



EUGÊNIO SANTANA DE FIGUEIRÊDO

**ESTUDO DE ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS NOS GENES *CRYAA*, *CRYGC* E
CRYGD EM PACIENTES COM CATARATA CONGÊNITA DE UMA
POPULAÇÃO BRASILEIRA**

CAMPINAS

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

Eugênio Santana de Figueirêdo

**ESTUDO DE ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS NOS GENES *CRYAA*,
CRYGC E *CRYGD* EM PACIENTES COM CATARATA CONGÊNITA
DE UMA POPULAÇÃO BRASILEIRA**

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Leite Arieta

Co-Orientadora: Profa. Dra. Mônica Barbosa de Melo

Tese de Doutorado apresentada à Pós- Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP para obtenção de título de Doutor em Ciências Médicas, área de concentração em Oftalmologia.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA
DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO EUGÊNIO
SANTANA DE FIGUEIRÊDO E ORIENTADO PELO PROF. DR.
CARLOS EDUARDO LEITE ARIETA.

Assinatura do Orientador

Campinas, 2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

F475e Figueirêdo, Eugênio Santana de, 1981-
Estudo de alterações estruturais nos genes CRYAA,
CRYGC e CRYGD em pacientes com catarata congênita
de uma população brasileira / Eugênio Santana de
Figueirêdo. -- Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador : Carlos Eduardo Leite Arieta.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Catarata - Congênito. 2. Catarata - Genética. 3.
Cristalinas. 4. Genes. 5. Mutação. I. Arieta, Carlos
Eduardo Leite, 1956-. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Study of structural alterations in genes CRYAA, CRYGC and CRYGD in patients with congenital cataract from a brazilian population.

Palavras-chave em inglês:

Cataract, Congenital

Cataract, Genetics

Crystallins

Genes

Mutation

Área de concentração: Oftalmologia

Titulação: Doutor em Ciências Médicas

Banca examinadora:

Carlos Eduardo Leite Arieta [Orientador]

Newton Kara-José Junior

Roberto Pinto Coelho

Maurício Abujamra Nascimento

Edi Lúcia Sartorato

Data da defesa: 27-02-2013

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

EUGÊNIO SANTANA DE FIGUEIREDO

Orientador (a) PROF(A). DR(A). CARLOS EDUARDO LEITE ARIETA

MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). CARLOS EDUARDO LEITE ARIETA

2. PROF(A). DR(A). MAURICIO ABUJAMRA NASCIMENTO

3. PROF(A). DR(A). EDI LÚCIA SARTORATO

4. PROF(A).DR(A). ROBERTO PINTO COELHO

5. PROF(A).DR(A). NEWTON KARA JOSÉ JUNIOR

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

Data: 27/02/2013

Aos meus pais, Hugo e Mariêta, aos meus irmãos, Hugo Júnior, Régis, Cecília, Felipe e Manoela, à minha esposa, Priscila, à minha filha, Marina, e a todos que contribuíram, de alguma forma, para este momento.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Hugo e Mariêta, pelos ensinamentos e pelo constante apoio ao longo da minha vida. Minha inspiração.

À minha esposa, Priscila, pelo suporte e pela companhia diária, sem os quais a conclusão deste trabalho seria muito dificultada.

À minha filha, Marina, que surgiu ao longo do período da Pós-Graduação e serviu de enorme estímulo para a conclusão deste trabalho.

Aos meus sogros, Franciberto e Ana Darc, pelo apoio e pelo convívio familiar que me proporcionam.

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Leite Arieta, pela paciência e sabedoria durante minha orientação, além da amizade e do constante incentivo ao longo da nossa convivência. Exemplo de orientador.

À Profa. Dra. Mônica Barbosa de Melo, pela co-orientação e pela paciência ao me apresentar o mundo da genética. Minha sincera gratidão.

Ao Prof. Dr. José Paulo Cabral de Vasconcellos, pelas valiosas contribuições durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Alessandro Santana, por ter desbravado o assunto deste trabalho no Brasil e por ter contribuído enormemente com o desenvolvimento da metodologia deste estudo.

Ao Prof. Dr. Márcio José da Silva, por disponibilizar equipamentos fundamentais à realização deste trabalho.

Ao amigo Anderson Tavares, por todo o auxílio no desenvolvimento deste estudo. Minha eterna gratidão.

À amiga Daniela Stancato, pelo imenso suporte durante as reações de sequenciamento, fundamentais para a obtenção dos resultados deste trabalho.

Aos amigos Pedro Cruz, Bruno Batista, Carolina Braghini e Bibiana Amélia pela ajuda e pelo companheirismo durante minha estada no laboratório.

Aos amigos Fabio Endo Hirata, Vanessa Gonçalves Vidotti Pimenta e Daniel de Sousa Pimenta pelo companheirismo ao longo do período da Residência Médica e da Pós-Graduação.

Ao amigo André Casimiro, pela amizade, pelo companheirismo durante a maior parte da minha estadia em Campinas e por propiciar momentos alegres ao longo do período da Pós-Graduação.

Aos amigos João Francisco Neto e Daniel Pordeus, pela amizade de infância, responsável pela construção de alicerces sólidos que me ajudaram a alcançar este momento.

À equipe de enfermagem do ambulatório de Oftalmologia da UNICAMP pelo importante auxílio na coleta das amostras.

Às famílias dos pacientes, que se doaram e muito contribuíram para a realização deste estudo. Meu respeito e minha imensurável gratidão.

**“Quando não houver saída
Quando não houver mais solução
Ainda há de haver saída
Nenhuma ideia vale uma vida...
Quando não houver esperança
Quando não restar nem ilusão
Ainda há de haver esperança
Em cada um de nós, algo de uma criança”**
(Sergio Britto)

RESUMO

A catarata congênita é a principal causa de cegueira reversível na infância, com prevalência de um a cinco casos por 10.000 nascidos vivos. A forma hereditária corresponde a 50% desses casos, sendo a forma de transmissão autossômica dominante a mais comum. As alterações genéticas podem determinar mudanças no funcionamento das proteínas do cristalino, tais como cristalinas, conexinas, proteínas de transporte de membrana e proteínas de citoesqueleto. As cataratas nucleares e lamelares são as formas mais comuns entre as opacidades congênitas, e as alterações nos genes que codificam as proteínas α A-cristalina (*CRYAA*), γ C-cristalina (*CRYGC*) e γ D-cristalina (*CRYGD*) têm sido relacionadas com esses tipos de catarata. O presente estudo teve como objetivo determinar as alterações estruturais nos genes *CRYAA*, *CRYGC* e *CRYGD* em pacientes com catarata congênita bilateral, formas nuclear e lamelar, do ambulatório de catarata congênita do Hospital das Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Foram investigadas dez famílias (69 indivíduos), incluindo os casos-índice e seus parentes em primeiro grau. As regiões de codificação e as junções *intron/exon* foram amplificadas a partir de ácido desoxirribonucleico (DNA) genômico e submetidas a sequenciamento automático. Este estudo identificou seis polimorfismos (SNP) e uma mutação nos três genes investigados (gene *CRYAA* – SNP D2D, Y18Y e G137G; gene *CRYGC* – SNP G41G e S119S; gene *CRYGD* – SNP R95R e mutação Y134C), sendo três deles inéditos na literatura (G137G, G41G e Y134C). No gene *CRYGD*, a inédita mutação Y134C mostrou-se potencialmente deletéria para o funcionamento da proteína γ D-cristalina.

ABSTRACT

Congenital cataract is the leading cause of reversible blindness in childhood, with a prevalence of one to five cases per 10,000 live births. The hereditary form corresponds to 50% of these cases. The most common mode of inheritance is autosomal dominant with high penetrance. Genetic abnormalities determine changes in lens proteins, such as crystallins, connexins, membrane transport proteins and cytoskeletal proteins. The nuclear and lamellar cataracts are the most common among congenital opacities. Abnormalities in α A-crystallin (*CRYAA*), γ C-crystallin (*CRYGC*) and γ D-crystallin (*CRYGD*) genes have been associated with these phenotypes. The present study aimed to determine the structural alterations in *CRYAA*, *CRYGC* and *CRYGD* genes in patients with bilateral congenital cataract, nuclear and lamellar forms, evaluated at Hospital das Clínicas, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Ambulatório de Catarata Congênita. We investigated ten families (69 individuals), including the probands and their first-degree relatives. Coding regions and intron/exon boundaries were amplified from genomic deoxyribonucleic acid (DNA) and directly sequenced. Six single-nucleotide polymorphisms (SNP) and one missense mutation were identified (*CRYAA* gene – SNP D2D, Y18Y and G137G; *CRYGC* gene – SNP G41G and S119S; *CRYGD* gene – SNP R95R and mutation Y134C), three of them unpublished (G137G, G41G and Y134C). In the *CRYGD* gene, the novel mutation Y134C proved to be potentially damaging for functioning of the γ D-crystallin protein.

SUMÁRIO

PÁG.

LISTA DE FIGURAS.....	xxiii
LISTA DE TABELAS E QUADROS.....	xxix
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xxxiii
1- INTRODUÇÃO.....	41
1.1- Revisão da literatura.....	41
1.1.1- Cristalino.....	41
1.1.2- Embriologia do cristalino.....	41
1.1.3- Histologia do cristalino.....	43
1.1.4- Baixa visão na infância.....	44
1.1.5- Catarata congênita.....	45
1.1.6- Etiologia da catarata congênita.....	46
1.1.7- Classificação da catarata congênita.....	46
1.1.7.1- Catarata polar anterior.....	47
1.1.7.2- Catarata polar posterior.....	50
1.1.7.3- Catarata nuclear.....	51
1.1.7.4- Catarata pulverulenta.....	52
1.1.7.5- Catarata lamelar.....	53
1.1.7.6- Catarata coraliforme.....	53
1.1.7.7- Catarata cortical.....	54
1.1.7.8- Catarata cerúlea.....	55
1.1.7.9- Catarata aceuliforme.....	55
1.1.7.10- Catarata sutural.....	56
1.1.7.11- Catarata total.....	57
1.1.8- Genética da catarata congênita.....	57
1.1.8.1- Proteínas cristalinas.....	58
1.1.8.1.1- Proteínas alfa-cristalinas.....	59
1.1.8.1.2- Proteínas beta/gama-cristalinas.....	60
1.1.8.2- Proteínas de Transporte de Membrana.....	63
1.1.8.2.1- Aquaporina 0 ou <i>MIP</i>.....	63
1.1.8.2.2- Conexinas.....	64
1.1.8.3- Proteínas do Citoesqueleto.....	67
1.1.8.3.1 - <i>BFSP2</i> ou <i>CP49</i>.....	67
1.1.8.4- Reguladores do Desenvolvimento.....	68

1.1.8.4.1– <i>PITX3</i>	68
1.1.8.4.2 – <i>MAF</i>	69
1.1.8.4.3 – <i>HSF4</i>	69
1.1.8.5- Mutação no Gene L-Ferritina.....	71
1.2. Justificativa.....	71
2- OBJETIVOS.....	72
2.1- Objetivo Geral.....	72
2.2- Objetivos Específicos.....	72
3- CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	73
3.1- Recrutamento de pacientes.....	73
3.2- Exame oftalmológico.....	73
3.3- Critérios de inclusão.....	74
3.4- Critérios de exclusão.....	74
3.5- Grupo Controle.....	74
3.6- Extração de DNA a Partir de Sangue Periférico.....	75
3.7- Análise dos Genes <i>CRYAA</i> , <i>CRYGC</i> e <i>CRYGD</i>	75
3.7.1- Reação em Cadeia da Polimerase.....	75
3.7.2- Sequenciamento Automático.....	77
3.8- Métodos Computacionais para Avaliação de Alterações do Tipo “Missense”.....	78
3.9- Famílias.....	79
3.9.1- Família 1.....	81
3.9.2- Família 2.....	82
3.9.3- Família 3.....	83
3.9.4- Família 4.....	84
3.9.5- Família 5.....	85
3.9.6- Família 6.....	86
3.9.7- Família 7.....	87
3.9.8- Família 8.....	87
3.9.9- Família 9.....	90
3.9.10- Família 10.....	90
4- RESULTADOS.....	92
4.1- Resultados do Sequenciamento Automatizado.....	92
4.1.1- Gene <i>CRYAA</i>	92
4.1.1.1- Identificação do SNP D2D (rs872331C>T).....	92
4.1.1.2- Identificação do SNP Y18Y(rs61729442C>T).....	94
4.1.1.3- Identificação do SNP G137G.....	95

4.1.2- Gene <i>CRYGC</i>	97
4.1.2.1- Identificação do SNP G41G.....	97
4.1.2.2- Identificação do SNP S119S (rs61736036C>T).....	98
4.1.3- Gene <i>CRYGD</i>	99
4.1.3.1- Identificação do SNP R95R (rs2305430A>G).....	99
4.1.3.2- Identificação da Mutação Y134C.....	101
5- DISCUSSÃO.....	103
6- CONCLUSÕES.....	106
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107
8 - FONTES CONSULTADAS.....	120
Anexo 1.....	121
Anexo 2.....	123
Anexo 3.....	125
Anexo 4.....	126
Anexo 5.....	127

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema ilustrativo do desenvolvimento embrionário do cristalino (modificado de Spalton, 2006).

Figura 2 - Corte histológico da superfície do cristalino, próximo ao equador, demonstrando a cápsula, o epitélio, as fibras cristalínicas e as fibras zonulares (modificado de Stafford, 2001)

Figura 3 - Catarata polar anterior (modificado de Amaya *et al.*, 2003).

Figura 4 - Catarata polar posterior (modificado de Francis *et al.*, 2000).

Figura 5 - Catarata nuclear (modificado de Zetterström *et al.*, 2005).

Figura 6 - Catarata pulverulenta (modificado de Amaya *et al.*, 2003)

Figura 7 - Catarata lamelar (modificado de Amaya *et al.*, 2003).

Figura 8 - Catarata coraliforme (modificado de Amaya *et al.*, 2003)

Figura 9 - Catarata cortical (modificado de Reddy *et al.*, 2004).

Figura 10 - Catarata cerúlea (modificado de Amaya *et al.*, 2003).

Figura 11 - Catarata aceuliforme (modificado de Reddy *et al.*, 2004).

Figura 12 - Catarata sutural (modificado de Zetterström *et al.*, 2005).

Figura 13 - Catarata total (modificado de Reddy *et al.*, 2004).

Figura 14 - Produto da PCR do éxon 3 do gene *CRYAA* após eletroforese em gel de agarose 1,5%.

Figura 15 - Heredograma da família 1, que apresenta um indivíduo portador de catarata congênita nuclear bilateral. Todos os indivíduos foram analisados.

Figura 16 - Heredograma da família 2, que apresenta um indivíduo portador de catarata congênita lamelar bilateral. Todos os indivíduos foram analisados.

Figura 17 - Heredograma da família 3, que apresenta dois indivíduos portadores de catarata congênita lamelar bilateral. Todos os indivíduos foram analisados.

Figura 18 - Catarata lamelar em olho direito do indivíduo I-2 da família 3.

Figura 19 - Heredograma da família 4, que apresenta um indivíduo portador de catarata congênita nuclear bilateral. Todos os indivíduos foram analisados.

Figura 20 - Heredograma da família 5, que apresenta um indivíduo portador de catarata congênita lamelar bilateral. Todos os indivíduos foram analisados.

Figura 21 - Heredograma da família 6, que apresenta um indivíduo portador de catarata congênita nuclear bilateral. O indivíduo marcado com asterisco não foi analisado.

Figura 22 - Heredograma da família 7, que apresenta um indivíduo portador de catarata congênita lamelar bilateral (II-1) e um indivíduo portador de catarata pulverulenta bilateral (I-1). Todos os indivíduos foram analisados.

Figura 23 - Heredograma da família 8, que apresenta indivíduos portadores de catarata congênita bilateral com os fenótipos lamelar (III-19, IV-5, IV-6 e IV-7) e pulverulento (II-11, III-6, III-21 e III-22). Os indivíduos marcados com asterisco não foram analisados.

Figura 24 - Heredograma da família 9, que apresenta dois indivíduos portadores de catarata congênita bilateral, um deles com fenótipo nuclear documentado em prontuário e outro operado em outro serviço oftalmológico. Todos os indivíduos foram analisados.

Figura 25 - Heredograma da família 10, que apresenta um indivíduo portador de catarata congênita lamelar bilateral. Todos os indivíduos foram analisados.

Figura 26 - Catarata lamelar em olho esquerdo do indivíduo II-1 da família 10.

Figura 27 - Sequenciamento direto do primeiro éxon de gene *CRYAA* (5' → 3'): **A:** Indivíduo homozigoto para o alelo C. **B:** Indivíduo homozigoto para o SNP D2D em homozigose. **C:** Indivíduo heterozigoto para o SNP D2D.

Figura 28 - Sequenciamento direto do primeiro éxon de gene *CRYAA* (5' → 3'): **A:** Indivíduo homozigoto para o alelo C. **B:** Indivíduo heterozigoto para o SNP Y18Y.

Figura 29 - Sequenciamento direto do terceiro éxon de gene *CRYAA* (5' → 3'): **A:** Indivíduo homozigoto para o alelo C. **B:** Indivíduo heterozigoto para o SNP G137G.

Figura 30 - Sequenciamento direto do segundo éxon de gene *CRYGC* (5' → 3'): **A:** Indivíduo homozigoto para o alelo C. **B:** Indivíduo heterozigoto para o SNP G41G.

Figura 31 - Sequenciamento direto do terceiro éxon de gene *CRYGC* (5'→3'): **A:** Indivíduo homozigoto para o alelo C. **B:** Indivíduo heterozigoto para o SNP S119S.

Figura 32 - Sequenciamento direto do terceiro éxon do gene *CRYGD* (5' → 3'): **A:** Indivíduo homozigoto para o alelo A. **B:** Indivíduo homozigoto para o SNP R95R em homozigose. **C:** Indivíduo heterozigoto para o SNP R95R.

Figura 33 - Sequenciamento direto do terceiro éxon do gene *CRYGD* (5' → 3'): **A:** Indivíduo homozigoto para o alelo A. **B:** Indivíduo heterozigoto para a mutação Y134C.

Figura 34 - Alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína gama-D-cristalina (códon 120-145) em diferentes espécies, demonstrando a alta conservação do resíduo 134.

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1 - Classificação das causas de deficiência visual ou cegueira na infância, de acordo com a localização anatômica afetada (modificado de Rahi, 2007 *apud* Gilbert *et al.*, 1993).

Tabela 2 - Classificação das causas de deficiência visual ou cegueira na infância, de acordo com os fatores etiológicos pela sua época de acometimento (modificado de Rahi, 2007 *apud* Gilbert *et al.*, 1993).

Tabela 3 - Mutações relacionadas à catarata congênita hereditária, descritas nos genes *CRYAA* e *CRYAB* (modificado de Santana, 2009).

Tabela 4 - Mutações relacionadas à catarata congênita hereditária, descritas nos genes *CRYBA1*, *CRYBB2*, *CRYGC*, *CRYGD* e *CRYGS* (modificado de Santana, 2009).

Tabela 5 - Mutações relacionadas à catarata congênita hereditária, descritas nos genes *CX46*, *CX50* e *MIP* (modificado de Santana, 2009).

Tabela 6 - Mutações relacionadas à catarata congênita hereditária, descritas no gene *BFSP2* (modificado de Santana, 2009).

Tabela 7 - Mutações relacionadas à catarata congênita hereditária, descritas nos genes *PITX3*, *MAF* e *HSF4* (modificado de Santana, 2009).

Tabela 8 - Sequências de oligonucleotídeos utilizados como “primers” na reação em cadeia da polimerase (PCR) dos genes *CRYAA*, *CRYGC* e *CRYGD*, tamanho dos fragmentos (pb) e temperaturas de anelamento (°C).

Tabela 9 – Dados clínico-oftalmológicos dos indivíduos analisados entre as famílias estudadas.

Tabela 10 – Indivíduos portadores do SNP D2D.

Tabela 11 – Indivíduos portadores do SNP Y18Y.

Tabela 12 – Indivíduos portadores do SNP G137G.

Tabela 13 – Indivíduos portadores do SNP G41G.

Tabela 14 – Indivíduos portadores do SNP S119S.

Tabela 15 – Indivíduos portadores do SNP R95R.

Tabela 16 – Indivíduos portadores da mutação Y134C.

Quadro 1 - Etiologia da catarata congênita (modificado de Santana, 2009 *apud* Arkin *et al.*, 1992).

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

α	alfa
β	beta
γ	gama
®	marca registrada
°C	grau Celsius
μg	micrograma
μL	microlitro
μm	micrômetro
A	aminoácido alanina
ACD	ácido citrato dextrose
AD	autossômico dominante
AQP0	Aquaporina 0
AR	autossômico recessivo
<i>BFSP</i>	“Beaded Filament Structural Protein”
<i>BFSP1</i>	“Beaded Filament Structural Protein 1”
<i>BFSP2, CP49</i>	“Beaded Filament Structural Protein 2”
C	aminoácido cisteína
<i>CRYAA</i>	alfa-A-cristalina
<i>CRYAB</i>	alfa-B-cristalina
<i>CRYBA1</i>	beta-A1-cristalina
<i>CRYBA2</i>	beta-A2-cristalina
<i>CRYBA3</i>	beta-A3-cristalina

<i>CRYBA4</i>	beta-A4-cristalina
<i>CRYGA</i>	gama-A-cristalina
<i>CRYGB</i>	gama-B-cristalina
<i>CRYGC</i>	gama-C-cristalina
<i>CRYGD</i>	gama-D-cristalina
<i>CRYGE</i>	gama-E-cristalina
<i>CRYGF</i>	gama-F-cristalina
<i>CRYGS</i>	gama-S-cristalina
<i>CX43, GJA1</i>	conexina 43
<i>CX46, GJA3</i>	conexina 46
<i>CX50, GJA8</i>	conexina 50
D	aminoácido ácido aspártico
dATP	desoxiadenosina trifosfato
dCTP	desoxicitosina trifosfato
del	deleção
dGTP	desoxiguanosina trifosfato
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
dTTP	desoxitimidina trifosfato
E	aminoácido ácido glutâmico
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
F	aminoácido fenilalanina
G	aminoácido glicina

H	aminoácido histidina
HCl	ácido clorídrico
<i>HSF4</i>	“Heat Shock Transcription Factor 4”
I	aminoácido isoleucina
ins	inserção
IRE	elemento responsivo ao ferro
KCl	cloreto de potássio
L	aminoácido leucina
<i>LFT</i>	“Lightferritin”
M	aminoácido metionina
<i>MAF</i>	“Avian Musculoaponeurotic Fibrosarcoma”
MgCl₂	cloreto de magnésio
<i>MIP, CP49</i>	proteína intrínseca maior
mL	mililitro
mM	milimolar
N	aminoácido asparagina
nm	nanômetro
Nd:YAG	“Neodymium-doped yttrium aluminum garnet”
OMIM	“Online Mendelian Inheritance in Man”
OMS	Organização Mundial de Saúde
P	aminoácido prolina
pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia da polimerase

pH	potencial hidrogeniônico
PITX3	“Paired-like Homeodomain Transcription Factor3”
pmol	picomol
Q	aminoácido glutamina
R	aminoácido arginina
rpm	rotações por minuto
rs	“assigned reference SNP”
RSB	“Reaction Stop Buffer”
S	aminoácido serina
SCH	síndrome de catarata associada à hiperferritinemia
SDS	dodecil sulfato de sódio
SNP	“Single Nucleotide Polymorphisms”
T	aminoácido treonina
Tab	tabela
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris-EDTA
TM	“trademark” (marca registrada)
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
U/μL	unidades por microlitro
V	aminoácido valina
X	códon de parada prematuro
W	aminoácido triptofano
Y	aminoácido tirosina

1. INTRODUÇÃO

1.1 - REVISÃO DA LITERATURA

1.1.1 – Cristalino

Trata-se de uma lente natural biconvexa, avascular e transparente localizada no segmento anterior do olho. É envolvido por uma cápsula, sendo composto por uma porção central compacta e por uma região periférica, denominadas núcleo e córtex, respectivamente. A deposição contínua de novas fibras cristalinianas ao longo da vida leva ao crescimento ininterrupto dessa estrutura (Coulombre & Coulombre, 1963; Duke-Elder & Wybar, 1961; Hogan *et al.*, 1971; Kanski, 2004).

