENNON, F.; SARRICA, J.; DAMJI, K.F.; STAUFFER, J.; PERICAK-VANCE, M.A.; KLINTWORTH, G.K. - Linkage of a gene for macular corneal dystrophy to chromosome 16. **Am. J. Hum. Genet.**, **58**:757-762, 1996.
- VASCONCELLOS, J.P.C.; MELO, M.B.; COSTA, V.P.; TSUKUMO, D.M.L.; BASSERES, D.S.; BORDIN, S.; SAAD, S.T.O.; COSTA, F.F. – Novel mutation in the MYOC gene in primary open-angle patients. **J. Med. Genet.**, **37**:301-303, 2000.
- VASCONCELLOS, J.P.C.; MELO, M.B.; MENEZES, F.; TSUKUMO, D.M.L.; COSTA, V.P.; KARA-JOSÉ, N.; COSTA, F.F. – Mutações no gene MYOC/TIGR em uma população brasileira com glaucoma juvenil e glaucoma primário de ângulo aberto. **Arq. Bras. Oftal.**, **61**:690-693, 1998.
- VAZQUEZ, C.M.; HERRERO, O.M.; BASTUS, B.M.; PEREZ, V.D. - Mutations in the third exon of the MYOC gene in Spanish patients with primary open angle glaucoma. **Ophthalmic. Genet.**, **21**:109-115, 2000.
- VOTRUBA, M.; MOORE, A.T.; BHATTACHARYA, S.S. - Clinical features, molecular genetics, and pathophysiology of dominant optic atrophy. **J. Med. Genet.**, **35**:793-800, 1998.
- WAARDENBURG, P.J. - Is primary (pre)senile glaucoma repeatedly hereditary and, if so, what is the mode of hereditary transmission ?. **Ophthalmologica**, **119**:250-252, 1950.
- WAGNER, R.S. Glaucoma in children. **Ped. Ophthalmol.**, **40**:855-867, 1993.

- WALTER, M.A.; MIRZAYANS, F.; MEARS, A.J.; HICKEY, K.; PEARCE, W.G.  
Autosomal-dominant iridogoniodysgenesis and Axenfeld-Rieger syndrome are genetically distinct. **Ophthalmology**, **103**:1907-1915, 1996.
- WANG, X. & JOHNSON, D.H. - mRNA in situ hybridization of TIGR/MYOC in human trabecular meshwork. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, **41**:1724-1729, 2000.
- WEEKERS, R.; GOUNGARD-RION, C.; GOUNGARD, L. – Considerarations clineques sur l'hérédité. **Bull. Soc. Belge Ophthalmol.**, **110**:255-276,1955.
- WELEBER, R.G.; CARR, R.E.; MURPHEY, W.H.; SHEFFIELD, V.C.; STONE, E.M. – Phenotypic variation including retinitis pigmentosa, pattern dystrophy, and fundus flavimaculatus in a single family with a deletion of codon 153 or 154 of the peripherin/RDS gene. **Arch. Ophthalmol.**, **111**:1531-1542, 1993.
- WIGGS, J.L.; ALLINGHAM, R.R.; VOLLRATH, D.; JONES, K.H.; DE LA PAZ, M.; KERN, J.; PATTERSON, K.; BABB, V.L.; DEL BONO, E.A.; BROOMER, B.W.; PERICAK-VANCE, M.A.; HAINES, J.L. - Prevalence of mutations in TIGR/myocin in patients with adult and juvenile primary open-angle glaucoma. **Am. J. Hum. Genet.**, **63**:1549-1552, 1998b. [letter]
- WIGGS, J.L.; ANDERSEN, J.S.; ESTEFANSSON, E.; LOFTSDOTTIR, M.; SVERISSON, T.; THORGEIRSSON, E.; JONASSON, F.; PRICE, P.; HAMILTON, J.; LENNON-GRAHM, F.; DAMJI, K.; GOTTFREDSOTTIR, M.; PERICAK-VANCE, M.A.; HAINES, J.L.; ALLINGHAM, R.R. - A genomic screen suggest a locus on chromosome 2p16 for pseudoexfoliation syndrome. **Am. J. Hum. Genet.**,**63**:314,1998a. (Abstract, 1818).

- WIGGS, J.L.; DAMJI, K.F.; HAINES, J.L.; PERICAK-VANCE, M. A.; ALLINGHAM, R.R. - The distinction between juvenile and adult-onset primary open-angle glaucoma. **Am. J. Hum. Genet.**, **58**:243-244, 1996.
- WIGGS, J.L.; DEL BONO, E.A.; SCHUMAN, J.S.; HUTCHINSON, T.; WALTON, D.S. - Clinical features of five pedigrees genetically linked to the juvenile glaucoma locus on chromosome 1q21-a31. **Ophthalmology**, **102**:1782-1789, 1995.
- WIGGS, J.L.; HAINES, J.L.; PAGLINAUAN, C.; FINE, A.; SPORN, C.; LOU, D. - Genetic linkage of autosomal dominant juvenile glaucoma to 1q21-q31 in three affected pedigrees. **Genomics**, **21**:299-303, 1994.
- WILSON Apud, DAMJI, K.F. & ALLINGHAM, R.R. - Molecular genetics is revolutionizing our understanding of ophthalmic disease. **Am. J. Ophthalmology**, **124**:530-543, 1997.
- WILSON, M. R.; HERTZMARK, E.; WALKER, A.M.; CHILDS-SHAW, K.; EPSTEIN, D.L. - A case-control study of risk factors in open angle glaucoma. **Arch. Ophthalmol.**, **105**:1066-1071, 1987.
- WILSON, M.R.; WALKER, A.M.; DUEKER, D.K.; CRICK, R.P. - Risk factors for rate of progression of glaucomatous visual field loss. **Arch. Ophthalmol.**, **100**:737-741, 1982.
- WIRTZ, M.K.; SAMPLES, J.R.; KRAMER, P.L.; RUST, K.; TOPINKA, J.R.; YOUNT, J.; KOLER, R.D.; ACOTT, T.S. - Mapping a gene for adult-onset primary open-angle glaucoma to chromosome 3q. **Am. J. Hum. Genet.**, **60**:296-304, 1997.
- WIRTZ, M. K.; SAMPLES, J.R.; RUST, K.; LIC, J.; NORDLING, L.; SCHILLING, K.; ACOTT, T.S.; KRAMER, P.L. - GLC1F, a new primary open-angle glaucoma locus, maps to 7q35-q36. **Arch. Ophthalmol.**, **117**:237-241, 1999.