A transparência do cristalino resulta da arquitetura adequada das suas células e do arranjo compactado das suas proteínas, possibilitando uma transmissão eficiente da luz com os comprimentos de onda entre 320 nm a 1200 nm (Hejtmancik, 2008; Trokel, 1962).

Cristalino e córnea são as principais estruturas responsáveis pelo poder refrativo do olho. O cristalino responde por cerca de 20% da refração total do olho, sendo responsável por um processo de focalização mais acurada das imagens na retina, denominado acomodação (Duke-Elder & Wybar, 1961; Hejtmancik, 2008).

1.1.2 – Embriologia do Cristalino

O cristalino se desenvolve a partir do ectoderma superficial após o contato entre o ectoderma e a vesícula óptica (Fig. 1A). O espessamento do ectoderma superficial no ponto de contato com a vesícula óptica dá origem, em torno da terceira semana de gestação, ao placóide cristaliniano (Fig. 1B) (Beby *et al.*, 2003; Duke-Elder & Wybar, 1961; Mann, 1961; Reddy *et al.*, 2004).

Entre o 22º e o 23º dias de gestação, como resultado da invaginação do placóide cristaliniano, forma-se a fosseta cristaliniana (Fig. 1C). Essa, ao se destacar do epitélio

superficial, origina a vesícula cristaliniana, que é envolvida por uma cápsula (Fig. 1E). As células anteriores permanecem como uma camada única de células epiteliais cubóides, enquanto as células posteriores sofrem alongamento e formam as fibras primárias do cristalino, obliterando o interior da vesícula (Fig. 1E) (Duke-Elder & Wybar, 1961; Mann, 1961; Reddy et al., 2004).

Por volta do final da quarta semana, a vesícula cristaliniana torna-se uma formação celular sólida, denominada núcleo embrionário do cristalino (Fig. 1F). Fibras cristalinianas secundárias, que são derivadas de células epiteliais anteriores do cristalino, depositam-se concentricamente em torno do núcleo embrionário com disposição semelhante a uma casca de cebola, dando origem ao núcleo fetal (Duke-Elder & Wybar, 1961; Mann, 1961; Reddy et al., 2004).

As suturas cristalinianas surgem no segundo mês de gestação nos polos anterior e posterior do núcleo embrionário como resultado da junção entre as terminações finais das fibras secundárias. Essas fibras são continuamente produzidas após o nascimento e são responsáveis pela formação do córtex cristaliniano no período pós-natal (Duke-Elder & Wybar, 1961; Kuszak, 1995; Mann, 1961; Reddy et al., 2004).

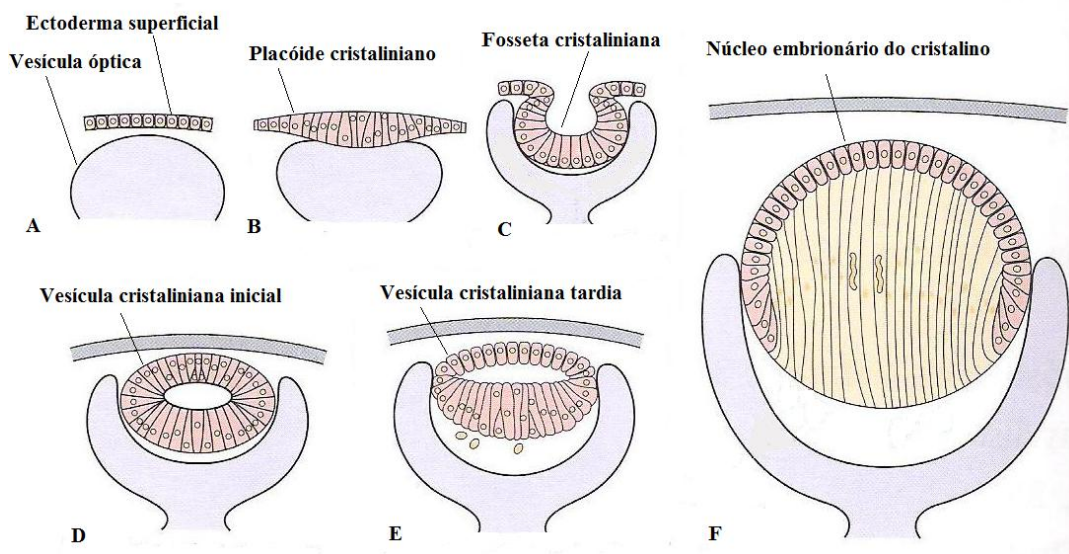


FIGURA 1: Esquema ilustrativo do desenvolvimento embrionário do cristalino (modificado de Spalton, 2006).

1.1.3 – Histologia do Cristalino

Na estrutura microscópica do cristalino, são observados cápsula, epitélio, fibras cristalinianas e fibras zonulares (Fig. 2).

A cápsula é uma membrana transparente, elástica e com espessura média entre 11 e 18 μm , envolvendo todo o cristalino. Tal estrutura é a membrana basal do epitélio cristaliniano, sendo sua porção anterior é mais espessa em relação à porção posterior (Salzmann, 1912).

O epitélio cristaliniano é formado por uma camada única de células cúbicas e estende-se por toda face anterior do cristalino até a zona equatorial. As células epiteliais tornam-se mais cilíndricas à medida que se aproximam do equador (Fawcett, 1994).

As fibras cristalinianas constituem a “substância do cristalino”, apresentando disposição concêntrica e formato de prisma de seis faces (Weiss, 1988; Fawcett, 1994). As células epiteliais equatoriais se diferenciam para formar as fibras cristalinianas mais próximas do equador (Kuzsak *et al.*, 2004), justificando a semelhança entre os dois tipos celulares, inclusive com a presença das mesmas organelas (Hogan *et al.*, 1971). As proteínas cristalinas são o principal componente do citosol dessas células (Fawcett, 1994).

As fibras zonulares são originadas a partir do corpo ciliar. Essas estruturas são formadas por feixes de microfibrilas ricas em uma glicoproteína denominada fibrilina. Penetram na cápsula cristaliniana em uma região denominada lamela zonular, onde a cápsula se apresenta mais frouxa (Cotta-Pereira *et al.*, 1976; Sakai *et al.*, 1986).

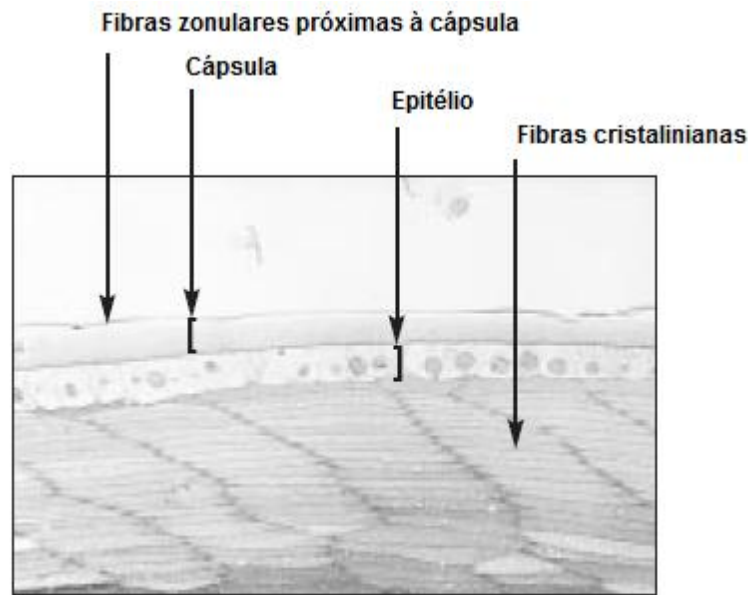


FIGURA 2: Corte histológico da superfície do cristalino, próximo ao equador, demonstrando a cápsula, o epitélio, as fibras cristalínicas e as fibras zonulares (modificado de Stafford, 2001).

1.1.4 – Baixa visão na infância

O desenvolvimento visual normal depende de boas condições anatômicas e fisiológicas. Até o total estabelecimento da acuidade visual, qualquer obstáculo à formação de uma imagem clara em ambos os olhos, como catarata, estrabismo, anisometropia ou ptose palpebral, podem levar a um mau desenvolvimento do córtex visual, que se tornará irreversível se não for tratado em tempo útil. Ambliopia é o termo utilizado quando não há um adequado desenvolvimento da visão por causa desses problemas (Graziano & Leone, 2005).

A acuidade visual de recém-nascidos se desenvolve muito rapidamente durante os primeiros três meses de vida. Até 3-4 anos, acredita-se que o sistema visual esteja totalmente desenvolvido, podendo ainda pode ser moldado até 8 a 10 anos (Graziano & Leone, 2005).

Em crianças com deficiência visual, o desenvolvimento motor e a capacidade de comunicação são prejudicados. Dessa forma, o diagnóstico precoce de doenças, o tratamento eficaz e um programa de estimulação visual precoce podem permitir às crianças uma maior interação com o meio ambiente, principalmente nos primeiros três meses de vida (Graziano & Leone, 2005).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda uma metodologia padronizada para classificar as causas de cegueira na infância com base no local anatômico afetado e na etiologia de base, disponível na tabela 1 (Gilbert *et al.*, 1993).

1.1.5 – Catarata Congênita

Catarata congênita é definida pela presença de opacidade no cristalino ao nascimento ou na primeira década de vida (Duke-Elder, 1964; Marner *et al.*, 1989). Trata-se da principal causa de cegueira reversível na infância (Gralek *et al.*, 2007; Santana *et al.*, 2009).

No mundo, a catarata congênita responde por aproximadamente 10 % dos casos de cegueira na infância (Francis *et al.*, 2000). No Brasil, estudos demonstram a prevalência dessa afecção em torno de 0,07 a 0,11% (Couto Júnior *et al.*, 2007; Schimiti *et al.*, 2001), podendo alcançar de 13 a 22% dos casos em serviços oftalmológicos terciários de referência (Haddad *et al.*, 2006; Kara-José *et al.*, 1984; Lucas *et al.*, 2003). A cada ano, 20.000 a 40.000 novos casos dessa doença são diagnosticados no mundo (Apple *et al.*, 2000).

O tratamento da catarata congênita depende da intensidade da opacidade. Nos casos em que é possível a visualização da retina e dos grandes vasos, o tratamento conservador pode ser considerado. Por outro lado, nas situações em que a opacidade dificulta a avaliação fundoscópica, o desenvolvimento de ambliopia é muito provável, e o tratamento cirúrgico deve ser cogitado (Duke-Elder, 1964; Roche *et al.*, 2006; Zetterström *et al.*, 2005).

Quando há indicação de tratamento cirúrgico, a abordagem deve ser realizada o mais cedo possível, preferencialmente nas primeiras semanas de vida. Nos casos unilaterais, a cirurgia precoce, a correção rápida da afacia no olho operado e o tratamento oclusivo agressivo no olho sadio são muito importantes para evitar a ambliopia (Zetterström *et al.*, 2005).

1.1.6 – Etiologia da Catarata Congênita

A catarata congênita pode apresentar diversas causas, incluindo infecções intra-uterinas, desordens metabólicas e anormalidades cromossômicas (Duke-Elder, 1964; Lambert & Drack, 1996). A doença pode ser herdada como anormalidade ocular isolada ou fazer parte de uma síndrome (Francis *et al.*, 2000), entre as quais síndrome de Down, doença de Wilson e distrofia miotônica (He & Li, 2000).

A maior parte dos pacientes com catarata congênita não-sindrômica isolada não têm qualquer causa identificável para a doença. A mutação genética é provavelmente a causa mais comum, especialmente para catarata bilateral. Embora os agentes teratogênicos (por exemplo, rubéola) possam ser responsáveis por uma proporção de casos, tais insultos normalmente dão origem a malformações sistêmicas, além da catarata (Reddy *et al.*, 2004).

Os casos de catarata congênita unilateral não são geralmente associados com doença sistêmica e raramente são hereditários, sendo a maior parte de causa idiopática (Zetterström *et al.*, 2005).

1.1.7 – Classificação da Catarata Congênita

Existem algumas formas de classificação para a catarata congênita. Alguns autores classificam a doença de acordo com o fator etiológico (Hiles & Carter, 1977). Entretanto, o sistema de classificação que considera a morfologia, a densidade, o tamanho e a localização da opacidade no cristalino parece ser o mais confiável e reprodutível (Foster

et al., 2006). Esses parâmetros podem ser úteis para a determinação do prognóstico visual dos pacientes afetados pela doença (Lambert & Drack, 1996; Amaya *et al.*, 2003).

1.1.7.1 – Catarata Polar Anterior

A catarata polar anterior é uma discreta opacidade situada no polo anterior do cristalino (Fig. 3) (Duke-Elder, 1972; Reddy *et al.*, 2004). Esse tipo de catarata mede entre 0,5 – 2 mm, usualmente não progride ao longo do tempo e normalmente não afeta a visão. Cerca de 90% dos casos são unilaterais, sendo os casos bilaterais comumente assimétricos (Lambert & Drack, 1996).

Os casos de catarata polar anterior frequentemente têm origem hereditária, mesmo aqueles isolados. Alterações em diferentes cromossomos podem determinar o mesmo fenótipo dessa opacidade (Amaya *et al.*, 2003).

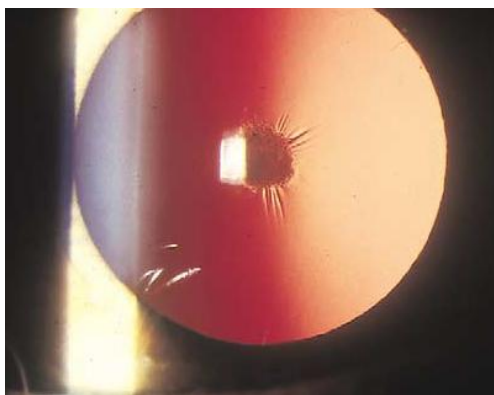


FIGURA 3: Catarata polar anterior (modificado de Amaya *et al.*, 2003).

TABELA 1: Classificação das causas de deficiência visual ou cegueira na infância, de acordo com a localização anatômica afetada (modificado de Rahi, 2007 *apud* Gilbert *et al.*, 1993).

Localização anatômica afetada
<i>Globo ocular e segmento anterior</i>
Microftalmia / anoftalmia
Disgenesia do segmento anterior
Coloboma de múltiplos sítios
Outros
<i>Glaucoma</i>
Primário
Secundário
<i>Córnea</i>
Esclerocórnea
Ceratomalácia
Outras cicatrizes corneanas
<i>Cristalino</i>
Catarata
Afacia
Subluxação
<i>Úvea</i>
Anidíria
Uveíte
Coloboma de sítio único
<i>Retina</i>
Retinopatia da prematuridade
Distrofias retinianas e maculares
Albinismo oculo-cutâneo
Retinite/neuroretinite
Descolamento de retina
Retinoblastoma
Outros
<i>Nervo óptico</i>
Hipoplasia
Atrofia (primária ou secundária)
Neurite/neuropatia
Outros
<i>Cerebral/vias ópticas</i>
Desordens neuro-degenerativas
Encefalopatia hipóxico-isquêmica
Lesão não-acidental
Infecção
Anormalidades estruturais
Tumores
Outros
<i>Outros</i>
Nistagmo idiopático
Altas ametropias

TABELA 2: Classificação das causas de deficiência visual ou cegueira na infância, de acordo com os fatores etiológicos pela sua época de acometimento (modificado de Rahi, 2007 *apud* Gilbert *et al.*, 1993).

Fator etiológico pela época de acometimento
<i>Pré-natal</i>
Hereditário
Autossômico recessivo, autossômico dominante,
Ligado ao X
Cromossômico
Hipóxia/isquemia
Infecção
Drogas
Outros
Fator presumido, mas desconhecido
<i>Perinatal/neonatal</i>
Hipóxia/isquemia
Infecção
Lesão não-acidental
Outros
Fator presumido, mas desconhecido
<i>Infância</i>
Tumor
Nutricional
Infecção
Hidrocefalia/aumento da pressão intracraniana
Hipóxia /isquemia
Lesão não-acidental
Lesão accidental
Desordens sistêmicas específicas
Fator presumido, mas desconhecido
<i>Época indeterminada de lesão e fatores desconhecidos</i>

QUADRO 1: Etiologia da catarata congênita (modificado de Santana, 2009 *apud* Arkin *et al.*, 1992).

Idiopática	Síndrome de Conradi
Catarata hereditária, sem doença sistêmica	Galactosemia
Autossômica dominante	Hipoglicemia
Autossômica recessiva	Insuficiência renal
Ligada ao X	Hipocalcemia
Causas genéticas, metabólicas e sistêmicas	Distrofia miotônica
Síndrome de Hallerman-Steiff	Hipoparatireoidismo
Síndrome óculo-cerebro-renal de Lowe	Pseudohipoparatireoidismo
Síndrome de Sjögren	Diabetes melito
Síndrome de Smith-Lemli-Opitz	Doença peroxisomal
Síndrome de Pierre Robin	Doença de Wilson
Doença de Crouzon	Infecção materna
Síndrome de Apert	Rubéola
Síndrome de Rubinstein-Taybi	Citomegalovírus
Síndrome de Bloch-Sulzberger	Varicela
Síndrome de Marshall	Sífilis
Síndrome de Cockayne	Toxoplasmose
Doença de Refsum	Herpes simples
Síndrome de Down	Anomalias oculares
Síndrome de Edward	Aniridia
Síndrome de Turner	Disgenesia mesenquimal de segmento anterior
Síndrome de Patau	Microftalmia
Síndrome de Alport	Vasculatura fetal persistente
Síndrome de Marfan	Retinite pigmentar
Doença de Fabry	Colobomas

1.1.7.2 – Catarata Polar Posterior

Neste tipo de catarata, a opacidade está presente no polo posterior do cristalino (Fig. 4). Tanto formas estacionárias quanto progressivas têm sido relatadas. Esse fenótipo comumente se apresenta de forma simétrica e é facilmente identificado ao nascimento (Duke-Elder, 1964; Reddy *et al.*, 2004). Em razão da sua maior proximidade com a mácula, mesmo uma catarata polar posterior pequena pode afetar a visão (Lambert & Drack, 1996).

O tratamento cirúrgico da catarata polar posterior deve ser realizado com cautela em virtude da maior predisposição à ruptura da cápsula posterior nesses casos. A excessiva aderência entre a opacidade e a cápsula posterior e uma menor espessura da cápsula posterior parecem explicar essa maior fragilidade (Vasavada & Singh, 1999; Osher *et al.*, 1990).

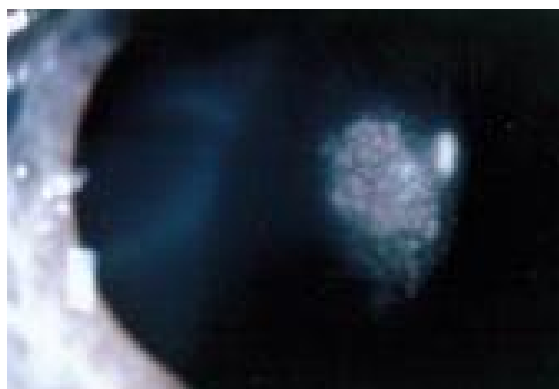


FIGURA 4: Catarata polar posterior (modificado de Francis *et al.*, 2000).

1.1.7.3 – Catarata Nuclear

O termo catarata nuclear é utilizado para descrever a opacificação cristaliniana que acomete o núcleo fetal e/ou embrionário. Esse fenótipo pode se apresentar desde pequenos pontos até opacidades confluentes no núcleo (Fig. 5). A necessidade de intervenção cirúrgica depende da natureza da opacificação. Casos mais leves podem não necessitar de tratamento (Amaya *et al.*, 2003; Duke-Elder, 1972; Reddy *et al.*, 2004).

A catarata nuclear normalmente está presente ao nascimento e não é progressiva (Zetterström *et al.*, 2005). A apresentação usual é bilateral (Duke-Elder, 1972). Esse tipo de opacidade é a forma mais comum de catarata com herança autossômica dominante (Amaya *et al.*, 2003).

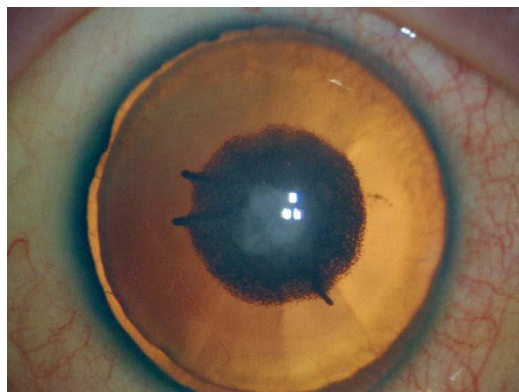


FIGURA 5: Catarata nuclear (modificado de Zetterström *et al.*, 2005).

1.1.7.4 – Catarata Pulverulenta

A catarata pulverulenta caracteriza-se pela presença de opacidades puntiformes com aspecto “pulverizado” (Fig. 6), apresentando normalmente ocorrência bilateral e raramente afetando a visão (Amaya *et al.*, 2003; Duke-Elder, 1972; Reddy *et al.*, 2004). Tem sido relatada herança autossômica dominante e recessiva para esse tipo de catarata. Nos casos de herança autossômica recessiva, a doença se apresenta mais tardiamente. As opacidades podem ser restritas tanto ao núcleo quanto às lamelas, fazendo com que alguns autores discriminem os subtipos “pulverulenta nuclear” e “pulverulenta lamelar” (Reddy *et al.*, 2004).



FIGURA 6: Catarata pulverulenta (modificado de Amaya *et al.*, 2003)

1.1.7.5 – Catarata Lamelar

A catarata lamelar ou zonular envolve uma ou mais lamelas do cristalino, sendo normalmente cercada por núcleo e córtex transparentes (Fig. 7). A opacidade pode ser importante a ponto de afetar gravemente a visão, mas pode permanecer subclínica por vários anos (Amaya *et al.*, 2003; Duke-Elder, 1972; Lambert & Drack, 2006; Zetterström *et al.*, 2005).

Esse tipo de catarata é usualmente progressivo, e a cirurgia é frequentemente realizada antes da idade escolar (Zetterström *et al.*, 2005). Entretanto, muitos casos podem ser conduzidos conservadoramente, sem necessidade de cirurgia na infância. O prognóstico visual, especialmente nas formas tênues de catarata lamelar, é provavelmente melhor quando comparado com vários outros tipos morfológicos. A forma de herança mais comum é autossômica dominante. Existe uma marcante variabilidade interocular e intrafamiliar na apresentação desse fenótipo (Amaya *et al.*, 2003).

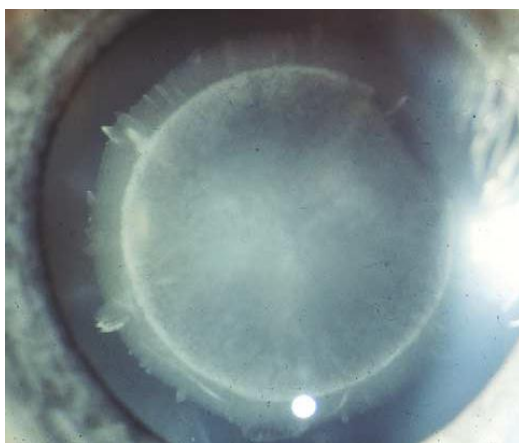


FIGURA 7: Catarata lamelar (modificado de Amaya *et al.*, 2003).

1.1.7.6 – Catarata Coraliforme

A catarata coraliforme ou cristalina é uma opacidade cristalínica central rara e complexa (Gunn, 1895). É formada por fusos que se irradiam a partir do centro do

cristalino e poupam a cápsula. Esse fenótipo geralmente se apresenta de forma bilateral e não afeta a visão. Pode apresentar herança autossômica dominante (Amaya *et al.*, 2003).

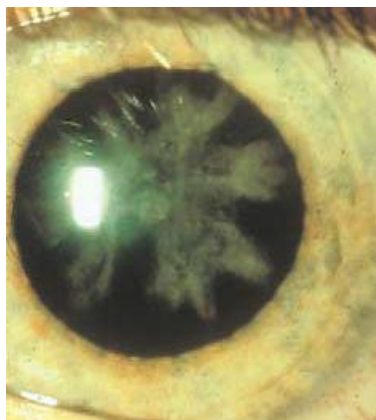


FIGURA 8: Catarata coraliforme (modificado de Amaya *et al.*, 2003)

1.1.7.7 – Catarata Cortical

Esta forma de catarata hereditária é rara e afeta a porção externa do córtex cristalino adjacente à cápsula anterior (Fig. 9). Representa um insulto tardio às fibras secundárias recém-formadas. Normalmente, as outras regiões do cristalino são transparentes, incluindo o eixo visual, tornando o prognóstico desse fenótipo excelente (Duke-Elder, 1961; Reddy *et al.*, 2004).

Em algumas famílias que apresentam a catarata cortical, observa-se o padrão de herança autossômica dominante. Quando ocorre o aparecimento da doença no período pós-natal, a deficiência visual pode acontecer após a infância (Amaya *et al.*, 2003).



FIGURA 9: Catarata cortical (modificado de Reddy *et al.*, 2004).

1.1.7.8 – Catarata Cerúlea

A catarata cerúlea é uma forma distinta de opacidade cristaliniana, com aspecto colorido e rara beleza à lâmpada de fenda. Além dos padrões azulado e esverdeado, outras cores podem ser vistas, incluindo vermelho, marrom e branco. As opacidades apresentam dimensões e formas variáveis, concentrando-se perifericamente no córtex da região equatorial do cristalino (Fig. 10) (Amaya *et al.*, 2003; Reddy *et al.*, 2004; Vogt, 1922).

Esse tipo de catarata não está presente ao nascimento, mas se desenvolve na infância e progride precocemente ao longo da vida. Frequentemente, a cirurgia não é necessária até a idade adulta. O padrão de herança mais comumente observado é autossômico dominante (Amaya *et al.*, 2003; Reddy *et al.*, 2004).

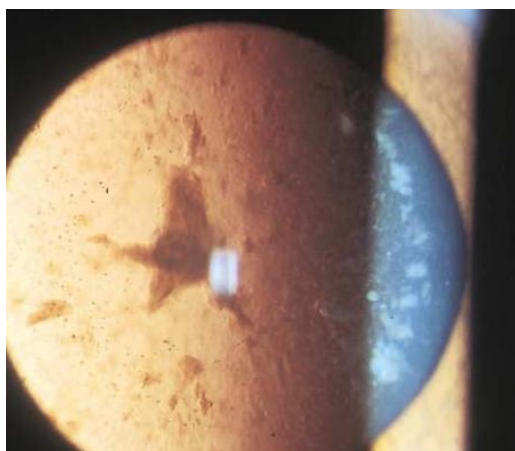


FIGURA 10: Catarata cerúlea (modificado de Amaya *et al.*, 2003).

1.1.7.9 – Catarata Aceuliforme

Esta forma rara de catarata congênita está associada a projeções em forma de agulha (Fig. 11), estendendo-se do núcleo para as porções anterior e posterior do córtex (Vogt, 1922). Também tem sido chamada de catarata "em forma de agulha". Pode haver sobreposição deste fenótipo com a catarata coraliforme (Reddy *et al.*, 2004).



FIGURA 11: Catarata aceuliforme (modificado de Reddy *et al.*, 2004).

1.1.7.10 – Catarata Sutural

A catarata sutural é relativamente comum e não afeta a visão. Normalmente, essa opacidade é um achado casual em exames de rotina. Seu aspecto varia desde o aumento da densidade das suturas até a presença de opacidades puntiformes em torno das suturas (Fig. 12). Apresenta-se de forma bilateral e não progressiva (Duke-Elder, 1972). Raramente, ocorre sem outras opacidades cristalínias concomitantes, tais como nuclear, pulverulenta, cerúlea e lamelar. Pode apresentar herança autossômica dominante ou recessiva ligada ao X (Amaya *et al.*, 2003; Reddy *et al.*, 2004).



FIGURA 12: Catarata sutural (modificado de Zetterström *et al.*, 2005).

1.1.7.11 – Catarata Total

A catarata total é definida como a completa opacificação do núcleo fetal ao nascimento e do córtex após o nascimento (Fig. 13) (Duke-Elder, 1972). Indivíduos com esse tipo de opacidade necessitam de cirurgia precocemente. A forma de herança mais frequente é ligada ao X, sendo rara a herança autossômica dominante (Reddy *et al.*, 2004).

Essa forma de catarata se apresenta bilateralmente e pode evoluir a partir dos fenótipos nuclear e lamelar (Amaya *et al.*, 2003).



FIGURA 13: Catarata total (modificado de Reddy *et al.*, 2004).

1.1.8 – Genética da Catarata Congênita

Em torno de 8,3 a 25% das cataratas congênitas têm etiologia hereditária. A doença pode ocorrer isoladamente ou em associação com grande número de síndromes genéticas e doenças metabólicas. As cataratas congênitas isoladas tendem a apresentar alta penetrância, sendo herdadas mais comumente de maneira autossômica dominante. As formas de herança autossômica recessiva e ligada ao X também podem ocorrer nessa afecção, embora sejam menos comuns (Lambert & Drack, 1996; He & Li, 2000; Hejtmancik, 2008; Shiels & Hejtmancik, 2007).

Mutações de sentido errado (ou *missense*) e sem sentido (ou *nonsense*) têm sido descritas em associação com catarata congênita (Reddy *et al.*, 2004; Santana *et al.*, 2009). Diferentemente dos polimorfismos, as mutações são encontradas em menos de 1% da

população humana e geralmente estão associadas com repercussões clínicas (Thompson & Thompson, 1973).

Fenótipos idênticos de catarata congênita podem resultar de mutações em diferentes genes com formas de herança variáveis, enquanto fenótipos diferentes podem ser encontrados em uma mesma família. Isso sugere que outros genes ou fatores ambientais podem modificar a expressão de uma mutação primária associada com catarata (Amaya *et al.*, 2003; Lambert & Drack, 1996; He & Li, 2000; Hejtmancik, 2008; Shiels & Hejtmancik, 2007).

Entre os *loci* gênicos mapeados para catarata congênita isolada, mais de 20 têm sido associados com mutações em genes específicos. Nas famílias com catarata congênita em que o gene mutante é conhecido, cerca de 50% das mutações são descritas nos genes que codificam as proteínas cristalinas, em torno de 25% têm mutações nos genes que codificam as proteínas conexinas, e o restante das mutações é dividido, na maior parte, entre os genes que codificam aquaporina 0 (AQP0) ou proteína intrínseca maior (MIP), genes que codificam *Heat Shock Transcription Factor 4* (HSF4) e genes que codificam *Beaded Filament Structural Protein 2* (BFSP2) (Shiels & Hejtmancik, 2007).

1.1.8.1– Proteínas Cristalinas

As proteínas cristalinas são os maiores constituintes do cristalino de vertebrados. Constituem aproximadamente 90 % das proteínas cristalínianas solúveis em água. Essas proteínas são bastante estáveis e apresentam um arranjo espacial particular, contribuindo para a transparência do cristalino (He & Li, 2000; Reddy *et al.*, 2004).

Os genes que codificam as proteínas cristalinas são, portanto, considerados óbvios candidatos para a catarata congênita com base nos seus altos níveis de expressão no cristalino e nas suas funções de manutenção da transparência dessa estrutura. Evidências crescentes sugerem a correlação de mutações nesses genes com a ocorrência de catarata congênita em humanos (He & Li, 2000).

1.1.8.1.1 – Proteínas Alfa-cristalinas

Esse grupo de proteínas inclui os subtipos alfa-A-cristalina e alfa-B-cristalina. Além de serem consideradas proteínas estruturais, essas moléculas apresentam atividade “chaperone-like” e são membros da família “small heat-shock protein” (He & Li, 2000; Reddy *et al.*, 2004). Em humanos, as proteínas alfa-cristalinas são codificadas por dois genes estreitamente relacionados, *CRYAA* e *CRYAB* (He & Li, 2000).

Nas cataratas com padrão de herança dominante e com mutações “missense” relacionadas às proteínas alfa-A-cristalinas, sugere-se que a proteína alfa-A-cristalina mutante exerça um efeito deletério que danifica ativamente as fibras cristalinianas ou iniba a função das proteínas normais remanescentes. Nas cataratas com padrão de herança recessiva, parece haver perda da atividade “chaperone-like”. Como as proteínas alfa-A e alfa-B-cristalinas funcionam de forma semelhante *in vitro*, pode-se esperar que mutações associadas às proteínas alfa-B-cristalinas tenham um efeito semelhante ao das proteínas alfa-A-cristalinas, pelo menos no cristalino (Hejtmancik, 2008).

As proteínas alfa-cristalinas parecem exercer algum papel no desenvolvimento normal do segmento anterior do olho, embora de maneira inespecífica. Qualquer perturbação na formação do cristalino pode ocasionar outras consequências no desenvolvimento ocular, tais como microcórnea e microftalmia (Reddy *et al.*, 2004).

Atualmente, são conhecidas nove mutações no gene *CRYAA* e seis mutações no gene *CRYAB*. As mutações já descritas nos genes que codificam as proteínas alfa-cristalinas estão disponíveis na tabela 3.

TABELA 3: Mutações relacionadas à catarata congênita hereditária, descritas nos genes *CRYAA* e *CRYAB* (modificado de Santana, 2009).

Gene	Locus	Mutação	Proteína	Fenótipo	Modo de transmissão	Referências
<i>CRYAA</i>	21q22.3	R116C	α A-cristalina	Catarata nuclear + Microcórnea + Microftalmia	AD	Litt <i>et al.</i> (1998)
<i>CRYAA</i>	21q22.3	W9X	α A-cristalina	-----	AR	Pras <i>et al.</i> (2000)
<i>CRYAA</i>	21q22.3	R49C	α A-cristalina	Catarata lamelar	AD	Litt <i>et al.</i> (1998)
<i>CRYAA</i>	21q22.3	G98R	α A-cristalina	Catarata total	AD	Santhiya <i>et al.</i> (2006)
<i>CRYAA</i>	21q22.3	R21L	α A-cristalina	Catarata nuclear	AD	Santhiya <i>et al.</i> (2006)
<i>CRYAA</i>	21q22.3	R12C	α A-cristalina	Catarata polar e lamelar	AD	Hansen <i>et al.</i> (2007)
<i>CRYAA</i>	21q22.3	R21W	α A-cristalina	-----	AD	Hansen <i>et al.</i> (2007)
<i>CRYAA</i>	21q22.3	R116H	α A-cristalina	Catarata nuclear	AD	Hansen <i>et al.</i> (2007)
<i>CRYAA</i>	21q22.3	R54C	α A-cristalina	Catarata nuclear + Microcórnea + Microftalmia	AD	Devi <i>et al.</i> (2008)
				Catarata total + Microcórnea	AR	Khan <i>et al.</i> (2007)
<i>CRYAB</i>	11q22.3-q23.1	450delA	α B-cristalina	Catarata polar posterior	AD	Berry <i>et al.</i> (2001)
<i>CRYAB</i>	11q22.3-q23.1	A171T	α B-cristalina	Catarata lamelar	AD	Devi <i>et al.</i> (2008)
<i>CRYAB</i>	11q22.3-q23.1	R11H	α B-cristalina	Catarata nuclear	AD	Chen <i>et al.</i> (2009)
<i>CRYAB</i>	11q22.3-q23.1	P20S	α B-cristalina	Catarata polar posterior	AD	Liu <i>et al.</i> (2006)
<i>CRYAB</i>	11q22.3-q23.1	D140N	α B-cristalina	Catarata lamelar	AD	Liu <i>et al.</i> (2006)
<i>CRYAB</i>	11q22.3-q23.1	R56W	α B-cristalina	Catarata total, Catarata nuclear, Catarata cortical	AR	Safieh <i>et al.</i> (2009)

AD: Autossômica Dominante; AR: Autossômica Recessiva

1.1.8.1.2 – Proteínas Beta/Gama-cristalinas

As proteínas beta/gama-cristalinas são reconhecidas como membros de uma superfamília de proteínas. Esses polipeptídeos apresentam em comum um modelo de estabilidade proteica denominado “Greek key” (He & Li, 2000). As proteínas gama-

cristalinas são encontradas na forma de monômeros, enquanto as beta-cristalinas se associam em complexos de alta ordem. Espera-se que a maioria das mutações descritas nos genes que codificam as proteínas beta/gama-cristalinas causem alterações importantes na estrutura da proteína, resultando em moléculas instáveis, com maior tendência à precipitação e à eventual formação de catarata. Esse mecanismo tem sido demonstrado para um número razoável de cataratas hereditárias (Hejtmancik, 2008; Reddy *et al.*, 2004).

A família das proteínas beta-cristalinas consiste de quatro formas ácidas (β A1-cristalina, β A2-cristalina, β A3-cristalina, β A4-cristalina) e três formas básicas (β B1-cristalina, β B2-cristalina, β B3-cristalina). Os genes *CRYBA1* e *CRYBA3*, que codificam as proteínas β A1-cristalina e β A3-cristalina, respectivamente, estão localizados no cromossomo 17 (17q11.2-q12). O gene *CRYBA2*, codificador da proteína β A2-cristalina, localiza-se no cromossomo 2 (2q33-q35). O gene *CRYBA4*, que codifica a proteína β A4-cristalina, e os genes *CRYBB1*, *CRYBB2* e *CRYBB3*, codificadores das proteínas β B1-cristalina, β B2-cristalina, β B3-cristalina, respectivamente, estão localizados no cromossomo 22 (22q11.2-q13.1 e 22q11.2-q13.1). Seis genes que codificam as proteínas gama-cristalinas podem ser agrupados em dois grupos, localizados no cromossomo 2 (2q33-36): *CRYGA/CRYGB/CRYGC* e *CRYGD/CRYGE/CRYGF*. O gene *CRYGS* está localizado no cromossomo 3 (3q26.3-qter) (He & Li, 2000). Atualmente, são conhecidas duas mutações no gene *CRYBA1*, cinco no gene *CRYBB2*, sete no gene *CRYGC*, doze no gene *CRYGD* e uma no gene *CRYGS*. As mutações já descritas nos genes que codificam as proteínas beta/gama-cristalinas estão disponíveis na tabela 4.

TABELA 4: Mutações relacionadas à catarata congênita hereditária, descritas nos genes *CRYBA1*, *CRYBB2*, *CRYGC*, *CRYGD* e *CRYGS* (modificado de Santana, 2009).

Gene	Locus	Mutação	Proteína	Fenótipo	Modo de transmissão	Referências
<i>CRYBA1</i>	17q11.2-q12	IVS3+IG → A	βA3/A1-cristalina	Catarata nuclear, sutural, pulverulenta	AD	Padma <i>et al.</i> (1995) Kannabiran <i>et al.</i> (1998)
<i>CRYBA1</i>	17q11.2-q12	c. 271-273delGGA	βA3/A1-cristalina	-----	AD	Reddy <i>et al.</i> (2004)
<i>CRYBB2</i>	22q11.23	Q155X	βB2-cristalina	Catarata cerúlea progressiva, nuclear, sutural	AD	Litt <i>et al.</i> (1997) Gill <i>et al.</i> (2000)
<i>CRYBB2</i>	22q11.23	D128V	βB2-cristalina	-----	AD	Pauli <i>et al.</i> (2007)
<i>CRYBB2</i>	22q11.23	W151C	βB2-cristalina	Catarata nuclear	AD	Santhiya <i>et al.</i> (2004)
<i>CRYBB2</i>	22q11.23	V187M	βB2-cristalina	Catarata nuclear	AD	Mothobi <i>et al.</i> (2009)
<i>CRYBB2</i>	22q11.23	W59C	βB2-cristalina	Catarata total	AD	Santhiya <i>et al.</i> (2010)
<i>CRYGC</i>	2q33-q35	T5P	γC-cristalina	Catarata lamelar, pulverulenta	AD	Heon <i>et al.</i> (1999)
<i>CRYGC</i>	2q33-q35	225-226insGCGGC	γC-cristalina	Catarata nuclear, pulverulenta	AD	Heon <i>et al.</i> (1999)
<i>CRYGC</i>	2q33-q35	R168W	γC-cristalina	Catarata lamelar	AD	Santhiya <i>et al.</i> (2002)
<i>CRYGC</i>	2q33-q35	C109X	γC-cristalina	Catarata nuclear	AD	Yao <i>et al.</i> (2008)
<i>CRYGC</i>	2q33-q35	W157X	γC-cristalina	Catarata nuclear + Microcórneia	AD	Zhang <i>et al.</i> (2009)
<i>CRYGC</i>	2q33-q35	R48H	γC-cristalina	Catarata lamelar, Catarata nuclear	-----	Kumar <i>et al.</i> (2011)
<i>CRYGC</i>	2q33-q35	G129C	γC-cristalina	Catarata nuclear	AD	Li <i>et al.</i> (2012)
<i>CRYGD</i>	2q33-q35	R58H	γD-cristalina	Catarata lamelar	AD	Heon <i>et al.</i> (1999)
<i>CRYGD</i>	2q33-q35	R14C	γD-cristalina	Catarata punctata juvenil progressiva	AD	Stephan <i>et al.</i> (1999)
<i>CRYGD</i>	2q33-q35	Y134X	γD-cristalina	Catarata total	AD	Hansen <i>et al.</i> (2007)
<i>CRYGD</i>	2q33-q35	E107A	γD-cristalina	Catarata nuclear	AD	Messina-Bass <i>et al.</i> (2006)
<i>CRYGD</i>	2q33-q35	W156X	γD-cristalina	Catarata nuclear	AD	Reddy <i>et al.</i> (2004)

CRYGD	2q33-q35	P23T	γ D-cristalina	Catarata lamelar	AD	Santhiya <i>et al.</i> (2002)
CRYGD	2q33-q35	R36S	γ D-cristalina	Catarata coraliforme	AD	Kmoch <i>et al.</i> (2000)
CRYGD	2q33-q35	R15S	γ D-cristalina	Catarata coraliforme	AD	Zhang <i>et al.</i> (2009)
CRYGD	2q33-q35	c.494delG	γ D-cristalina	Catarata nuclear	AD	Zhang <i>et al.</i> (2007)
CRYGD	2q33-q35	G61C	γ D-cristalina	Catarata corliforme	AD	Li <i>et al.</i> (2008)
CRYGD	2q33-q35	R77S	γ D-cristalina	Catarata polar anterior	AD	Roshan <i>et al.</i> (2010)
CRYGD	2q33-q35	W43R	γ D-cristalina	Catarata nuclear	AD	Wang <i>et al.</i> (2011)
CRYGS	3q26.3-qter	V42M	γ S-cristalina	Catarata nuclear	AD	Vanita <i>et al.</i> (2009)

AD: Autossômica dominante

1.1.8.2– Proteínas de Transporte de Membrana

A transparência do cristalino é resultado direto da sua arquitetura altamente ordenada. A manutenção dessa estrutura depende do controle da hidratação e do volume das células cristalinianas. A maioria dessas células depende da glicólise anaeróbica para satisfazer suas necessidades energéticas. Entretanto, as fibras profundas do cristalino não podem receber a nutrição adequada por difusão passiva, tornando-se dependentes de um eficiente sistema de transporte para fornecer nutrientes e remover metabólitos para a superfície do cristalino (Reddy *et al.*, 2004).

1.1.8.2.1 – Aquaporina 0 ou “Major Intrinsic Protein”

A proteína de transporte de membrana mais abundante no cristalino maduro é a Aquaporina 0 (AQP0) ou “Major Intrinsic Protein” (MIP). Trata-se de uma proteína da família das aquaporinas, expressa somente nas fibras cristalinianas diferenciadas, que são as células predominantes no cristalino (Hejtmancik, 2008; Reddy *et al.*, 2004).

A AQP0 tem fraca atividade dos canais de água em pH neutro. Entretanto, essa atividade aumenta para níveis típicos das aquaporinas em pH 6,5 e em baixas concentrações

de cálcio, que são condições próximas às encontradas no cristalino. Cataratas lamelares e polimórficas têm sido associadas com mutações “missense” no gene que codifica a AQP0 (MIP) (Hejtmancik, 2008).

Atualmente, são conhecidas dez mutações no gene *MIP*, que estão descritas na tabela 5.

1.1.8.2.2 – Conexinas

Uma característica do cristalino é possuir uma ampla rede de canais de baixa resistência tipo “gap junctions” entre as fibras cristalínias. Esses canais permitem o fluxo de íons, de segundos mensageiros e de metabólitos entre as células, preservando sua homeostase (Reddy *et al.*, 2004).

As proteínas estruturais pertencentes à família das conexinas compõem os canais intercelulares presentes entre as fibras cristalínias. Três genes distintos (*CX43*, *CX46*, e *CX50*) que codificam as proteínas conexinas são expressos no cristalino. Essas proteínas de transporte de membranas são importantes para o correto desenvolvimento embriológico do cristalino apesar dos baixos níveis de expressão (Reddy *et al.*, 2004).

Atualmente, são conhecidas dezessete mutações no gene *CX46* (*GJA3*) e dezoito no gene *CX50* (*GJA8*). As mutações nos genes que codificam as proteínas conexinas estão descritas na tabela 5.

TABELA 5: Mutações relacionadas à catarata congênita hereditária, descritas nos genes *CX46*, *CX50* e *MIP* (modificado de Santana, 2009).