- WOLFS, R.C.W.; KLAVER, C.C.W.; RAMRATTAN, R.S.; VAN DUIJIN, C.M.; HOFMAN, A.; DE JONG, P.T.V.M. - Genetic risk of primary open-angle glaucoma. **Arch. Ophthalmol.**, **116**:1640-1645, 1998.
- WORDINGER, R.J. & CLARK, A.F. - Effects of glucocorticoids on the trabecular meshwork: towards a better understanding of glaucoma. **Prog.Ret.Eye Res.**, **18**:629-667, 1999.
- WORDINGER, R.J.; CLARK, A.F.; AGARWAL, R.; LAMBERT, W.; MCNATT, L.; WILSON, S.E.; QU, Z.; FUNG, B.K. - Cultured human trabecular meshwork cells express functional growth factor receptors. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, **39**:1575-1589, 1998.
- WORMALD, R.P.; BASAURI, E.; WRIGHT, L.A.; EVANS, J.R. - The African Caribbean eye survey: risk factors for glaucoma in a sample of African Caribbean people living in London. **Eye**, **8**:315-320, 1994.
- WU, S.Y. & LESKE, M.C. - Associations with intraocular pressure in the Barbados eye study. **Arch. Ophthalmol.**, **115**:1572-1576, 1997.
- WU, S.Y.; NEMESURE, B.; LESKE, M.C. - Glaucoma and myopia, **Ophthalmology**, **106**:2010-2015, 2000.
- WUDUNN, D.; PARRISH, R.K.; INANA, G. - Genetic heterogeneity in Hispanic families with autosomal dominant juvenile glaucoma. **Ophthalm. Genet.**, **17**:87-94, 1996.
- YOKOE, H. & ANHOLT, R.H. - Molecular cloning of olfactomedin, an extracellular matrix protein specific to olfactory neuroepithelium. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **90**:4655-4659, 1993.

- YONEDA, M.; TSUJI, S.; YAMAUCHI, T.; INUZUKA, T.; MIYATAKE, T.; HORAI, S.; OZAWA, T. - Mitochondrial DNA mutation in family with Leber's hereditary optic neuropathy. **Lancet**, **13**:1076-1077, 1989.
- YOON, S.J.K.; KIM, H.S.; MOON, J.I.; LIM, J.M.; JOO, C.K. - Mutations of the TIGR/MYOC gene in primary open-angle glaucoma in Korea. **Am. J. Hum. Genet.**, **64**:1775-1778, 1999. [letter]
- YOSHIOKA, H.; MENO, C.; KOSHIBA, K.; SUGIHARA, M.; ITOH, H.; ISHIMARU, Y.; INOUE, T.; OHUCHI, H.; SEMINA, E.V.; MURRAY, J.C.; HAMADA, H.; NOJI, S. - Pitx2, a bicoid-type homeobox gene, is involved in a lefty-signaling pathway in determination of left-right asymmetry. **Cell**, **94**:299-305, 1998.
- ZHANG, K.; BITHER, P.P.; PARK, R.; DONOSO, L.A.; SEIDMAN, J.G.; SEIDMAN, C.E. - A dominant Stargardt's macular dystrophy locus maps to chromosome 12q34. **Arch.Ophthalmol.**, **112**:759-764, 1994.
- ZHANG, K.; NGUYEN, T.H.E.; CRANDALL, A.; DONOSO, L. A. - Genetic and molecular studies of macular dystrophies: recent developments. **Surv. Ophthalmol.**, **40**:51-61, 1995.
- ZIMMERMAN, C.C.; LINGAPPA, V.R.; RICHARDS, J.E.; ROZSA, F.W.; LICHTER, P.R.; POLANSKY, J.R. - A trabecular meshwork glucocorticoid response (TIGR) gene mutation affects translocational processing. **Molec. Vis.**, **5**:19-24, 1999.
- ZORAB, A. - Glaucoma simplex familiaris. **Tr. Ophthalmol. Soc. UK**, **52**:446-460, 1932.

Normas baseadas em: "Normas para a apresentação de dissertações e teses" de Maria Luiza Gugliano Herani. São Paulo, 1990. BIREME e Normas, procedimentos e orientações para publicação de dissertações e teses. Campinas, 2001. UNICAMP.