Gene	Locus	Mutação	Proteína	Fenótipo	Modo de transmissão	Referências
<i>CX46 (GJA3)</i>	13q11-q13	N63S	Conexina 46	Catarata nuclear pulverulenta	AD	Mackay <i>et al.</i> (1997)
<i>CX46 (GJA3)</i>	13q11-q13	I136-I137insC	Conexina 46	Catarata nuclear pulverulenta	AD	Mackay <i>et al.</i> (1997)
<i>CX46 (GJA3)</i>	13q11-q13	P187L	Conexina 46	Catarata nuclear pulverulenta	AD	Rees <i>et al.</i> (2000)
<i>CX46 (GJA3)</i>	13q11-q13	D3Y	Conexina 46	Catarata nuclear pulverulenta	AD	Rees <i>et al.</i> (2000)
<i>CX46 (GJA3)</i>	13q11-q13	L11S	Conexina 46	Catarata nuclear pulverulenta	AD	Hansen <i>et al.</i> (2006)
<i>CX46 (GJA3)</i>	13q11-q13	F32L	Conexina 46	Catarata nuclear pulverulenta	AD	Jiang <i>et al.</i> (2003)
<i>CX46 (GJA3)</i>	13q11-q13	P59L	Conexina 46	Catarata nuclear pulverulenta	AD	Bennett <i>et al.</i> (2004)
<i>CX46 (GJA3)</i>	13q11-q13	R76G	Conexina 46	Catarata nuclear pulverulenta, Catarata total	AD	Devi <i>et al.</i> (2005)
<i>CX46 (GJA3)</i>	13q11-q13	V28M	Conexina 46	Catarata total, Catarata cortical posterior, Catarata subcapsular anterior	AD	Devi <i>et al.</i> (2005)
<i>CX46 (GJA3)</i>	13q11-q13	R76H	Conexina 46	Catarata nuclear pulverulenta	AD	Burdon <i>et al.</i> (2004)
<i>CX46 (GJA3)</i>	13q11-q13	N188T	Conexina 46	Catarata nuclear pulverulenta	AD	Li <i>et al.</i> (2004)
<i>CX46 (GJA3)</i>	13q11-q13	R33L	Conexina 46	Catarata lamelar pulverulenta	AD	Guleria <i>et al.</i> (2007)
<i>CX46 (GJA3)</i>	13q11-q13	T87M	Conexina 46	Catarata nuclear	AD	Guleria <i>et al.</i> (2007)
<i>CX46 (GJA3)</i>	13q11-q13	T19M	Conexina 46	Catarata polar posterior	AD	Santhiya <i>et al.</i> (2010)
<i>CX46 (GJA3)</i>	13q11-q13	V44M	Conexina 46	Catarata nuclear	AD	Zhou <i>et al.</i> (2010)
<i>CX46 (GJA3)</i>	13q11-q13	G143R	Conexina 46	Catarata pulverulenta	AD	Zhang <i>et al.</i> (2012)
<i>CX46 (GJA3)</i>	13q11-q13	N188I	Conexina 46	Catarata Coraliforme	AD	Zhang <i>et al.</i> (2012)
<i>CX50 (GJA8)</i>	1q21.1	P88S	Conexina 50	Catarata nuclear pulverulenta	AD	Shiels <i>et al.</i> (1998)
<i>CX50 (GJA8)</i>	1q21.1	P88Q	Conexina 50	Catarata nuclear pulverulenta	AD	Shiels <i>et al.</i> (1998)
<i>CX50 (GJA8)</i>	1q21.1	Q48K	Conexina 50	Catarata nuclear pulverulenta	AD	Berry <i>et al.</i> (1999)

CX50 (GJA8)	1q21.1	R23T	Conexina 50	Catarata nuclear	AD	Willoughby <i>et al.</i> (2003)
CX50 (GJA8)	1q21.1	V44E	Conexina 50	Catarata total	AD	Devi <i>et al.</i> (2006)
CX50 (GJA8)	1q21.1	V64G	Conexina 50	Catarata nuclear	AD	Devi <i>et al.</i> (2006)
CX50 (GJA8)	1q21.1	V79L	Conexina 50	Catarata sutural	AD	Vanita <i>et al.</i> (2006)
CX50 (GJA8)	1q21.1	P189S	Conexina 50	Catarata cortical	AD	Hansen <i>et al.</i> (2007)
CX50 (GJA8)	1q21.1	R198Q	Conexina 50	Catarata subcapsular	AD	Devi <i>et al.</i> (2006)
CX50 (GJA8)	1q21.1	L247M	Conexina 50	Catarata nuclear	AD	Polyakov <i>et al.</i> (2001)
CX50 (GJA8)	1q21.1	ins776G	Conexina 50	Catarata triangular	AR	Schmidt <i>et al.</i> (2008)
CX50 (GJA8)	1q21.1	W45S	Conexina 50	Catarata medusiforme + microcórneia	AD	Vanita <i>et al.</i> (2008)
CX50 (GJA8)	1q21.1	D47N	Conexina 50	Catarata nuclear pulverulenta	AD	Arora <i>et al.</i> (2008)
CX50 (GJA8)	1q21.1	D47Y	Conexina 50	-----	AD	Lin <i>et al.</i> (2008)
CX50 (GJA8)	1q21.1	S276F	Conexina 50	Catarata nuclear pulverulenta	AD	Yan <i>et al.</i> (2008)
CX50 (GJA8)	1q21.1	I31T	Conexina 50	Catarata nuclear	AD	Wang <i>et al.</i> (2009)
CX50 (GJA8)	1q21.1	R198W	Conexina 50	Catarata não-classificada + microcórneia	AD	Hu <i>et al.</i> (2010)
CX50 (GJA8)	1q21.1	S258F	Conexina 50	Catarata nuclear	AD	Gao <i>et al.</i> (2010)
MIP	12q12	T138R	MP 26	Catarata lamelar , Catarata polar anterior	AD	Berry <i>et al.</i> (2000)
MIP	12q12	E134G	MP 26	Catarata lamelar	AD	Berry <i>et al.</i> (2000)
MIP	12q12	R33C	MP 26	Catarata total	AD	Gu <i>et al.</i> (2007)
MIP	12p11.2-q15	R233K	MP 26	Catarata polimórfica	AD	Lin <i>et al.</i> (2007)
MIP	12q12	IVS3 -1 G>A	MP 26	Catarata nuclear	AD	Jiang <i>et al.</i> (2009)
MIP	12q12	V107I	MP 26	Catarata nuclear	AD	Wang <i>et al.</i> (2010)
MIP	12q13	M1T	MP 26	Catarata cerulean	AD	Xiao <i>et al.</i> (2011)
MIP	12q12	Y177C	MP 26	Catarata nuclear	AD	Yang <i>et al.</i> (2011)
MIP	12q12	R187C	MP 26	Catarata nuclear	AD	Wang <i>et al.</i> (2011)
MIP	12q12	G165D	MP 26	Catarata lamelar	AD	Kumar <i>et al.</i> (2012)

AD: Autossômica dominante; AR: Autossômica recessiva

1.1.8.3– Proteínas do Citoesqueleto

A organização estrutural das células cristalínias é determinada pela interação entre o citoesqueleto e as proteínas cristalinas dentro do citoplasma. O citoesqueleto das fibras cristalínias é formado por microfilamentos, microtúbulos e filamentos intermediários. Os microfilamentos, compostos por moléculas de actina, facilitam as mudanças na forma celular, reforçam o contato entre as células e definem compartimentos da membrana plasmática. Os microtúbulos, compostos por moléculas de tubulina, direcionam o processo de transporte intracelular e contribuem para a distribuição de organelas. Os filamentos intermediários ajudam as células cristalínias a superarem o estresse físico causado pela acomodação e por variações de temperatura (Reddy *et al.*, 2004).

1.1.8.3.1 - “Beaded Filament Structural Protein 2” (BFSP2 ou CP49)

As proteínas “Beaded Filament Structural” (BFSP) são específicas do citoesqueleto das fibras cristalínias. Duas proteínas dos filamentos intermediários (“Beaded Filament Structural Protein” 2 [BFSP2] e “filensin”) são encontradas no complexo do citoesqueleto e interagem com as proteínas alfa-cristalinas. Dessa forma, os genes que codificam as BFSP são considerados bons candidatos para catarata congênita hereditária (Reddy *et al.*, 2004).

As cataratas associadas a mutações no gene que codifica a BFSP2 normalmente apresentam os fenótipos nuclear, lamelar e sutural, enquanto as cataratas relacionadas a mutações no gene que codifica BFSP1 podem se apresentar no fenótipo cortical. As mutações no gene que codifica BFSP1 estão relacionadas às cataratas do desenvolvimento (Hejtmancik, 2008).

TABELA 6: Mutações relacionadas à catarata congênita hereditária, descritas no gene *BFSP2* (modificado de Santana, 2009).

Gene	Locus	Mutação	Proteína	Fenótipo	Modo de transmissão	Referências
<i>BFSP2</i>	3q21.2-q22.3	R287W	BFSP2	Catarata nuclear e sutural	AD	Conley <i>et al.</i> (2000)
<i>BFSP2</i>	3q21.2-q22.3	233delE	BFSP2	Catarata cortical e subcapsular posterior	AD	Jakobs <i>et al.</i> (2000)
<i>BFSP2</i>	3q21.2-q22.3	R339H	BFSP2	Catarata lamelar	AD	Ma <i>et al.</i> (2008)

AD: Autossômica dominante.

1.1.8.4– Reguladores do Desenvolvimento

O desenvolvimento do cristalino é coordenado pela interação temporal e espacial de uma série de genes e de seus produtos. Os genes envolvidos nesse processo extremamente complexo codificam fatores de transcrição e fatores de crescimento difusíveis. Mutações em genes que codificam fatores de transcrição têm sido implicadas em uma série de desordens do desenvolvimento do segmento anterior, mas apenas três deles (*PITX3*, *MAF*, and *HSF4*) têm sido implicados em catarata isolada (Reddy *et al.*, 2004).

1.1.8.4.1 – “Paired-like Homeodomain Transcription Factor3” (*PITX3*)

PITX3 é um membro da classe “prd-like” de fatores de homeodomínio e sua expressão foi descoberta originalmente no desenvolvimento do cristalino do rato. Mutações no gene *PITX3* causam predominantemente catarata polar posterior associada com disgenesia mesenquimal do seguimento anterior (DMSA), incluindo opacidades corneanas, adesões de íris e anormalidades do nervo óptico, embora existam relatos de mutações causadoras de catarata isolada (Hejtmancik, 2008; Reddy *et al.*, 2004).

Atualmente, são conhecidas três mutações no gene *PITX3* relacionadas à formação de catarata congênita. Essas mutações estão descritas na tabela 7.

1.1.8.4.2 – “Avian Musculoaponeurotic Fibrosarcoma” (MAF)

MAF é um fator de transcrição denominado “basic region leucine zipper” (bZIP), expresso no placóide cristalino, na vesícula cristalina e nas fibras primárias do cristalino. O gene *MAF* interage com as regiões promotoras dos genes para as proteínas cristalinas e *PITX3* (Reddy *et al.*, 2004).

Mutações no gene *MAF* podem causar cataratas associadas a DSMA em algumas famílias, mas isoladas em outras (Hejtmancik, 2008).

Até o momento, são conhecidas três mutações no gene *MAF* relacionadas à catarata congênita. Essas alterações estão descritas na tabela 7.

1.1.8.4.3 – “Heat Shock Transcription Factor 4” (HSF4)

HSF4 é um fator de transcrição responsável pela regulação das proteínas “small heat shock” e “large heat shock”. Enquanto as primeiras, tais como alfa-B-cristalinas e Hsp 27, têm uma reconhecida atividade “chaperone-like” e não dependem de ATP, as segundas são dependentes de ATP e têm uma capacidade adicional de restaurar proteínas desnaturadas e de evitar síntese mal executada das novas proteínas. (Hejtmancik, 2008; Reddy *et al.*, 2004).

Mutações no gene *HSF4* têm sido associadas com cataratas autossômicas dominantes e recessivas. As cataratas dominantes se apresentam na infância precoce e são descritas com o fenótipo lamelar, enquanto as cataratas recessivas estão presentes ao nascimento e apresentam gravidade variável de fenótipos, tais como catarata nuclear com algum envolvimento cortical ou catarata total associada a nistagmo (Hejtmancik, 2008).

Atualmente, são relatadas sete mutações no gene *HSF4*, relacionadas à catarata congênita, que estão descritas na tabela 7.

TABELA 7: Mutações relacionadas à catarata congênita hereditária, descritas nos genes *PITX3*, *MAF* e *HSF4* (modificado de Santana, 2009).

Gene	Locus	Mutação	Proteína	Fenótipo	Modo de transmissão	Referências
<i>PITX3</i>	10q24-q25	S13N	PITX3	Catarata total	AD	Semina <i>et al.</i> (1998)
<i>PITX3</i>	10q24-q25	656-657ins17pb	PITX3	Catarata + disgenesia anterior	AD	Semina <i>et al.</i> (1998)
<i>PITX3</i>	10q24-q25	542delC	PITX3	Catarata polar posterior	AD	Berry <i>et al.</i> (2011)
<i>MAF</i>	16q22-q23	R288P	MAF	Catarata pulverulenta + microcórnea + coloboma de íris	AD	Jamieson <i>et al.</i> (2002)
<i>MAF</i>	16q22-q23	K297R	MAF	Catarata cerúlea	AD	Vanita <i>et al.</i> (2006)
<i>MAF</i>	16q22-q23	R299S	MAF	Catarata polar posterior, catarata nuclear, catarata lamelar + microcórnea + coloboma de íris	AD	Hansen <i>et al.</i> (2007)
<i>HSF4</i>	16q22	A19D	HSF4	Catarata lamelar	AD	Bu <i>et al.</i> (2002)
<i>HSF4</i>	16q22	R73H	HSF4	Catarata total	AD	Ke <i>et al.</i> (2006)
<i>HSF4</i>	16q22	I86V	HSF4	Catarata lamelar	AD	Bu <i>et al.</i> (2002)
<i>HSF4</i>	16q22	L114P	HSF4	Catarata lamelar	AD	Bu <i>et al.</i> (2002)
<i>HSF4</i>	16q22	R119C	HSF4	Catarata lamelar	AD	Bu <i>et al.</i> (2002)
<i>HSF4</i>	16q22	R175P	HSF4	Catarata lamelar	AR	Forsheew <i>et al.</i> (2005)
<i>HSF4</i>	16q22	R405X	HSF4	-----	AR	Sajjad <i>et al.</i> (2008)

AD: Autossômica dominante; AR: Autossômica recessiva.

1.1.8.5 – Mutação no Gene L-Ferritina

A ferritina é uma proteína de depósito intracelular de ferro com função de proteger os tecidos dos danos oxidativos ocasionados pelo ferro livre. Mutações no elemento responsivo ao ferro (IRE) do gene “Lightferritin” (*LFT*) no cromossomo 19 (19q13.3-13.4) estão relacionadas com a síndrome de catarata associada à hiperferritinemia (SCH). A presença de catarata pulverulenta pode ser a única alteração clínica encontrada em pacientes com essa síndrome. Dessa forma, casos de catarata puerulenta com herança autossômica dominante devem ser investigados para hiperferritinemia (Hejtmancik, 2008; Reddy *et al.*, 2004).

1.2 - Justificativa

Em virtude da elevada prevalência de casos de catarata congênita bilateral com etiologia hereditária, a identificação de alterações genéticas estruturais relacionadas a essa afecção na população brasileira é fundamental para permitir ações de aconselhamento genético e para propiciar melhores abordagens terapêuticas para os pacientes afetados.

Atualmente, ainda há poucos estudos brasileiros relacionados com a identificação de genes e de mutações associados à catarata congênita. Espera-se, dessa forma, contribuir para a descrição de novas alterações estruturais nos genes estudados.

2. OBJETIVOS

2.1 – Objetivo Geral

Determinar a ocorrência de alterações estruturais nos genes *CRYAA*, *CRYGC* e *CRYGD* em pacientes portadores de catarata congênita bilateral com fenótipo nuclear ou lamelar.

2.2 – Objetivos Específicos

2.2.1 – Estudar os pacientes acometidos por catarata congênita e seus familiares, determinando, nesses indivíduos, a presença da doença, o fenótipo (em caso de acometimento) e a ocorrência de alterações estruturais nos genes estudados.

2.2.2 – Avaliar, no grupo controle, a presença das alterações estruturais encontradas nas famílias estudadas, especialmente aquelas potencialmente deletérias à função da proteína codificada.

2.2.3 – Comparar as alterações genéticas encontradas nos pacientes relacionados com os dados já descritos na literatura.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 – Recrutamento dos pacientes

Trata-se de estudo transversal, incluindo pacientes e parentes em primeiro grau de dez famílias, atendidos no Ambulatório de Catarata Congênita, Setor de Catarata do Departamento de Oftalmo-Otorrinolaringologia do Hospital de Clínicas da UNICAMP. O grupo controle foi composto por cinquenta pacientes atendidos no Ambulatório de Oftalmologia do Hospital de Clínicas da UNICAMP. Os participantes do estudo assinaram termo de consentimento livre e esclarecido, que foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (Anexo 1).

3.2 – Exame Oftalmológico

Os pacientes com diagnóstico de catarata congênita e seus familiares em primeiro grau foram submetidos a exame oftalmológico, que constou de:

- Anamnese com história clínica, familiar e materno-obstétrica;
- Medida de acuidade visual através da tabela de Snellen, para pacientes informantes, e através dos cartões de acuidade de Teller, para pacientes sem capacidade de informação;
- Refração;
- Biomicroscopia de segmento anterior após midríase medicamentosa com Tropicamida 1% (Mydriacyl ® - Alcon Laboratórios do Brasil), uma gota aplicada por três vezes a cada 5 minutos;
- Medida da pressão intraocular com tonômetro de aplanção tipo Goldmann sempre que possível;
- Oftalmoscopia binocular indireta e biomicroscopia de pólo posterior;
- Ultrassonografia ocular em modo B para os casos nos quais opacidades de meios dificultaram a visualização do fundo de olho.

3.3 – Critérios de Inclusão

Os seguintes critérios permitiram a inclusão dos pacientes no estudo:

- Catarata congênita bilateral;
- Catarata do tipo nuclear ou lamelar, com fenótipo classificado à lâmpada de fenda ou claramente documentado em prontuário médico para pacientes já operados.

Na família 8, em que houve uma maior proporção de indivíduos afetados e uma maior ocorrência de SNP, optou-se por incluir, na análise genética, todos os indivíduos que compareceram ao exame oftalmológico.

3.4 – Critérios de Exclusão

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

- Pacientes com catarata congênita associada a quadros sindrômicos sistêmicos;
- Casos de catarata congênita unilaterais;
- Casos de catarata congênita de etiologia não hereditária, como distúrbios metabólicos, infecções intrauterinas e prematuridade.

3.5 – Grupo Controle

Os participantes do grupo controle foram submetidos a exame oftalmológico semelhante ao descrito no item 3.2. Foram incluídos pacientes com cristalino transparente ao exame oftalmológico e sem história familiar de catarata congênita ou de cegueira de causa indeterminada. Indivíduos com qualquer tipo de opacificação do cristalino ou com história familiar de catarata congênita ou de cegueira de causa indeterminada foram excluídos. Os participantes do grupo controle assinaram termo de consentimento livre e

esclarecido, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (Anexo 1).

3.6 – Extração de DNA a Partir de Sangue Periférico

As amostras de DNA foram extraídas a partir de 5 a 10 mL de sangue periférico, conforme método descrito no anexo 2.

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Genética Molecular Humana do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) da UNICAMP.

3.7 – Análise dos Genes *CRYAA*, *CRYGC* e *CRYGD*

A análise dos genes *CRYAA*, *CRYGC* e *CRYGD* foi realizada, a princípio, nos casos-índice e nos seus familiares em primeiro grau. Na ocorrência de alguma alteração estrutural na sequência de nucleotídeos que ocasionasse potencial mudança na função da proteína codificada nesses indivíduos, foi realizada a análise da mesma região genética nos pacientes do grupo-controle.

3.7.1 – Reação em Cadeia da Polimerase

Os pares de iniciadores para amplificação de regiões codificadoras e de sítios de junções íntron/exon dos três genes foram selecionados através do programa “primer 3” (Cambridge, MD, USA), a partir das sequências dos genes *CRYAA* (OMIM 123660), *CRYGC* (OMIM 123680) e *CRYGD* (OMIM 123690). As sequências iniciadoras, os tamanhos dos fragmentos e as temperaturas de anelamento estão disponíveis na tabela 8.

TABELA 8: Sequências de oligonucleotídeos utilizados como “primers” na reação em cadeia da polimerase (PCR) dos genes *CRYAA*, *CRYGC* e *CRYGD*, tamanho dos fragmentos (pb) e temperaturas de anelamento (°C).

Gene	Éxon	Primers (5'→3')	Tamanho do fragmento (pb)	T (°C)
<i>CRYAA</i>	1-sense	CACGCCTTTCCAGAGAAATC	466	63,9
	1-antisense	CTCTGCAAGGGGATGAAGTG		
	2-sense	CTTGGTGTGTGGGAGAAGAGG	377	58,0
	2-antisense	TCCCTCTCCCAGGGTTGAAG		
	3-sense	CCCCCTTCTGCAGTCAGT	989	57,0
	3-antisense	GCTTGAGCTCAGGAGAAGGA		
<i>CRYGC</i>	1 e 2-sense	ACCAGAGAACAAGGACACAATC	674	66,6
	1 e 2-antisense	TGGCTTATTCAGTCTCTGATG		
	3-sense	ATTCCATGCCACAACCTACC	590	66,3
	3-antisense	CCAACGTCTGAGGCTTGTTC		
<i>CRYGD</i>	1 e 2-sense	CCCTTTTGTGCGGTTCTTG	596	54,0
	1 e 2-antisense	TTTGTCCACTCTCAGTTATTGTGAC		
	3-sense	TGTGCTCGGTAATGAGGAG	700	61,0
	3-antisense	AGGCCAGAGAATCAAATGAG		

pb: Pares de bases; T: Temperatura; °C: Graus Celsius.

A padronização da PCR foi realizada com o uso dos reagentes a seguir: 0,5 µL de cada “primer” na concentração de 20 pmoles, sendo 0,25 µL do “primer” sense e 0,25 µL do “primer” antissense; 2,5 µL do tampão da enzima 10 X [Tris-HCl 20 mM (pH 8,4), KCl 50mM, gelatina 0,01%]; 1,5 µL de MgCl₂ 50 mM; 0,5 µL da mistura de nucleotídeos 10mM (dATP, dCTP, dTTP, dGTP); 0,1 µL de Taq DNA polimerase recombinante (“Fermentas”, Burlington, Canada) na concentração de 5U/µL, acrescentados a 0,5 µg de DNA genômico e água deionizada estéril, atingindo o volume de 25,0 µL. Os “primers” utilizados foram sintetizados pela “InvitrogenTM Life Technologies” (Carlsbad, CA, USA). Na reação de PCR para a região 1-2 do gene *CRYGD*, foi utilizado dimetilsulfóxido (DMSO) 10%.

Obteve-se a amplificação das amostras através do aparelho termociclador “MasterCycler EP Gradient S” (Eppendorf, Hamburg, Germany), utilizando-se os parâmetros a seguir: desnaturação inicial do DNA a 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento com temperatura de acordo com o par de “primers” utilizado por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto e fase de extensão final a 94°C por 7 minutos.

Após a conclusão da amplificação, 3,0 µL do produto da PCR foram acrescentados a 1,2 µL do corante “Blue Juice Loading Buffer 10X” (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e aplicados em gel de agarose 1,5% adicionado a brometo de etídio na concentração de 0,5 mg/ml para realização de eletroforese. Depois de 40 minutos, o resultado da eletroforese foi analisado através de iluminação sob luz ultravioleta em aparelho transiluminador (Eagle Eye™ II Stratagene®, La Jolla, CA, USA).

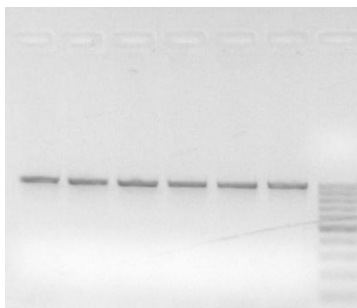


FIGURA 14: Produto da PCR do éxon 3 do gene *CRYAA* após eletroforese em gel de agarose 1,5%.

3.7.2 – Sequenciamento Automático

Para a reação de sequenciamento, adicionou-se a cada poço da placa específica para o sequenciador (96 – *well ultraplate*, Natural, Sorenson™, Sollentuna, Sweden) 1,0 µL do produto da PCR e 1,0 µL do “primer” sense ou antissense a ser utilizado na concentração de 5 pmol, completando-se o volume final de 20,0 µL em cada poço da placa com 18,0 µL da mistura, que se segue: 1350,0 µL de água deionizada estéril, 400,0 µL de

tampão de sequenciamento 5X e 50,0 µL de *Big Dye* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

As placas foram levadas ao termociclador sob as seguintes condições: ciclo único de 1 minuto e 30 segundos a 96°C, seguido por 24 ciclos da sequência 12 segundos a 96°C, 6 segundos a 50°C e 4 minutos a 60°C. Após essa reação, as amostras foram purificadas a fim de eliminar nucleotídeos não incorporados (Anexo 3).

As amostras foram ressuspensas em 10,0 µL de Formamida Hi-Di (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), desnaturadas por 5 minutos a 96°C, colocadas imediatamente no gelo e submetidas à eletroforese no sequenciador automático “ABI PRISM 3700 Genetic Analyser” (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A confirmação da região genômica analisada foi realizada através de buscas por similaridade, utilizando-se o “algoritmo de buscas” *Blast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

Foi realizado o alinhamento da sequência de aminoácidos alfa-A-cristalina, gama-C-cristalina e gama-D-cristalina por meio do “site” Polyphen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), avaliando a sua conservação ao longo da evolução das diferentes espécies.

3.8 – Métodos Computacionais para Avaliação de Alterações do Tipo “Missense”

Os métodos computacionais são algoritmos automatizados disponíveis na “internet” e foram as ferramentas utilizadas para avaliar a possível influência da substituição de um aminoácido na função de uma determinada proteína.

O método “Sorting Intolerant from Tolerant amino acid substitutions” (SIFT, <http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html>) assume que os aminoácidos importantes tendem a ser conservados entre as espécies. Esse algoritmo atribui um escore de probabilidade de 0-1 para cada substituição de aminoácido. Substituições com probabilidade inferior a 0,05 são consideradas intolerantes (Chan *et al.*, 2007).

O algoritmo “Polymorphism Phenotyping 2” (PolyPhen-2, <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>) considera a conservação de aminoácidos entre as espécies e as diferenças físico-químicas entre proteínas selvagens e mutantes. Esse método realiza uma classificação qualitativa, de acordo com a possibilidade do dano estrutural à proteína, em três categorias: “benign”, “possibly damaging” e “probably damaging” (Chan *et al.*, 2007; Tavtigian *et al.*, 2008).

O método “Grantham Score Difference” (Align-GVGD, <http://agvgd.iarc.fr>) baseia-se nas diferenças químicas, de polaridade e do volume molecular entre os aminoácidos trocados. A pontuação varia entre 15 e 215. Escores maiores que 100 são preditivos de mutações deletérias. Escores menores que 60 são considerados toleráveis (Chan *et al.*, 2007).

3.9 – Famílias

Foram selecionadas dez famílias de indivíduos portadores de catarata congênita bilateral (Tabela 9), sendo quatro famílias com fenótipo nuclear (1, 4, 6, 9) e seis com fenótipo lamelar (2, 3, 5, 7, 8, 10).

TABELA 9: Dados clínico-oftalmológicos dos indivíduos analisados entre as famílias estudadas.

Família	Indivíduo	Sexo	Idade (anos)	Melhor acuidade visual		Fenótipo
				Olho direito	Olho esquerdo	
1	I-1	Masculino	33	1,0	1,0	Não-afetado
1	I-2	Feminino	31	1,0	1,0	Não-afetado
1	II-1	Masculino	7	1,0	1,0	Não-afetado
1	II-2	Feminino	3	0,3	0,5	Nuclear
2	I-1	Masculino	34	1,0	1,0	Não-afetado
2	I-2	Feminino	31	1,0	1,0	Não-afetado
2	II-1	Feminino	12	1,0	0,9	Não-afetado
2	II-2	Masculino	10	0,9	0,9	Lamelar
3	I-1	Masculino	24	1,0	1,0	Não-afetado

3	I-2	Feminino	23	0,4	CD	Lamelar
3	II-1	Feminino	3	0,15	0,05	Lamelar
4	I-1	Masculino	28	1,0	1,0	Não-afetado
4	I-2	Feminino	25	1,0	1,0	Não-afetado
4	II-1	Masculino	4	0,1	0,3	Nuclear
4	II-2	Masculino	1	0,5	0,5	Não-afetado
5	I-1	Masculino	46	1,0	1,0	Não-afetado
5	I-2	Feminino	38	1,0	1,0	Não-afetado
5	II-1	Masculino	15	1,0	1,0	Não-afetado
5	II-2	Masculino	8	0,3	0,5	Lamelar
6	I-2	Feminino	34	1,0	1,0	Não-afetado
6	II-1	Feminino	15	1,0	1,0	Nuclear
6	II-2	Feminino	9	1,0	1,0	Não-afetado
6	II-3	Feminino	7	1,0	1,0	Não-afetado
7	I-1	Masculino	42	1,0	1,0	Pulverulenta
7	I-2	Feminino	35	0,7	0,2	Não-afetado
7	II-1	Feminino	2	0,13	0,05	Lamelar
7	II-2	Masculino	1	0,5	0,5	Não-afetado
8	I-1	Masculino	80	0,4	0,2	Não-afetado
8	I-2	Feminino	72	1,0	1,0	Não-afetado
8	II-1	Masculino	58	1,0	1,0	Não-afetado
8	II-2	Feminino	54	1,0	1,0	Não-afetado
8	II-3	Masculino	56	0,6	0,2	Não-afetado
8	II-4	Feminino	52	1,0	1,0	Não-afetado
8	II-5	Feminino	49	1,0	1,0	Não-afetado
8	II-6	Masculino	50	1,0	1,0	Não-afetado
8	II-7	Feminino	46	1,0	1,0	Não-afetado
8	II-10	Masculino	55	1,0	SPL	Não-afetado
8	II-11	Feminino	46	1,0	1,0	Pulverulenta
8	II-13	Feminino	42	1,0	1,0	Não-afetado
8	II-14	Masculino	51	1,0	1,0	Não-afetado
8	II-15	Feminino	53	1,0	1,0	Não-afetado
8	II-17	Feminino	40	1,0	1,0	Não-afetado
8	III-2	Feminino	33	1,0	1,0	Não-afetado
8	III-5	Feminino	26	1,0	1,0	Não-afetado
8	III-6	Masculino	24	1,0	1,0	Pulverulenta
8	III-7	Feminino	21	1,0	1,0	Não-afetado

8	III-8	Feminino	19	1,0	1,0	Não-afetado
8	III-10	Masculino	16	1,0	1,0	Não-afetado
8	III-11	Masculino	14	1,0	1,0	Não-afetado
8	III-16	Feminino	20	1,0	1,0	Não-afetado
8	III-18	Masculino	31	1,0	1,0	Não-afetado
8	III-19	Feminino	22	CD	0,6	Lamelar
8	III-20	Masculino	17	1,0	1,0	Não-afetado
8	III-21	Masculino	26	1,0	1,0	Pulverulenta
8	III-22	Masculino	25	1,0	1,0	Pulverulenta
8	III-23	Feminino	22	1,0	1,0	Não-afetado
8	III-24	Feminino	13	1,0	1,0	Não-afetado
8	III-25	Feminino	11	1,0	1,0	Não-afetado
8	III-26	Feminino	11	1,0	1,0	Não-afetado
8	IV-1	Masculino	18	1,0	1,0	Não-afetado
8	IV-2	Feminino	12	1,0	1,0	Não-afetado
8	IV-3	Feminino	13	1,0	1,0	Não-afetado
8	IV-5	Masculino	3	0,05	0,1	Lamelar
8	IV-6	Feminino	1	0,05	0,05	Lamelar
8	IV-7	Masculino	1	0,3	0,5	Lamelar
9	I-1	Masculino	34	CD	CD	Indeterminado
9	I-2	Feminino	23	0,9	1,0	Não-afetado
9	II-1	Masculino	2	0,05	0,1	Nuclear
10	I-1	Masculino	33	1,0	1,0	Não-afetado
10	I-2	Feminino	29	1,0	1,0	Não-afetado
10	II-1	Feminino	4	1,0	0,3	Lamelar

CD: conta dedos; SPL: sem percepção luminosa.

3.9.1 – Família 1

Esta família é representada por duas gerações de indivíduos. Três indivíduos eram não-afetados e apenas o caso-índice (II-2) era afetado bilateralmente pelo fenótipo nuclear (Fig. 15).

O indivíduo II-2 realizou cirurgia de catarata em ambos os olhos, atingindo melhor acuidade visual corrigida de 0,3 em olho direito e 0,5 em olho esquerdo.

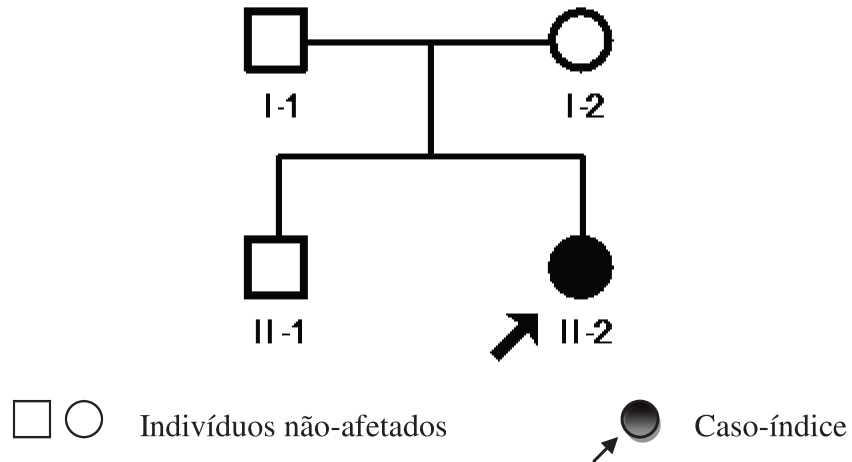


FIGURA 15: Heredograma da família 1, que apresenta um indivíduo portador de catarata congênita nuclear bilateral. Todos os indivíduos foram analisados.

3.9.2 – Família 2

Esta família é representada por duas gerações de indivíduos. Três indivíduos eram não-afetados e apenas o caso-índice (II-2) era afetado bilateralmente pelo fenótipo lamelar (Fig. 16).

O indivíduo II-2 realizou cirurgia de catarata em ambos os olhos, atingindo melhor acuidade visual corrigida de 0,9 em ambos os olhos.

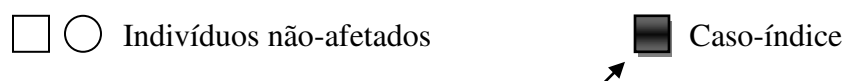
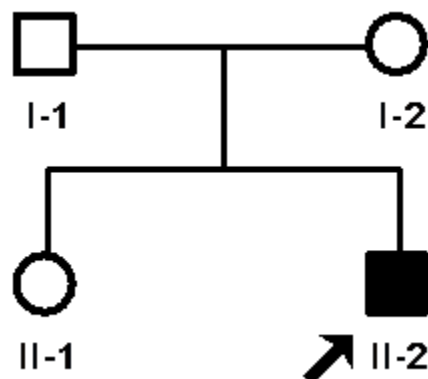


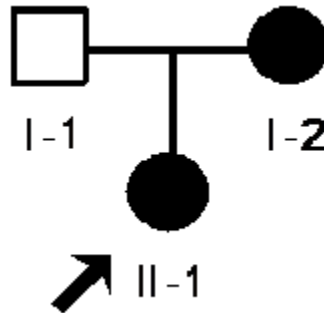
FIGURA 16: Heredograma da família 2, que apresenta um indivíduo portador de catarata congênita lamelar bilateral. Todos os indivíduos foram analisados.

3.9.3 – Família 3

Esta família é representada por duas gerações de indivíduos. Um indivíduo era não-afetado (I-1) e dois indivíduos (I-2 e II-1) eram afetados bilateralmente pelo fenótipo lamelar (Fig. 17).

O indivíduo I-2 realizou cirurgia de catarata em olho esquerdo na infância em outro serviço de oftalmológico, evoluindo com afacia e ambliopia severa nesse olho. O olho direito do indivíduo I-2 não foi operado, permanecendo com opacidade do cristalino (Fig. 18) e acuidade visual corrigida de 0,4.

O indivíduo II-1 foi submetido à cirurgia de catarata em ambos os olhos, evoluindo com acuidade visual corrigida de 0,15 em olho direito e 0,05 em olho esquerdo. Na última avaliação, apresentava opacidade de cápsula posterior em ambos os olhos, mais intensa em olho esquerdo. Foi programada a capsulotomia posterior com *Nd:YAG laser* em ambos os olhos.



Indivíduo não-afetado
 Indivíduo afetado
 Caso-índice

FIGURA 17: Heredograma da família 3, que apresenta dois indivíduos portadores de catarata congênita lamelar bilateral. Todos os indivíduos foram analisados.

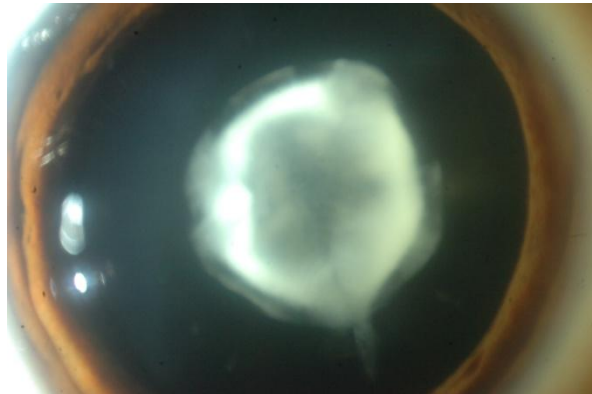


FIGURA 18: Catarata lamelar em olho direito do indivíduo I-2 da família 3.

3.9.4 – Família 4

Trata-se de uma família representada por duas gerações de indivíduos. Três indivíduos eram não-afetados (I-1, I-2 e II-2). Apenas o caso índice (II-1) era afetado bilateralmente pelo fenótipo nuclear (Fig. 19).

O indivíduo II-1 foi submetido à cirurgia de catarata em olho esquerdo e, no momento da avaliação, aguardava procedimento cirúrgico em olho direito, que apresentava catarata nuclear.

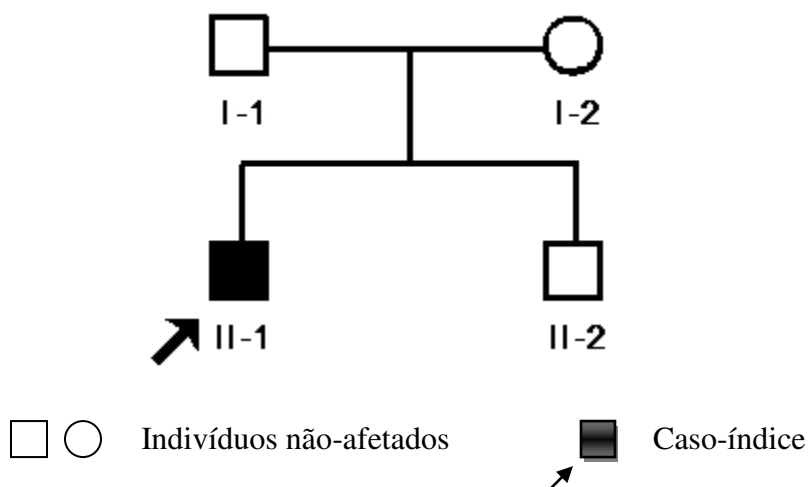


FIGURA 19: Heredograma da família 4, que apresenta um indivíduo portador de catarata congênita nuclear bilateral. Todos os indivíduos foram analisados.

3.9.5 – Família 5

Esta família é composta por duas gerações de indivíduos. Três indivíduos eram não-afetados e apenas o caso-índice (II-2) era afetado bilateralmente pelo fenótipo lamelar (Fig. 20).

O indivíduo II-2 apresentava melhor acuidade visual corrigida de 0,3 em olho direito e de 0,5 em olho esquerdo com catarata lamelar nos dois olhos.

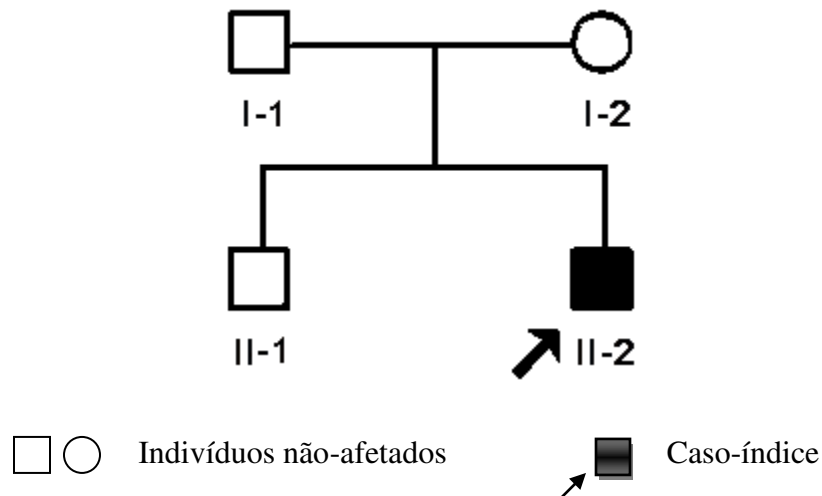


FIGURA 20: Heredograma da família 5, que apresenta um indivíduo portador de catarata congênita lamelar bilateral. Todos os indivíduos foram analisados.

3.9.6 – Família 6

Trata-se de uma família representada por duas gerações de indivíduos. Três indivíduos eram não-afetados (I-2, II-2 e II-3). Apenas o caso índice (II-1) era afetado bilateralmente pelo fenótipo nuclear. O indivíduo I-1 não foi analisado (Fig. 21).

O indivíduo II-1 foi submetido à cirurgia de catarata bilateralmente, atingindo acuidade visual corrigida de 1,0 em ambos os olhos.

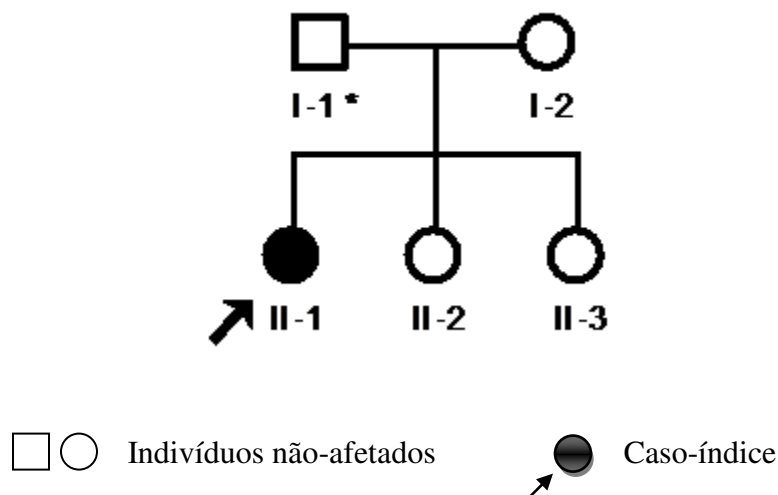


FIGURA 21: Heredograma da família 6, que apresenta um indivíduo portador de catarata congênita nuclear bilateral. O indivíduo marcado com asterisco não foi analisado.

3.9.7 – Família 7

Esta família é composta por duas gerações de indivíduos. Dois indivíduos eram não-afetados. Um indivíduo (I-1) era afetado bilateralmente por catarata pulverulenta e o caso-índice (II-1) era afetado bilateralmente pelo fenótipo lamelar (Fig. 22).

O indivíduo II-1 foi submetido à cirurgia de catarata em olho direito, apresentando afacia e acuidade visual corrigida de 0,13 nesse olho. Em olho esquerdo, apresentava catarata lamelar densa e acuidade visual corrigida de 0,05. A cirurgia de catarata do olho esquerdo já estava programada.

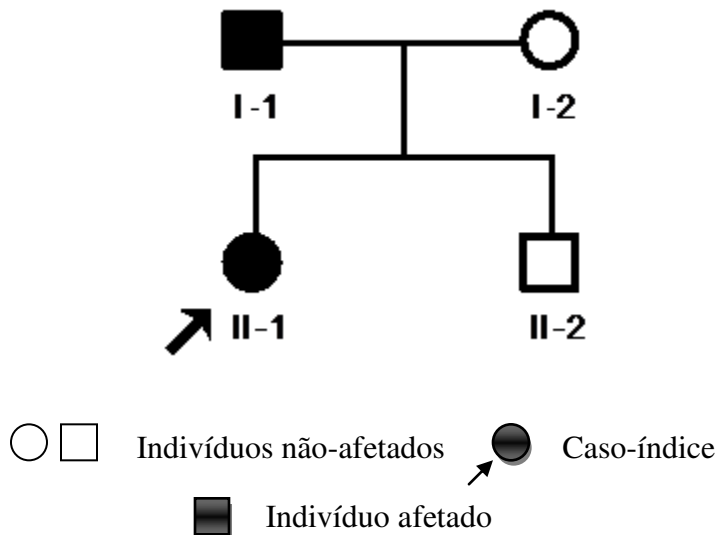


FIGURA 22: Heredograma da família 7, que apresenta um indivíduo portador de catarata congênita lamelar bilateral (II-1) e um indivíduo portador de catarata pulverulenta bilateral (I-1). Todos os indivíduos foram analisados.

3.9.8 – Família 8

Trata-se de uma família representada por quatro gerações de indivíduos. Quatro indivíduos, incluindo o caso-índice, eram afetados pelo fenótipo lamelar bilateral (III-19, IV-5, IV-6 e IV-7), quatro indivíduos eram acometidos por catarata pulverulenta bilateral (II-11, III-6, III-21 e III-22) e dois indivíduos (II-7 e III-10) apresentavam o fenótipo

cortical anterior radiado. Os indivíduos mais idosos da família (I-1 e I-2) apresentavam opacidades de cristalino com características de senilidade (Fig. 23).

Um dos indivíduos portador de catarata lamelar foi submetido à cirurgia em outro serviço oftalmológico, evoluindo com afacia bilateral e ambliopia severa em olho direito. Outros dois indivíduos portadores de catarata lamelar foram operados precocemente, evoluindo com afacia bilateral, correção óptica e oclusão adequada. O outro indivíduo acometido pelo fenótipo lamelar teve o olho esquerdo operado, com implante de lente intraocular, e aguardava cirurgia em olho direito.

Os indivíduos portadores dos fenótipos pulverulento e cortical anterior tiveram seus diagnósticos estabelecidos nesta avaliação, apresentando melhor acuidade visual corrigida de 1,0 em ambos os olhos. Os dois indivíduos portadores do fenótipo cortical anterior não foram considerados afetados, pois um deles não pertence à família estudada.

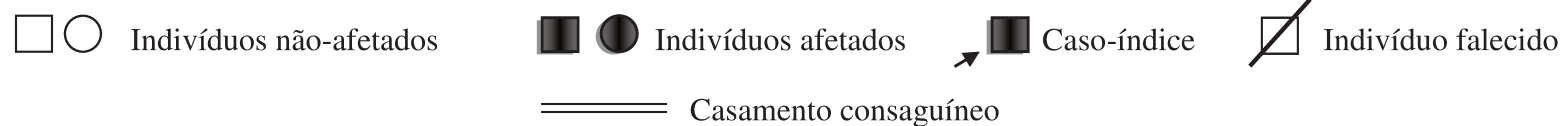
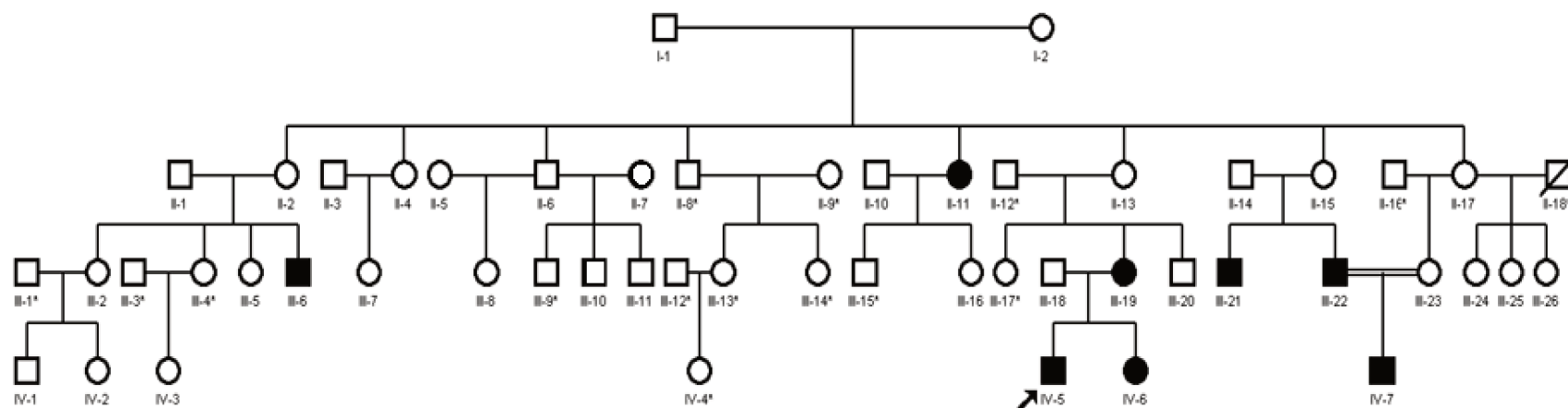


FIGURA 23: Heredograma da família 8, que apresenta indivíduos portadores de catarata congênita bilateral com os fenótipos lamelar (III-19, IV-5, IV-6 e IV-7) e pulverulento (II-11, III-6, III-21 e III-22). Os indivíduos marcados com asterisco não foram analisados.

3.9.9 – Família 9

Esta família é composta por duas gerações de indivíduos. Dois indivíduos eram afetados e um era não-afetado (Fig. 24). Um indivíduo (I-1) foi operado bilateralmente em outro serviço oftalmológico, não sendo possível a classificação fenotípica da catarata. O caso-índice (II-1) era afetado bilateralmente pelo fenótipo nuclear.

O indivíduo I-1 era afático em ambos os olhos, com melhor acuidade visual corrigida de conta-dedos bilateralmente e nistagmo horizontal severo.

O indivíduo II-1 realizou cirurgia de catarata bilateralmente, apresentando afacia em ambos os olhos, com presença de restos corticais em eixo visual de olho direito. Demonstrava acuidade visual corrigida menor que 0,05 nesse olho e 0,1 em olho esquerdo. Aguardava procedimento cirúrgico para remoção de restos corticais em olho direito.

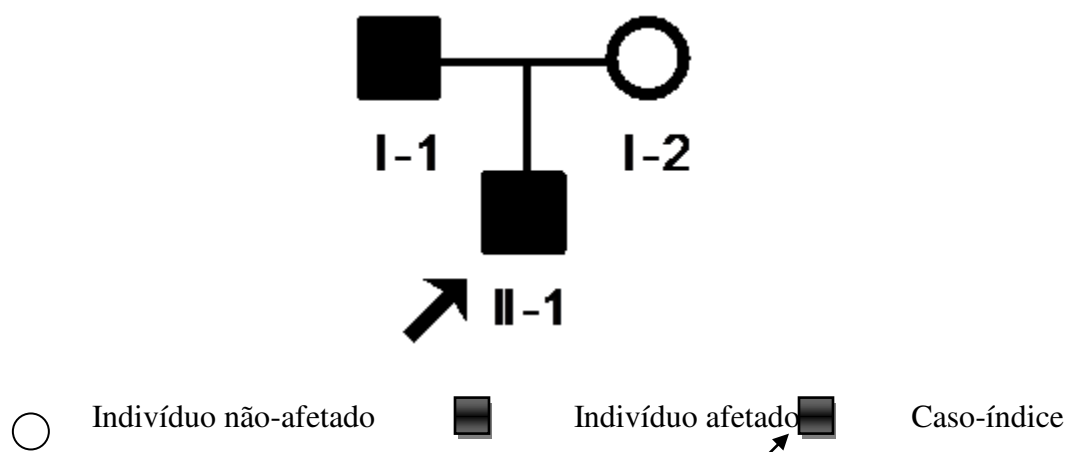


FIGURA 24: Heredograma da família 9, que apresenta dois indivíduos portadores de catarata congênita bilateral, um deles com fenótipo nuclear documentado em prontuário e outro operado em outro serviço oftalmológico. Todos os indivíduos foram analisados.

3.9.10 – Família 10

Esta família é composta por duas gerações de indivíduos (Fig. 25). Dois indivíduos eram não-afetados. O caso-índice (II-1) era afetado bilateralmente pelo fenótipo lamelar (Fig. 26).

O indivíduo II-1 foi submetido à cirurgia de catarata em olho direito, evoluindo com melhor acuidade visual corrigida de 1,0 nesse olho e 0,4 em olho esquerdo.

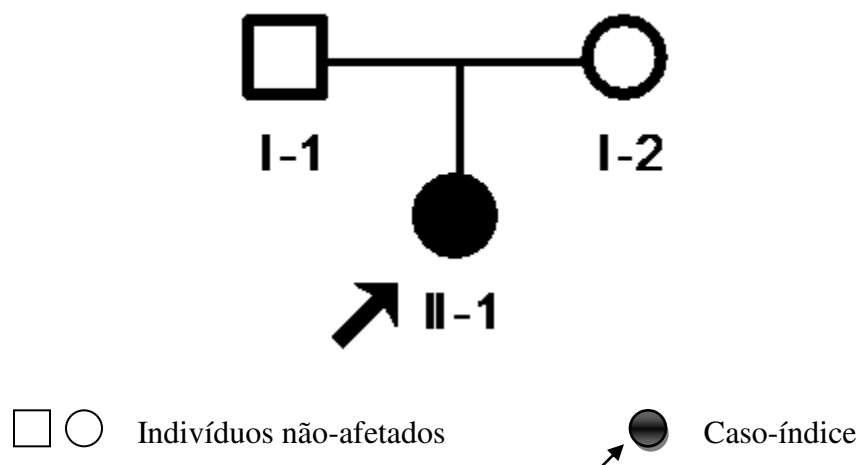


FIGURA 25: Heredograma da família 10, que apresenta um indivíduo portador de catarata congênita lamelar bilateral. Todos os indivíduos foram analisados.



FIGURA 26: Catarata lamelar em olho esquerdo do indivíduo II-1 da família 10.

4. RESULTADOS

4.1 – Resultados do Sequenciamento Automatizado

4.1.1 – Gene *CRYAA*

4.1.1.1 – Identificação do SNP D2D (rs872331C>T)

Este é um SNP localizado no éxon 1 e descrito previamente na literatura (Hattori *et al.*, 2000; Santana *et al.*, 2009; http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Mappings). É caracterizado pela troca da base nitrogenada citosina por timina no códon 2 (GAC → GAT).

Tal SNP foi identificado em heterozigose nos casos-índice das famílias 3, 6, 7, 9 e 10 e em homozigose nos casos-índice famílias 4, 5 e 8. Nos casos-índice das famílias 1 e 2, o SNP não foi identificado. A tabela 9 descreve os indivíduos em que o SNP D2D foi identificado.

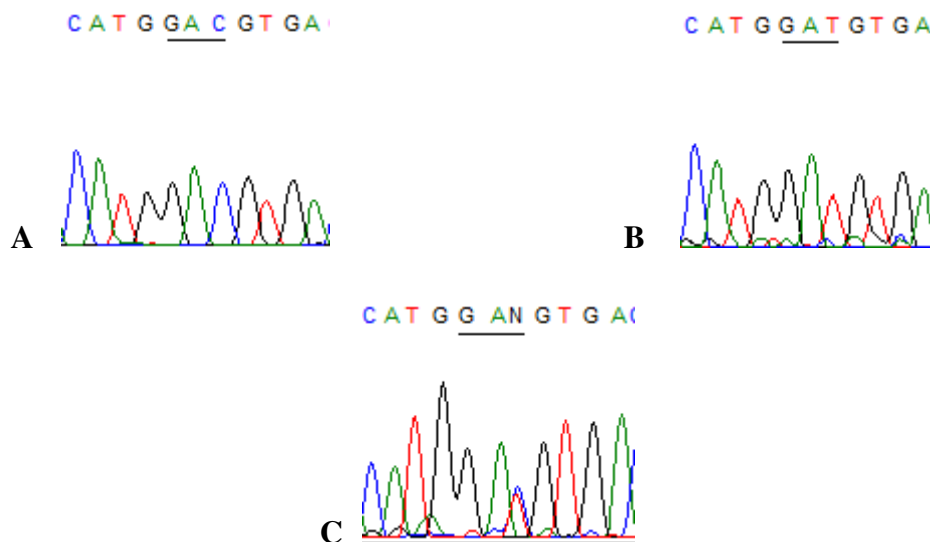


FIGURA 27: Sequenciamento direto do primeiro éxon de gene *CRYAA* (5' → 3'): **A:** Indivíduo homozigoto para o alelo C. **B:** Indivíduo homozigoto para o SNP D2D. **C:** Indivíduo heterozigoto para o SNP D2D.

TABELA 10: Indivíduos portadores do SNP D2D.

Família	Indivíduo	Fenótipo	Situação
1	I-2	Não-afetado	Heterozigose
1	II-1	Não-afetado	Heterozigose
2	I-2	Não-afetado	Heterozigose
2	II-1	Não-afetado	Heterozigose
3	I-1	Não-afetado	Homozigose
3	II-1	Lamellar	Heterozigose
4	I-1	Não-afetado	Heterozigose
4	I-2	Não-afetado	Heterozigose
4	II-1	Nuclear	Homozigose
4	II-2	Não-afetado	Heterozigose
5	I-1	Não-afetado	Homozigose
5	I-2	Não-afetado	Homozigose
5	II-1	Não-afetado	Homozigose
5	II-2	Lamellar	Homozigose
6	I-2	Não-afetado	Heterozigose
6	II-1	Nuclear	Heterozigose
7	I-1	Pulverulenta	Homozigose
7	II-1	Lamellar	Heterozigose
7	II-2	Não-afetado	Heterozigose
8	I-2	Não-afetado	Heterozigose
8	II-1	Não-afetado	Heterozigose
8	II-7	Não-afetado	Homozigose
8	II-10	Não-afetado	Heterozigose
8	II-13	Não-afetado	Heterozigose
8	II-14	Não-afetado	Heterozigose
8	II-15	Não-afetado	Heterozigose
8	II-17	Não-afetado	Heterozigose
8	III-2	Não-afetado	Heterozigose
8	III-5	Não-afetado	Heterozigose
8	III-6	Pulverulenta	Heterozigose
8	III-9	Não-afetado	Heterozigose
8	III-10	Não-afetado	Homozigose
8	III-11	Não-afetado	Heterozigose
8	III-18	Não-afetado	Heterozigose
8	III-19	Lamellar	Homozigose
8	III-20	Não-afetado	Homozigose
8	III-21	Pulverulenta	Homozigose
8	III-24	Não-afetado	Homozigose
8	III-25	Não-afetado	Heterozigose
8	III-26	Não-afetado	Heterozigose
8	IV-1	Não-afetado	Homozigose
8	IV-5	Lamellar	Homozigose
8	IV-6	Lamellar	Homozigose
9	I-2	Não-afetado	Homozigose
9	II-1	Nuclear	Heterozigose
10	I-1	Não-afetado	Homozigose
10	I-2	Não-afetado	Heterozigose
10	II-1	Lamellar	Heterozigose

4.1.1.2 – Identificação do SNP Y18Y (rs61729442C>T)

Trata-se de um SNP localizado no éxon 1 e descrito previamente na literatura (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Mappings). Caracteriza-se pela troca da base nitrogenada citosina por timina no códon 18 (TAC→TAT).

O referido SNP foi identificado em heterozigose em dois indivíduos da família 2, incluindo o caso-índice (Tab. 10).



FIGURA 28: Sequenciamento direto do primeiro éxon de gene *CRYAA* (5' → 3'): **A:** Indivíduo homozigoto para o alelo C. **B:** Indivíduo heterozigoto para o SNP Y18Y.

TABELA 11: Indivíduos portadores do SNP Y18Y.

Família	Indivíduo	Fenótipo	Situação
2	I-2	Não-afetado	Heterozigose
2	II-2	Lamelar	Heterozigose

4.1.1.3 – Identificação do SNP G137G

Este é um SNP localizado no éxon 3 e inédito na literatura. Caracteriza-se pela troca da base nitrogenada citosina por adenina no códon 137 (GGC → GGA).

Tal SNP foi encontrado em heterozigose em todas as famílias estudadas, estando presente nos casos-índice das famílias 2, 4, 6, 7, 8 e 10 (Tabela 11).



FIGURA 29: Sequenciamento direto do terceiro éxon de gene *CRYAA* (5' → 3'): **A:** Indivíduo homozigoto para o alelo C. **B:** Indivíduo heterozigoto para o SNP G137G.

TABELA 12: Indivíduos portadores do SNP G137G.

Família	Indivíduo	Fenótipo	Situação
1	I-2	Não-afetado	Heterozigose
1	II-1	Não-afetado	Heterozigose
2	I-1	Não-afetado	Heterozigose
2	I-2	Não-afetado	Heterozigose
2	II-1	Não-afetado	Heterozigose
2	II-2	Lamelar	Heterozigose
3	I-1	Não-afetado	Heterozigose
3	I-2	Lamelar	Heterozigose
4	I-1	Não-afetado	Heterozigose
4	I-2	Não-afetado	Heterozigose
4	II-1	Nuclear	Heterozigose
4	II-2	Não-afetado	Heterozigose
5	I-2	Não-afetado	Heterozigose
5	II-1	Não-afetado	Heterozigose
6	II-1	Nuclear	Heterozigose
7	I-2	Não-afetado	Heterozigose
7	II-1	Lamelar	Heterozigose
7	II-2	Não-afetado	Heterozigose
8	I-1	Não-afetado	Heterozigose
8	I-2	Não-afetado	Heterozigose
8	II-1	Não-afetado	Heterozigose
8	II-2	Não-afetado	Heterozigose
8	II-3	Não-afetado	Heterozigose
8	II-4	Não-afetado	Heterozigose
8	II-6	Não-afetado	Heterozigose
8	II-7	Não-afetado	Heterozigose
8	II-10	Não-afetado	Heterozigose
8	II-15	Não-afetado	Heterozigose
8	II-17	Não-afetado	Heterozigose
8	II-20	Não-afetado	Heterozigoto
8	III-8	Não-afetado	Heterozigose
8	III-19	Lamelar	Heterozigose
8	III-21	Pulverulenta	Heterozigose
8	III-22	Pulverulenta	Heterozigose
8	III-24	Não-afetado	Heterozigose
8	III-25	Não-afetado	Heterozigose
8	III-26	Não-afetado	Heterozigose
8	IV-1	Não-afetado	Heterozigose
8	IV-5	Lamelar	Heterozigose
8	IV-6	Lamelar	Heterozigose
8	IV-7	Lamelar	Heterozigose
9	I-2	Não-afetado	Heterozigose
10	I-1	Não-afetado	Heterozigose
10	I-2	Não-afetado	Heterozigose
10	II-1	Lamelar	Heterozigose

4.1.2 – Gene *CRYGC*

4.1.2.1- Identificação do SNP G41G

Este é um SNP localizado no éxon 2 ainda não descrito na literatura. É caracterizado pela troca da base nitrogenada citosina por timina no códon 41 (GGC→GGT).

Esse SNP foi identificado na família 8 em heterozigose no caso-índice e no indivíduo III-18 (Tab. 12).

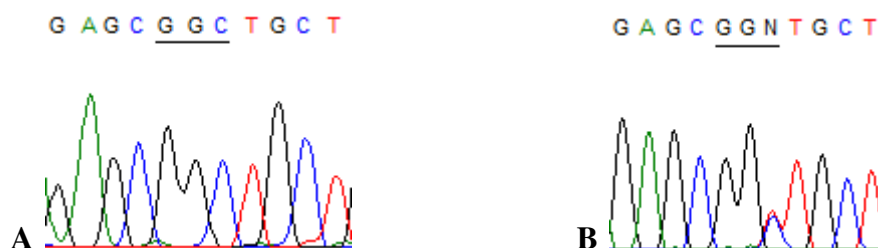


FIGURA 30: Sequenciamento direto do segundo éxon de gene *CRYGC* (5'→ 3'): **A:** Indivíduo homozigoto para o alelo C. **B:** Indivíduo heterozigoto para o SNP G41G.

TABELA 13: Indivíduos portadores do SNP G41G.

Família	Indivíduo	Fenótipo	Situação
8	IV-5	Lamelar	Heterozigose
8	III-18	Não-afetado	Heterozigose

4.1.2.2 – Identificação do SNP S119S (rs61736036C>T)

Este é um SNP localizado no éxon 3 e já descrito previamente na literatura (Santana *et al.*, 2009). Caracteriza-se pela troca da base nitrogenada citosina por timina no códon 119 (AGC →AGT).

Tal SNP foi identificado em heterozigose em dois indivíduos não-afetados da família 8 (Tab. 13).



FIGURA 31: Sequenciamento direto do terceiro éxon de gene *CRYGC* (5'→ 3'): **A:** Indivíduo homozigoto para o alelo C. **B:** Indivíduo heterozigoto para o SNP S119S.

TABELA 14: Indivíduos portadores do SNP S119S.

Família	Indivíduo	Fenótipo	Situação
8	III-24	Não-afetado	Heterozigose
8	III-26	Não-afetado	Heterozigose

4.1.3 – Gene *CRYGD*

4.1.3.1 – Identificação do SNP R95R (rs2305430A>G)

Trata-se de um SNP localizado no éxon 3 e já descrito na literatura (Hillier *et al.*, 2005; Santana *et al.* 2009; http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Mappings). Caracteriza-se pela troca da base nitrogenada adenina por guanina (AGA→AGG) no códon 95.

Foi encontrado em homozigose nas famílias 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8 e 10 e em heterozigose na família 8 (Tabela 14).

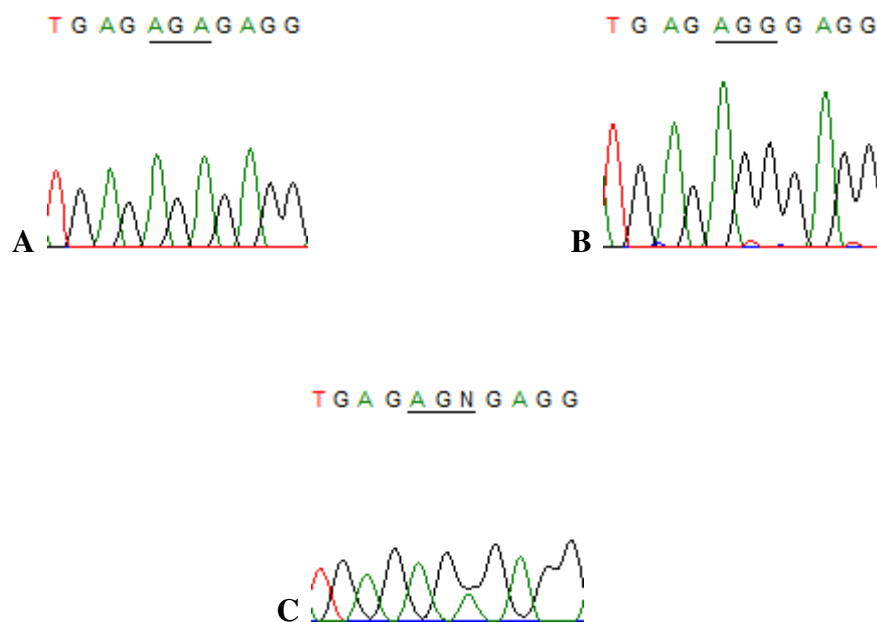


FIGURA 32: Sequenciamento direto do terceiro éxon do gene *CRYGD* (5' → 3'): **A:** Indivíduo homozigoto para o alelo A. **B:** Indivíduo homozigoto para o SNP R95R em homozigose. **C:** Indivíduo heterozigoto para o SNP R95R.

TABELA 15: Indivíduos portadores do SNP R95R.

Família	Indivíduo	Fenótipo	Situação
1	I-1	Não-afetado	Homozigose
1	I-2	Não-afetado	Homozigose
1	II-1	Não-afetado	Homozigose
1	II-2	Nuclear	Homozigose
2	I-1	Não-afetado	Homozigose
2	I-2	Não-afetado	Homozigose
2	II-1	Não-afetado	Homozigose
2	II-2	Lamelar	Homozigose
4	I-1	Não-afetado	Homozigose
4	I-2	Não-afetado	Homozigose
4	II-1	Nuclear	Homozigose
4	II-2	Não-afetado	Homozigose
5	I-1	Não-afetado	Homozigose
5	I-2	Não-afetado	Homozigose
5	II-1	Não-afetado	Homozigose
5	II-2	Lamelar	Homozigose
6	I-2	Não-afetado	Homozigose
6	II-1	Nuclear	Homozigose
6	II-2	Não-afetado	Homozigose
6	II-3	Não-afetado	Homozigose
7	I-1	Pulverulenta	Homozigose
7	I-2	Não-afetado	Homozigose
7	II-1	Lamelar	Homozigose
7	II-2	Não-afetado	Homozigose
8	I-1	Não-afetado	Homozigose
8	I-2	Não-afetado	Homozigose
8	II-2	Não-afetado	Homozigose
8	II-3	Não-afetado	Homozigose
8	II-4	Não-afetado	Homozigose
8	II-7	Não-afetado	Homozigose
8	II-10	Não-afetado	Homozigose
8	II-11	Pulverulenta	Homozigose
8	II-13	Não-afetado	Homozigose
8	II-14	Não-afetado	Homozigose
8	II-15	Não-afetado	Homozigose
8	II-17	Não-afetado	Homozigose
8	III-2	Não-afetado	Heterozigose
8	III-5	Não-afetado	Homozigose
8	III-6	Pulverulenta	Heterozigose
8	III-7	Não-afetado	Homozigose
8	III-8	Não-afetado	Homozigose
8	III-10	Não-afetado	Homozigose
8	III-11	Não-afetado	Homozigose
8	III-16	Não-afetado	Homozigose
8	III-19	Lamelar	Homozigose
8	III-20	Não-afetado	Homozigose
8	III-21	Pulverulenta	Homozigose
8	III-22	Pulverulenta	Homozigose
8	III-23	Não-afetado	Homozigose
8	III-24	Não-afetado	Homozigose
8	III-25	Não-afetado	Heterozigose

8	III-26	Não-afetado	Homozigose
8	IV-1	Não-afetado	Homozigose
8	IV-5	Lamelar	Homozigose
8	IV-6	Lamelar	Heterozigose
8	IV-7	Lamelar	Homozigose
10	I-1	Não-afetado	Homozigose
10	I-2	Não-afetado	Homozigose
10	II-1	Lamelar	Homozigose

4.1.3.2 – Identificação da Mutação Y134C

Este é uma mutação localizada no éxon 3 e não havia sido descrita na literatura até a publicação de parte deste estudo (Anexo 5). Caracteriza-se pela troca da base nitrogenada adenina por guanina (TAC → TGC) no códon 134 (posição 401), levando à substituição do aminoácido Tirosina pelo aminoácido Cisteína. Foi encontrada em heterozigose em três indivíduos da família 8 (Tabela 15).

A avaliação do impacto da mutação Y134C na função da proteína gama-D-cristalina foi realizada através de métodos computacionais. Essa alteração foi considerada intolerante segundo todos os algoritmos analisados (“SIFT”, “PolyPhen-2” e “Align-GVGD”). Os escores obtidos foram 0,00 para o método “SIFT”, 1,000 para o método “PolyPhen-2” e 193,72 para o método “Align-GVGD”.

O alinhamento entre diferentes espécies demonstrou que o resíduo 134 da proteína gama-D-cristalina é altamente conservado (Fig. 34).

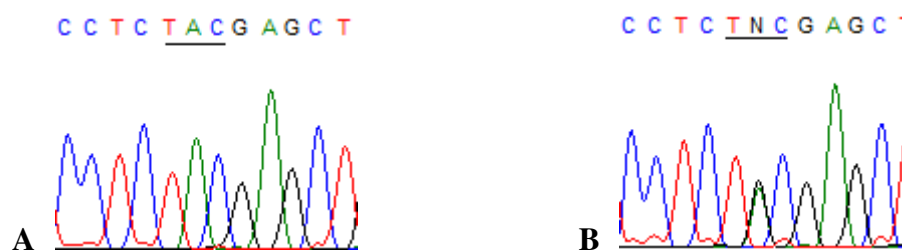


FIGURA 33: Sequenciamento direto do terceiro éxon do gene *CRYGD* (5'→ 3'): **A:** Indivíduo homozigoto para o alelo A. **B:** Indivíduo heterozigoto para a mutação Y134C.

		Aminoácido 134																										
Humano	120	E	I	H	S	L	N	V	L	E	G	S	W	V	L	Y	E	L	S	N	Y	R	G	R	Q	Y	L	145
Bovino	120	E	I	H	S	L	N	V	L	E	G	S	W	V	L	Y	E	L	P	N	Y	R	G	R	Q	Y	L	145
Rato	120	E	I	Y	S	L	N	V	L	E	G	C	W	V	L	Y	D	M	T	N	Y	R	G	R	Q	Y	L	145
Cachorro	120	E	I	Y	S	L	H	V	L	E	G	S	W	V	L	Y	E	L	P	N	Y	R	G	R	Q	Y	L	145
Camundongo	120	E	I	Y	S	L	N	V	L	E	G	C	W	V	L	Y	E	M	T	N	Y	R	G	R	Q	Y	L	145
Coelho	120	E	I	H	S	L	N	V	L	E	G	S	W	V	L	Y	E	L	P	N	Y	R	G	R	Q	Y	L	145
Cavalo	120	E	V	R	S	L	H	V	L	E	G	Y	W	V	L	Y	E	M	P	S	T	R	G	Q	Q	Y	L	145
Porco	120	E	I	Y	S	L	N	V	L	E	G	S	W	V	L	Y	E	L	P	N	Y	R	G	R	Q	Y	L	145

TABELA 16: Indivíduos portadores da mutação Y134C.

5. DISCUSSÃO

Uma quantidade considerável de mutações associadas com catarata congênita humana foram descritas nos genes *CRYAA*, *CRYGC* e *CRYGD*. Estas mutações alteram a estabilidade e/ou a solubilidade das proteínas alfa e gama-cristalinas e contribuem para a perda de transparência das fibras do cristalino. Portanto, vários genes que codificam as proteínas cristalinas têm sido considerados candidatos para catarata congênita hereditária (Santana *et al.*, 2009; Santhiya *et al.*, 2006; Yao *et al.*, 2008).

A catarata congênita hereditária tem alta penetrância e geralmente é simétrica nos indivíduos afetados. No entanto, pode haver considerável variabilidade dentro de uma família e entre os dois cristalinos do mesmo indivíduo (Basti *et al.*, 1996; Bateman *et al.*, 1986; Conneally *et al.*, 1978; He & Li, 2000; Lund *et al.*, 1992; Marner *et al.*, 1989; Salmon *et al.*, 1988; Scott *et al.*, 1994). Nas famílias 7 e 8, foram observados mais de um fenótipo nos pacientes afetados.

Existem poucos estudos sobre alterações genéticas relacionadas com catarata congênita na população brasileira. Santana *et al.* (2009) relataram a substituição Y56X no exon 2 do gene *CRYGD* em uma família brasileira com o fenótipo nuclear, resultando em uma proteína truncada com ausência 118 aminoácidos. No mesmo estudo, uma mutação no exon 1 do gene *CRYAA* (R12C) foi relatada.

O presente estudo localizou SNP nos três genes estudados, sendo dois inéditos até o momento, e uma mutação inédita em um dos genes analisados. No gene *CRYAA*, foram localizados os SNP D2D (rs872331C>T) e Y18Y (rs61729442C>T), ambos já descritos previamente (Hattori *et al.*, 2000; Santana *et al.*, 2009; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>), além do inédito SNP G137G. No gene *CRYGC*, foram encontrados o SNP S119S (rs61736036C>T), já descrito na literatura (Santana *et al.*, 2009), e o inédito SNP G41G. No gene *CRYGD*, foi localizado o SNP R95R (rs2305430A>G), previamente descrito (Hillier *et al.*, 2005; Santana *et al.*, 2009; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>) e a mutação Y134C, inédita até então.

O SNP D2D, no gene *CRYAA*, é encontrado em cerca de 49% da população mundial (Hattori *et al.*, 2000). Esteve presente em 70% dos casos analisados. Foi localizado em 80% dos casos-índice estudados. Nos casos em que foi localizado, apresentou-se em heterozigose em 62,5% e em homozigose em 38,5%.

O SNP Y18Y, no gene *CRYAA*, foi localizado em heterozigose em dois indivíduos da família 2, incluindo o caso-índice. Trata-se de um SNP de rara ocorrência na população mundial (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>).

O SNP G137G, no gene *CRYAA*, foi localizado em heterozigose em 65% dos indivíduos analisados, estando presente em 60% dos casos-índice. Não há descrição prévia dessa alteração na literatura mundial. Trata-se de uma variação que não perturba a função da proteína α A-cristalina. É provável que essa alteração funcione como marcador genético não identificado nesta região, tornando as famílias afetadas candidatas a estudos de ligação através de marcadores microssatélites nas proximidades do SNP.

O SNP S119S, no gene *CRYGC*, foi localizado em heterozigose em dois indivíduos não-afetados da família 8. Santana *et al.* (2009) encontraram essa alteração em outro estudo com famílias brasileiras, sugerindo que essa variação pode ser exclusiva da população brasileira. O mesmo estudo sugere que esse SNP pode ser um marcador de um gene não identificado localizado nesta região e que sua ausência em alguns indivíduos afetados seria resultado de eventos de recombinação.

O SNP G41G, no gene *CRYGC*, foi encontrado em heterozigose em dois indivíduos da família 8, sendo um deles afetado pelo fenótipo lamelar. Essa alteração era inédita até o momento. Como essa variação não segrega com a doença nem altera a função da proteína γ C-cristalina, não é possível estabelecer sua influência na manifestação da doença. A exemplo da alteração anteriormente citada, é possível que o SNP G41G seja um marcador de um gene não identificado localizado nesta região.

O SNP R95R, no gene *CRYGD*, é encontrado em 35% da população mundial (Hillier *et al.*, 2005). Foi localizado em 85% dos casos analisados. Esteve presente em 80%

dos casos-índice estudados. Nos casos em que foi localizado, apresentou-se em heterozigose em 6,8% e em homozigose em 93,2%.

A mutação Y134C, no gene *CRYGD*, foi encontrada em heterozigose em três indivíduos da família 8, sendo um deles não-afetado, um afetado pelo fenótipo pulverulento e um afetado pelo fenótipo lamelar. Essa variação era inédita antes do presente estudo.

O efeito da substituição do aminoácido causada pela mutação Y134C foi avaliado através dos métodos computacionais Polyphen-2, SIFT e Align-GVGD. A combinação desses algoritmos parece aumentar o valor preditivo em relação à sua análise isolada (Chan *et al*, 2007; Tavtigian *et al.*, 2008). O método SIFT revelou escore de 0.00 para a posição Y134, indicando que a alteração estudada tende a ser intolerante. O método PolyPhen-2 demonstrou escore de 1.000, mostrando que o aminoácido tirosina é altamente conservado entre as espécies e que as diferenças físico-químicas entre a proteína selvagem e a proteína mutante sugerem provável dano à forma mutante. Finalmente, o método Align-GVGD apresentou escore de 193.72, demonstrando que a substituição é provavelmente deletéria. Santana *et al* (2009) utilizaram os mesmos algoritmos para analisar a mutação R12C no gene *CRYAA* em uma família brasileira com catarata congênita, obtendo resultados similares aos deste estudo.

Sugere-se investigar alterações estruturais em outros genes relacionados à catarata congênita, tais como aqueles relacionados às proteínas de transporte de membranas e aos fatores de transcrição.

6. CONCLUSÕES

No estudo, foram encontrados seis SNP, sendo dois inéditos, e uma mutação inédita na literatura.

No gene *CRYAA*, foram encontrados os SNP D2D, Y18Y e G137G. As duas primeiras alterações já haviam sido descritos na literatura, enquanto a última não era conhecida até o momento.

No gene *CRYGC*, localizaram-se os SNP S119S e G41G, sendo o último inédito na literatura.

No gene *CRYGD*, foram localizados o SNP R95R e a mutação Y134C. O primeiro já havia sido amplamente relatado na literatura, enquanto a última não havia sido descrita até o momento. A mutação Y134C causa uma alteração estrutural potencialmente deletéria na proteína γ D-cristalina.

Como se trata apenas do segundo estudo nacional envolvendo análise genética em pacientes com catarata congênita, sugerem-se novos estudos com análise de outros genes candidatos na população brasileira.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMAYA, L.; TAYLOR, D.; RUSSELL-EGGITT, I.; NISCHAL, K.K.; LENGYEL, D. The Morphology and Natural History of Childhood Cataracts. **Survey of Ophthalmology**, v. 48, n. 2, p. 125-144, 2003.

APPLE, D.J.; RAM, J.; FOSTER, A.; PENG, Q. Elimination of cataract blindness: a global perspective entering the new millennium. **Survey of Ophthalmology**, v. 45, n. 1, p. 196, 2000.

ARKIN, M.; AZAR, D.; FRAIOLI, A. Infantile cataracts. **International Ophthalmology Clinics**, v. 32, n. 1, p. 107-120, 1992.

ARORA, A.; MINOGUE, P.J.; LIU, X.; ADDISON, P.K.; RUSSEL-EGGITT, I.; WEBSTER, A.R.; HUNT, D.M.; EBIHARA, L.; BEYER, E.C.; BERTHOUD, V.M.; MOORE, A.T. A novel connexin50 mutation associated with congenital nuclear pulverulent cataracts. **Journal of Medical Genetics**, v. 45, n. 3, p. 155-160, 2008.

BASTI, S.; RAVISHANKAR, U.; GUPTA, S. Results of a prospective evaluation of three methods of management of pediatric cataracts. **Ophthalmology**, v. 103, n. 5, p. 713-720, 1996.

BATEMAN, J.B.; SPENCE, M.A.; MARAZITA, M.L.; SPARKES, R.S. Genetic linkage analysis of autosomal dominant congenital cataracts. **American Journal of Ophthalmology**, v.101, n. 2, p. 218-225, 1986.

BEBY, F.; MORLE, L.; MICHON, L.; BOZON, M.; EDERY, P.; BURRILLON, C.; DENIS, P. Transmission génétique de la cataracte congenital. **Journal Français d'Ophtalmologie**, v. 26, n. 4, p. 400-408, 2003.

BENNETT, T.M.; MACKAY, D.S.; KNOPE, H.L.S. A novel missense mutation in the gene for gap-junction protein $\alpha 3$ (GJA3) associated with autosomal dominant "nuclear punctuate" cataracts linked to chromosome 13q. **Molecular Vision**, v.10, p. 376-382, 2004.

BERRY, V.; MACKAY, D.; KHALIQ, S.; FRANCIS, P.J.; HAMEED, A.; ANWAR, K.; MEHDI, S.Q.; NEWBOLD, R.J.; IONIDES, A.; SHIELS, A. Connexin 50 mutation in a family with congenital "zonular nuclear" pulverulent cataract of Pakistani origin. **Human Genetics**, v.105, p. 168-170, 1999.

BERRY, V.; FRANCIS, P.; KAUSHAL, S.; MOORE, A.; BHATTACHARYA, S.S. Missense mutations in MIP underlie autosomal dominant "polymorphic" and lamellar cataracts linked to 12q. **Nature Genetics**, v. 25, n. 1, p. 15-17, 2000.

BERRY, V.; FRANCIS, P.; REDDY, M.A.; COLLYER, D.; VITHANA, E.; MACKAY, L.; DAWSON, G.; CAREY, A.H.; MOORE, A.; BHATTACHARYA, S.S.; QUINLAN, R.A. Alpha-B Crystallin Gene (*CRYAB*) Mutation Causes Dominant Congenital Posterior Polar Cataract in Humans. **The American Journal of Human Genetics**, v. 69, n. 5, p. 1141-1145, 2001.

BERRY, V.; FRANCIS, P.J.; PRESCOTT, Q.; WASEEM, N.H.; MOORE, A.T.; BHATTACHARYA, S.S. A novel 1-bp deletion in PITX3 causing congenital posterior polar cataract. **Molecular Vision**, v.17, p. 1249-1253, 2011.

BU, L.; JIN, Y.; SHI, Y.; CHU, R.; BAN, A.; EIBERG, H.; ANDRES, L.; JIANG, H.; ZHENG, G.; QIAN, M.; CUI, B.; XIA, Y.; LIU, J.; HU, L.; ZHAO, G.; HAYDEN, M.R.; KONG, X. Mutant DNA-binding domain of HSF4 is associated with autosomal dominant lamellar and Marner cataract. **Nature Genetics**, v. 31, n. 3, p. 276-278, 2002.

BURDON, K.P.; WIRTH, M.G.; MACKEY, D.A.; RUSSELL-EGGITT, I.M.; CRAIG, J.E.; ELDER, J.E.; DICKINSON, J.L.; SALE, M.M. A novel mutation in the Connexin 46 gene causes autosomal dominant congenital cataract with incomplete penetrance. **Journal of Medical Genetics**, v. 41, n. 8, p. e106, 2004.

CHAN, P.A.; DURAISAMY, S.; MILLER, P.J.; NEWELL, J.A.; MCBRIDE, C.; BOND, J.P.; RAEVAARA, T.; OLLILA, S.; NYSTROM, M.; GRIMM, A.J.; CHRISTODOULOU, J.; OETTING, W.S.; GREENBLATT, M.S. Interpreting missense variants: comparing computational methods in human disease genes CDKN2A, MLH1, MSH2, MECP2, and tyrosinase (TYR). **Human Mutation**, v. 28, p. 683–693, 2007.

CHEN, Q.; MA, J.; YAN, M.; MOTHOB, M.E.; LIU, Y.; ZHENG, F. A novel mutation in *CRYAB* associated with autosomal dominant congenital nuclear cataract in a Chinese family. **Molecular Vision**, v.15, p. 1359-1365, 2009.

CONLEY, Y.P.; ERTURK, D.; KEVERLINE, A.; MAH, T.T.; 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-q22 Is Associated with a Missense Mutation in the Beaded Filament Structural Protein-2. **The American Journal of Human Genetics**, v. 66, n. 4, p. 1426-1431, 2000.

CONNEALLY, P.M.; WILSON, A.F.; MERRITT, A.D.; HELVESTON, E.M.; PALMER, C.G.; WANG, L.Y. Confirmation of genetic heterogeneity in autosomal dominant forms of congenital cataracts from linkage studies. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 22, n.1-6, 295-297, 2008.

COTTA-PEREIRA, G.; RODRIGO, F.G. Elastic System Fibers, and Basement Lamina. In: **Biology and Chemistry of Basement Membranes**. N.A. Kefalides ed. New York: Academic Press, 1978.

COULOMBRE, J.L.; COULOMBRE, A.J. Lens development: fiber elongation and lens orientation. **Science**, v. 142, p. 1489-1490, 1963.

COUTO JÚNIOR, A.S.; PINTO, G.R.; OLIVEIRA, D.A.; HOLZMEISTER, D.; PORTES, A.L.F.; NEURAUTER, R.; PORTES, A.J.F. Prevalência das ametropias e oftalmopatias em crianças pré-escolares e escolares em favelas do Alto da Boa Vista, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 66, n. 5, p. 304-308.

DEVI, R.R.; REENA, C.; VIJAYALAKSHMI, P. Novel mutations in *GJA3* associated with autosomal dominant congenital cataract in the Indian population. **Molecular Vision**, v.11, p. 846-852, 2005.

DEVI, R.R.; VIJAYALAKSHMI, P. Novel mutations in *GJA8* associated with autosomal dominant congenital cataract and microcornea. **Molecular Vision**, v.12, p. 190-195, 2006.

DEVI, R.R.; YAO, W.; VIJAYALAKSHMI, P.; SERGEEV, Y.V.; SUNDARESAN, P.; HEJTMANCIK, J.F. Crystallin gene mutations in Indian families with inherited pediatric cataract. **Molecular Vision**, v.14, p. 1157-1170, 2008.

DUKE-ELDER, S. Congenital deformities. In: Duke-Elder, S. **System of Ophthalmology: Normal and Abnormal Development. Part 2**, v. 3. St. Louis: C.V. Mosby, 1964.

DUKE-ELDER S. **System of Ophthalmology**, v. 14. London: H. Kimpton, 1972.

DUKE-ELDER, S.; WYBAR, K.C. The lens. In: Duke-Elder, S. **System of Ophthalmology: The Anatomy of the Visual System**, v. 2. St. Louis: C.V. Mosby, 1961.

FAWCETT, D.W. **Bloom and Fawcett's Textbook of Histology**. New York: Chapman & Hall, 1994.

FORSHEW, T.; JOHNSON, C.A.; KHALIQ, S.; PASHA, S.; WILLIS, C.; ABBASI, R.; TEE, L.; SMITH, U.; TREMBATH, R.C.; MEHDI, S.Q.; MOORE, A.T.; MAHER, E.R. Locus heterogeneity in autosomal recessive congenital cataracts: linkage to 9q and germline HSF4 mutations. **Human Genetics**, v.117, n. 5, p. 452-459, 2005.

FOSTER, J.E.; ABADI, R.V.; MULDOON, M.; LLOYD, I.C. Grading infantile cataracts. **Ophthalmic and Physiological Optics**, v. 26, p. 372-379, 2006.

FRANCIS, P.J.; BERRY, V.; BHATTACHARYA, S.S.; MOORE, A.T. The genetics of childhood cataract. **Journal of Medical Genetics**, v. 37, p. 481-488, 2000.

GAO, X.; CHENG, J.; LU, C.; LI, X.; LI, F.; LIU, C.; ZHANG, M.; ZHU, S.; MA, X. A novel mutation in the connexin 50 gene (GJA8) associated with autosomal dominant congenital nuclear cataract in a Chinese family. **Current Eye Research**, v. 35, n. 7, p. 597-604, 2010.

GILBERT, C.E.; FOSTER, A.; NEGREL, A.D.; THYLEFORS, B. Childhood blindness: a new form for recording causes of visual loss in children. **Bull World Health Organ**, v. 71, p. 485-489, 1993.

GILL, D.; KLOSE, R.; MUNIER, F.L.; MCFADDEN, M.; PRISTON, M. BILLINGSLEY, G.; DUCREY, N.; SCHORDERET, D.F.; HÉON, E. Genetic Heterogeneity of the Coppock-like Cataract: A Mutation in *CRYBB2* on Chromosome 22q11.2. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 41, p. 159-165, 2000.

GRALEK, M.; KANIGOWSKA, K.; SEROCZYNSKA, M. Cataract in children - not only an ophthalmological problem. **Medycyna Wieku Rozwojowego**, v.11, p. 227-230, 2007.

GRAZIANO, R.M.; LEONE, C.R. Problemas oftalmológicos mais frequentes e desenvolvimento visual do pré-termo extremo. **Jornal de Pediatria**, v. 81, n. 1, p. 95-100.

GU, F.; ZHAI, H.; LI, D.; ZHAO, L.; LI, C.; HUANG, S.; MA, X. A novel mutation in major intrinsic protein of the lens gene (MIP) underlies autosomal dominant cataract in a Chinese family. **Molecular Vision**, v.13, p. 1651-1656, 2007.

GULERIA, K.; VANITA, V.; SINGH, D.; SINGH, J.R. A novel "pearl box" cataract associated with a mutation in the connexin 46 (*GJA3*) gene. **Molecular Vision**, v.13, p. 797-803, 2007.

GULERIA, K.; SPERLING, K.; SINGH, D.; VARON, R.; SINGH, J.R.; VANITA, V. A novel mutation in the connexin 46 (*GJA3*) gene associated with autosomal dominant congenital cataract in an Indian family. **Molecular Vision**, v.13, p. 1657-1665, 2007.

GUNN, R. M. Peculiar coralliform cataract with crystals of cholesterine in the lens. **Transactions of the ophthalmological societies of the United Kingdom**, v. 15, p. 119, 1895.

HADDAD, M.A.O.; LOBATO, F.J.C.; SAMPAIO, M.W.; KARA-JOSÉ, N. Pediatric and adolescent population with visual impairment: study of 385 cases. **Clinics**, v. 61, p. 239-246, 2006.

HANSEN, L.; YAO, W.; EIBERG, H.; FUNDING, M.; RIISE, R.; KJAER, K.W.; HEJTMANCIK, J.F.; ROSENBERG, T. The congenital "ant-egg" cataract phenotype is caused by a missense mutation in connexin46. **Molecular Vision**, v.12, p. 1033-1039, 2006.

HANSEN, L.; EIBERG, H.; ROSENBERG, T. Novel *MAF* mutation in a family with congenital cataract-microcornea syndrome. **Molecular Vision**, v.13, p. 2019-2022, 2007.

HANSEN, L.; YAO, W.; EIBERG, H.; KJAER, K.W.; BAGGESEN, K.; HEJTMANCIK, J.F.; ROSENBERG, T. Genetic Heterogeneity in Microcornea-Cataract: Five Novel Mutations in *CRYAA*, *CRYGD*, and *GJA8*. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 48, p. 3937-3944, 2007.

HATTORI, M.; FUJIYAMA, A.; TAYLOR, T.D.; WATANABE, H.; YADA, T.; PARK, H.S. The DNA sequence of human chromosome 21. **Nature**, v. 405, p. 311-319, 2000.

HE, W.; LI, S. Congenital cataracts: gene mapping. **Human Genetics**, v. 106, p. 1-13, 2000.

HEJTMANCIK, J.F. Congenital Cataracts and their Molecular Genetics. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 19, n. 2, p. 134-149, 2008.

HEON, E.; PRISTON, M.; SCORDERET, D.F.; BILINGSLEY, G.D.; GIRARD, P.O.; LUBSEN, N.; MUNIER, F.L. The γ -Crystallins and Human Cataracts: A Puzzle Made Clearer. **The American Journal of Human Genetics**, v. 65, n. 5, p. 1261-1267, 1999.

HILLES, D.A.; CARTER, B.T. Classification of cataracts in children. **International Ophthalmology Clinics**, v. 17, n. 4, p. 15-29, 1977.

HILLIER, L.W.; GRAVES, T.A.; FULTON, R.S.; FULTON, L.A.; PEPIN, K.H., MINX, P. Generation and annotation of the DNA sequences of human chromosomes 2 and 4, **Nature**, v. 434, p. 724-731, 2005.

HOGAN, M.J.; ALVARADO, J.A.; WEDDELL, J.E. **Histology of the Human Eye: An Atlas and Textbook**, Philadelphia: W.B. Saunders Co, 1971.

HU, S.; WANG, B.; ZHOU, Z.; ZHOU, G.; WANG, J.; MA, X.; QI, Y. A novel mutation in *GJA8* causing congenital cataract-microcornea syndrome in a Chinese pedigree. **Molecular Vision**, v.16, p. 1585-1592, 2010.

JAKOBS, P.M.; HESS, J.F.; FITZGERALD, P.G.; KRAMER, P.; WELEBER, R.G.; LITT, M. Autosomal-dominant congenital cataract associated with deletion mutation in the human beaded filament protein gene *BFSP2*. **The American Journal of Human Genetics**, v. 66, n. 4, p. 1432-1436, 2000.

JAMIESON, R.V.; PERVEEN, R.; KERR, B.; CARETTE, M.; YARDLEY, J.; HEON, E.; WIRTH, M.G.; VAN HEYNINGEN, V.; DONNAI, D.; MUNIER, F.; BLACK, G.C. Domain disruption and mutation of the bZIP transcription factor, *MAF*, associated with cataract, ocular anterior segment dysgenesis and coloboma. **Human Molecular Genetics**, v.11, n.1, p. 33-42, 2002.

JIANG, H.; JIN, Y.; BU, L.; ZHANG, W.; LIU, J.; CUI, B.; KONG, X.; HU, L. A novel mutation in *GJA3* (connexin46) for autosomal dominant congenital nuclear pulverulent cataract. **Molecular Vision**, v.9, p. 38-44, 2009.

JIANG, J.; JIN, C.; WANG, W.; TANG, X.; SHENTU, X.; WU, R.; WANG, Y.; XIA, K.; YAO, K. Identification of a novel splice-site mutation in MIP in a Chinese congenital cataract family. **Molecular Vision**, v.15, p. 579-583, 2003.

KANNABIRAN, C.; ROGAN, P.K.; OLMOS, L.; BASTI, S.; RAO, G.N.; KAISER-KUPFER, M.; HEJTMANCIK, J.F. Autosomal dominant zonular cataract with sutural opacities is associated with a splice mutation in the $\beta A3/A1$ -crystallin gene. **Molecular Vision**, v.4, p. 18-23, 1998.

KANSKI, J.J. Lens. In: KANSKI, J.J. **Clinical Ophthalmology – A Systematic Approach**. 5.ed. USA: Elsevier, 2004.

KARA-JOSÉ, N.; ALMEIDA, G.V.; ARIETA, C.E.L.; ARAÚJO, J.S.; BECHARA, S.J.; OLIVEIRA, P.R. Causas de deficiência visual em crianças. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, v. 97, n. 5, p. 405-413, 1984.

KE, T.; WANG, Q.K.; JI, B.; WANG, X.; LIU, P.; ZHANG, X.; TANG, Z.; REN, X.; LIU, M. Novel HSF4 mutation causes congenital total white cataract in a Chinese family. **American Journal of Ophthalmology**, v.142, n. 2, p. 298-303, 2006.

KHAN, A.O.; ALDAHMEH, M.A.; MEYER, B. Recessive congenital total cataract with microcornea and heterozygote carrier signs caused by a novel missense *CRYAA* mutation (R54C). **American Journal of Ophthalmology**, v.144, **American Journal of Ophthalmology**, v.144, n. 6, p. 949-952, 2007.

KMOCH, S.; BRYNDA, J.; ASFAW, B.; BEZOUSKA, K.; NOVAK, P.; REZACOVA, P.; ODROVA, L.; FILIPEC, M.; SEDLACEK, J.; ELLEDER, M. Link between a novel human γ D-crystallin allele and a unique cataract phenotype explained by protein crystallography. **Human Molecular Genetics**, v. 9, p. 1779-1786, 2000.

KUMAR, G.S.; KYLE, J.W.; MINOGUE, P.J.; KUMAR, K.D.; VASANTHA, K.; BERTHOUD, V.M.; BEYER, E.C.; SATHIYAVEDU, S.T. An MIP/AQP0 mutation with impaired trafficking and function underlies an autosomal dominant congenital lamellar cataract. **Experimental Eye Research**. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1016/j.exer.2012.10.010>>. Acesso em 15 nov. 2012.

KUMAR, M.; AGARWAL, T.; KHOKHAR, S.; KUMAR, M.; KAUR, P.; ROY, T.S.; DADA, R. Mutation screening and genotype phenotype correlation of α -crystallin, γ -crystallin and GJA8 gene in congenital cataract. **Molecular Vision**, v.17, p. 693-707, 2011.

KUZSAK, J.R. Development of sutures in the lens. **Progress in retinal and eye research**, v.14, p. 567-591, 1995.

KUZSAK, J.R.; ZOLTOSKI, R.K.; SIVERTSON, C. Fibre cell organization in crystalline lenses. **Experimental Eye Research**, v. 78, p. 673-687, 2004.

LAMBERT, S.; DRACK, A. Infantile cataracts. **Survey of Ophthalmology**, v. 40, p. 427-458, 1996.

LI, F.; WANG, S.; GAO, C.; LIU, S.; ZHAO, B.; ZHANG, M.; HUANG, S.; ZHU, S.; MA, X. Mutation G61C in the *CRYGD* gene causing autosomal dominant congenital coralliform cataracts. **Molecular Vision**, v.14, p. 378-386, 2008.

LI, X.Q.; CAI, H.C.; ZHOU, S.Y.; YANG, J.H.; XI, Y.B.; GAO, X.B.; ZHAO, W.J.; LI, P.; ZHAO, G.Y.; TONG, Y.; BAO, F.C.; MA, Y.; WANG, S.; YAN, Y.B.; LU, C.L.; MA, X. A novel mutation impairing the tertiary structure and stability of γ C-crystallin (*CRYGC*) leads to cataract formation in humans and zebrafish lens. **Human Mutation**, v. 33, n. 2, p. 391-401, 2012.

LI, Y.; WANG, J.; DONG, B.; MAN, H. A novel connexin 46 (GJA3) mutation in autosomal dominant congenital nuclear pulverulent cataract. **Molecular Vision**, v.10, p. 668-671, 2004.

LIN, H.; HEJTMANCIK, J.F.; QI, Y. A substitution of arginine to lysine at the COOH-terminus of MIP caused a different binocular phenotype in a congenital cataract family. **Molecular Vision**, v.13, p. 1822-1827, 2007.

LIN, Y.; LIU, N.N.; LEI, C.T.; FAN, Y.C.; LIU, X.Q.; YANG, Y.; WANG, J.F.; LIU, B.; YANG, Z.L. A novel GJA8 mutation in a Chinese family with autosomal dominant congenital cataract. **Chinese Journal of Medical Genetics**, v. 25, n. 1, 59-62, 2008.

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 β -Crystallin Gene *CRYBB2*. **Human Molecular Genetics**, v. 6, p. 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 crystalline gene *CRYAA*. **Human Molecular Genetics**, v. 7, p. 471-474, 1998.

LIU, M.; KE, T.; WANG, Z.; YANG, Q.; CHANG, W.; JIANG, F.; TANG, Z.; LI, H.; REN, X.; WANG, X.; WANG, T.; LI, Q.; YANG, J.; LIU, J.; WANG, Q.K. Identification of a *CRYAB* mutation associated with autosomal dominant posterior polar cataract in a

Chinese family. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 47, n. 8, p. 3461-3465, 2006.

LIU, Y.; ZHANG, X.; LUO, L.; WU, M.; ZENG, R.; CHENG, G.; HU, B.; LIU, B.; LIANG, J.J.; SHANG, F. A novel alphaB-crystallin mutation associated with autosomal dominant congenital lamellar cataract. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 47, n. 3, p. 1069-1075, 2006.

LUCAS, M.B.; LEAL, D.B.; TAVARES, S.S.; BARROS, E.A.; ARANHA, S.T. Condutas reabilitacionais em pacientes com baixa visão. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 66, p. 77-82, 2003.

LUND, A.M.; EIBERG, H.; ROSENBERG, T.; WARBURG, M. Autosomal dominant congenital cataract; linkage relations; clinical and genetic heterogeneity. **Clinical genetics**, v. 41, n. 2, p. 65-69, 1992.

MA, X.; LI, F.F.; WANG, S.Z.; GAO, C.; ZHANG, M.; ZHU, S.Q. A new mutation in BFSP2 (G1091A) causes autosomal dominant congenital lamellar cataracts. **Molecular Vision**, v.14, p. 1906-1911, 2008.

MACKAY, D.; IONIDES, A.; BERRY, V.; MOORE, A.; BHATTACHARYA, S.; SHIELS, A. A new locus for dominant “zonular pulverulent” cataract, on chromosome 13. **The American Journal of Human Genetics**, v. 60, p. 1474-1478, 1997.

MANN, I. **The development of the human eye**. New York: Grune and Stratton Inc., 1961.

MARNER, E.; ROSENBERG, T.; EIBERG, H. Autosomal dominant congenital cataract. Morphology and genetic mapping. **Acta of Ophthalmology**, v. 67, p. 151-158, 1989.

MESSINA-BASS, O.M.; GONZALES-HUERTA, L.M.; CUEVAS-COVARRUBIAS, S.A. Two affected siblings with nuclear cataract associated with a novel missense mutation in the *CRYGD* gene. **Molecular Vision**, v.12, p. 995-1000, 2006.

MOTHOB, M.E.; GUO, S.; LIU, Y.; CHEN, Q.; YUSSUF, A.S.; ZHU, X.; FANG, Z. Mutation analysis of congenital cataract in a Basotho family identified a new missense allele in *CRYBB2*. **Molecular Vision**, v.15, p. 1470-1475, 2009.

OSHER, R.H.; YU, B.C.; KOCH, D.D. Posterior polar cataracts: a predisposition to intraoperative posterior capsular rupture. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v. 16, n. 2, p. 157-162, 1990.

PADMA, T.; AYYAGARI, R.; MURTY, J.S.; BASTI, S.; FLETCHER, T.; RAO, G.N.; KAISER-KUPFER, M.; HEJTMANCIK, J.F. Autosomal dominant zonular cataract with sutural opacities localized to chromosome 17q11-12. **The American Journal of Human Genetics**, v. 57, p. 840-845, 1995.

PAULI, S.; SÖKER, T.; KLOPP, N.; ILLIG, T.; ENGEL, W.; GRAW, J. Mutation analysis in a German family identified a new cataract-causing allele in the *CRYBB2* gene. **Molecular Vision**, v.13, p. 962-967, 2007.

POLYAKOV, A.V.; SHAGINA, I.A.; KHLEBNIKOVA, O.V.; EVGRAFOV, O.V. Mutation in the connexin 50 gene (GJA8) in a Russian family with zonular pulverulent cataract. **Clinical Genetics**, v. 60, n. 6, p. 476-478, 2001.

PRAS, E.; FRYDMAN, M.; LEVY-NISSENBAUN, E.; BAKHAN, T.; RAZ, J.; ASSIA, E.I.; BOLESLAW, G.; PRAS, E. A Nonsense Mutation (W9X) in *CRYAA* Causes Autosomal Recessive Cataract in an Inbred Jewish Persian Family. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 41, p. 3511-3515, 2000.

RAHI, J.S. Childhood blindness: a UK epidemiological perspective. **Eye**, v. 21, p. 1249-1253, 2007.

REDDY, M. A.; FRANCIS, P. J.; BERRY, V.; BHATTACHARYA, S. S.; MOORE, A. T. Molecular genetic basis of inherited cataract and associated phenotypes. **Survey of Ophthalmology**, v. 49, n. 3, p. 300-315, 2004.

RESS, M.I.; WATTS, P.; FENTON, I.; CLARKE, A.; SNELL, R.G.; OWEN, M.J.; GRAY, J. Further evidence of autosomal dominant congenital zonular pulverulent cataracts linked to 13q11 (CZP3) and a novel mutation in connexin 46 (GJA3). **Human Genetics**, v. 106, p. 206-209, 2000.

ROCHE, O.; BEBY, F.; ORSSAUD, C.; DUPONT MONOD, S.; DUFIER, J. L. Cataracte congénitale. **Journal Français d'Ophtalmologie**, v. 29, n. 4, p. 443-455, 2006.

ROSHAN, M.; VIJAYA, P.H.; LAVANYA, G.R.; SHAMA, P.K.; SANTHIYA, S.T.; GRAW, J.; GOPINATH, P.M.; SATYAMOORTHY, K. A novel human *CRYGD* mutation in a juvenile autosomal dominant cataract. **Molecular Vision**, v.16, p. 887-896, 2010.

SAFIEH, L.A.; KHAN, A.O.; ALKURAYA, F.S. Identification of a novel *CRYAB* mutation associated with autosomal recessive juvenile cataract in a Saudi family. **Molecular Vision**, v.15, p. 980-984, 2009.

SAJJAD, N.; GOEBEL, I.; KAKAR, N.; CHEEMA, A.M.; KUBISCH, C.; AHMAD, J. A novel HSF4 gene mutation (p.R405X) causing autosomal recessive congenital cataracts in a large consanguineous family from Pakistan. **Biomed Central Medical Genetics**, v. 9, p. 99, 2008.

SAKAI, L.Y.; KEENE, D.R.; ENGVALL, E. Fibrillin, a new 350-kD glycoprotein, is a component of extracellular microfibrils. **The Journal of Cell Biology**, v. 103, p. 2499-2509, 1986.

SALMON, J.F.; WALLIS, C.E.; MURRAY, A.D.N. Variable expressivity of autosomal dominant microcornea with cataract. **Archives of ophthalmology**, v. 106, n. 4, p. 505, 1988.

SALZMANN, M. The anatomy and histology of the human eyeball. Chicago: Deuticke, 1912.

SANTANA, A. **Avaliação estrutural dos genes *CRYAA*, *CRYGC* e *CRYGD* em pacientes portadores de catarata congênita autossômica dominante**. 2009. 110p. São Paulo: Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo (Tese de Doutorado).

SANTANA, A.; WAISWOL, M.; ARCIERI, E.S.; VASCONCELLOS, J.P.C.; MELO, M.B. Mutation analysis of *CRYAA*, *CRYGC*, and *CRYGD* associated with autosomal dominant congenital cataract in Brazilian families. **Molecular Vision**, v.15, p. 793-800, 2009.

SANTHIYA, S.T.; MANOHAR, M.S.; RAWLLEY, D.; VIJAYALASKSHMI, P.; NAMPERUMALSAMY, P.; GOPINATH, P.M.; LÖSTER, J.; GRAW, J. Novel mutations in the γ -crystallin genes cause autosomal dominant congenital cataracts. **Journal of Medical Genetics**, v. 39, p. 352-358, 2002.

SANTHIYA, S.T.; MANISASTRY, S.M.; RAWLLEY, D.; MALATHI, R.; ANISHETTY, S.; GOPINATH, P.M.; VIJAYALASKSHMI, P.; NAMPERUMALSAMY, P.; ADAMSKI, J.; GRAW, J. Mutation Analysis of Congenital Cataracts in Indian Families: Identification of SNPs and a New Causative Allele in *CRYBB2* Gene. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 45, p. 3599-3607, 2004.

SANTHIYA, S.T.; SOKER, T.; KLOPP, N.; ILLIG, T.; PRAKASH, M.V.; SELVARAJ, B.; GOPINATH, P.M.; GRAW, J. Identification of a novel, putative cataract-causing allele in *CRYAA* (G98R) in an Indian family. **Molecular Vision**, v.12, p. 768-773, 2006.

SANTHIYA, S.T.; KUMAR, G.S.; SUDHAKAR, P.; GUPTA, N.; KLOPP, N.; ILLIG, T.; SÖKER, T.; GROTH, M.; PLATZER, M.; GOPINATH, P.M.; GRAW, J. Molecular analysis of cataract families in India: new mutations in the *CRYBB2* and *GJA3* genes and rare polymorphisms. **Molecular Vision**, v.16, p. 1837-1847, 2010.

SCHMIDT, W.; KLOPP, N.; ILLIG, T.; GRAW, J. A novel *GJA8* mutation causing a recessive triangular cataract. **Molecular Vision**, v.14, p. 851-856, 2008.

SCHIMITI, R.B.; COSTA, V.P.; GREGUI, M.J.F.; KARA-JOSÉ, N.; TEMPORINI, E.R. Prevalence of refractive errors and ocular disorders in preschool and school children of Ipirorã - PR, Brazil (1989 to 1996). **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 64, n. 5, p. 379-384.

SCOTT, M.H.; HEJTMANCIK, J.F.; WOZENCRAFT, L.A.; REUTER, L.M.; PARKS, M.M.; KAISER-KUPFER, M. I. Autosomal dominant congenital cataract. Interocular phenotypic variability. **Ophthalmology**, v. 101, n. 5, p. 866, 1994.

SEMINA, E.V.; FERREL, R.E.; MINTZ-HITTNER, H.A.; BITOUN, P.; ALWARD, W.L.M.; 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. **Nature Genetics**, v. 19, p. 167-170, 1998.

SHIELDS, 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. **The American Journal of Human Genetics**, v. 62, p. 526-532, 1998.

SHIELDS, A.; HEJTMANCIK, J.F. Genetic Origins of Cataract. **Archives of Ophthalmology**, v. 125, p. 165-173, 2007.

SPALTON, D. Cristalino. In: SPALTON, D.; HITCHINGS, R.A.; HUNTER, P.A. **Atlas de Oftalmologia Clínica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. p. 334-362.

STAFFORD, M.J. The histology and biology of the lens. Disponível em: <<http://www.optometry.co.uk>>. Acesso em 10 jan. 2011.

STEPHAN, D.A.; GILLANDERS, E.; VANDERVEEN, D.; FREAS-LUTZ, D.; WISTOW, G.; BAXEVANIS, A.D.; ROBBINS, C.M.; AUKEN, A.V.; QUESENBERY, M.I.; BAILEY-WILSON, J.; JUO, S.H.; TRENT, J.M.; SMITH, L.; BROWNSTEIN, M.J. Progressive juvenile-onset punctate cataracts caused by mutation of the γ D-crystallin gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 96, n. 3, p. 1008-1012, 1999.

TAVTIGIAN, S.V.; GREENBLATT, M.S.; LESUEUR, F.; BYRNES, G.B. In Silico Analysis of Missense Substitutions Using Sequence-Alignment Based Methods. **Human Mutation**, v. 29, n. 11, 1327-1336, 2008.

THOMPSON, J.S.; THOMPSON, M.W. **Genetics in Medicine**. 2.ed. Philadelphia: W.B Saunders Co, 1973.

TROKEL, S. The physical basis for transparency of the crystalline lens. **Investigative Ophthalmology**, v. 1, n. 4, p. 493-501, 1962.

VANITA, V.; HENNIES, H.C.; SINGH, D.; NÜRNBERG, P.; SPERLING, K.; SINGH, J.R. A novel mutation in *GJA8* associated with autosomal dominant congenital cataract in a family of Indian origin. **Molecular Vision**, v.12, p. 1217-1222, 2006.

VANITA, V.; SINGH, D.; ROBINSON, P.N.; SPERLING, K.; SINGH, J.R. A novel mutation in the DNA-binding domain of MAF at 16q23.1 associated with autosomal dominant "cerulean cataract" in an Indian family. **American Journal of Medical Genetics**, v. 140A, n. 6, p. 558-566, 2006.

VANITA, V.; SINGH, J.R.; SINGH, D.; VARON, R.; SPERLING, K. A novel mutation in *GJA8* associated with jellyfish-like cataract in a family of Indian origin. **Molecular Vision**, v.14, p. 323-326, 2008.

VANITA, V.; SINGH, J.R.; SINGH, D.; VARON, R.; SPERLING, K. Novel mutation in the gamma-S crystallin gene causing autosomal dominant cataract. **Molecular Vision**, v.15, p. 47-481, 2009.

VASAVADA, A.; SINGH, R. Phacoemulsification in eyes with posterior polar cataract. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v. 25, n. 2, p. 238-245, 1999.

VOGT, A. Die spezifität der brenner und erworbenen starformen für die einzelnen linzenzonen. **Albrecht von Graefes Archiv für klinische und experimentelle Ophthalmologie**, v. 108, p. 219-228, 1922.

XIAO, X.; LI, W.; WANG, P.; LI, L.; LI, S.; JIA, X.; SUN, W.; GUO, X.; ZHANG, Q. Cerulean cataract mapped to 12q13 and associated with a novel initiation codon mutation in MIP. **Molecular Vision**, v.17, p. 2049-2055, 2011.

YAN, M.; XIONG, C.; YE, S.Q.; CHEN, Y.; KE, M.; ZHENG, F.; ZHOU, X. A novel connexin 50 (*GJA8*) mutation in a Chinese family with a dominant congenital pulverulent nuclear cataract. **Molecular Vision**, v.14, p. 418-424, 2008.

YANG, G.; ZHANG, G.; WU, Q.; ZHAO, J. A novel mutation in the MIP gene is associated with autosomal dominant congenital nuclear cataract in a Chinese family. **Molecular Vision**, v.17, p. 1320-1323, 2011.

YAO, K.; JIN, C.; ZHU, N.; WANG, W.; WU, R.; JIANG, J.; SHENTU, X. A nonsense mutation in *CRYGC* associated with autosomal dominant congenital nuclear cataract in a Chinese family. **Molecular Vision**, v.14, p. 1272-1276, 2008.

WANG, B.; YU, C.; XI, Y.B.; CAI, H.C.; WANG, J.; ZHOU, S.; ZHOU, S.; WU, Y.; YAN, Y.B.; MA, X.; XIE, L. A novel *CRYGD* mutation (p.Trp43Arg) causing autosomal dominant congenital cataract in a Chinese family. **Human Mutation**, v. 32, n. 1, p. E1939-E1947, 2011.

WANG, K.; WANG, B.; WANG, J.; ZHOU, S.; YUN, B.; SUO, P.; CHENG, J.; MA, X.; ZHU, S. A novel *GJA8* mutation (p.I31T) causing autosomal dominant congenital cataract in a Chinese family. **Molecular Vision**, v.15, p. 2813-2820, 2009.

WANG, K.J.; LI, S.S.; YUN, B.; MA, W.X.; JIANG, T.G.; ZHU, S.Q. A novel mutation in MIP associated with congenital nuclear cataract in a Chinese family. **Molecular Vision**, v.17, p. 70-77, 2011.

WANG, W.; JIANG, J.; ZHU, Y.; LI, J.; JIN, C.; SHENTU, X.; YAO, K. A novel mutation in the major intrinsic protein (MIP) associated with autosomal dominant congenital cataracts in a Chinese family. **Molecular Vision**, v.16, p. 534-539, 2010.

WEISS, L. **Cell and tissue biology: a textbook of histology**. 6. ed. Baltimore: Urban & Schwarzenberg, 1988.

WILLOUGHBY, C.E.; ARAB, S.; GANDHI, R.; ZEINALI, S.; ARAB, S.; LUK, D.; BILLINGSLEY, G.; MUNIER, F.L.; HÉON, E. A novel GJA8 mutation in an Iranian family with progressive autosomal dominant congenital nuclear cataract. **Journal of Medical Genetics**, v. 40, n. 11, p. e124, 2003.

ZHANG, L.; FU, S.; OU, Y.; ZHAO, T.; SU, Y.; LIU, P. A novel nonsense mutation in *CRYGC* is associated with autosomal dominant congenital nuclear cataracts and microcornea. **Molecular Vision**, v.15, p. 276-282, 2009.

ZHANG, L.; QU, X.; SU, S.; GUAN, L.; LIU, P. A novel mutation in GJA3 associated with congenital Coppock-like cataract in a large Chinese family. **Molecular Vision**, v. 18, p. 2114-2118, 2012.

ZHANG, L.Y.; GONG, B.; TONG, J.P.; FAN, D.S.; CHIANG, S.W.; LOU, D.; LAM, D.S.; YAM, G.H.; PANG, C.P. A novel gammaD-crystallin mutation causes mild changes in protein properties but leads to congenital coralliform cataract. **Molecular Vision**, v.15, p. 1521-1529, 2009.

ZHANG, L.Y.; YAM, G.H.; FAN, D.S.; TAM, P.O.; LAM, D.S.; PANG, C.P. A novel deletion variant of gammaD-crystallin responsible for congenital nuclear cataract. **Molecular Vision**, v.13, p. 2096-2104, 2007.

ZHANG, X.; WANG, L.; WANG, J.; DONG, B.; LI, Y. Coralliform cataract caused by a novel connexin46 (GJA3) mutation in a Chinese family. **Molecular Vision**, v.18, p. 203-210, 2012.

ZHOU, Z.; HU, S.; WANG, B.; ZHOU, N.; ZHOU, S.; MA, X.; QI, Y. Mutation analysis of congenital cataract in a Chinese family identified a novel missense mutation in the connexin 46 gene (GJA3). **Molecular Vision**, v.16, p. 713-719, 2010.

ZETTERSTRÖM, C.; LUNDVALL, A.; KUGELBERG, M. Cataracts in children. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v. 31, p. 824-840, 2005.

8. FONTES CONSULTADAS

ALIGN-GVGD, <http://agvgd.iarc.fr>.

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

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

POLYPHEN-2, <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>.

SIFT, <http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html>.

ANEXO 1



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

✉ Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP

☎ (0_19) 3521-8936

FAX (0_19) 3521-7187

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

Termo de consentimento livre e esclarecido

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

Informações sobre a pesquisa:

Título do projeto: Estudo de alterações estruturais nos genes *CRYAA*, *CRYGC* e *CRYGD* em pacientes com catarata congênita.

Pesquisador responsável: Eugênio Santana de Figueiredo

Telefone para contato: 019 3521 7110

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

Para participar do estudo, é necessário colher uma amostra de 10 a 20 ml de sangue (o equivalente a duas colheres de sopa), como é feito em exames para anemia, glicose, etc, tanto do paciente com catarata quanto de seus familiares. O exame é muito seguro e, fora o desconforto da injeção, não costuma causar efeitos colaterais. O sangue será colhido apenas uma vez e estocado para análise atual ou futura. O exame oftalmológico realizado será o de costume no ambulatório.

O participante do estudo não receberá qualquer valor em dinheiro. Os resultados serão publicados, mas sua identidade será preservada. Em caso de dúvidas e ou reclamações, entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP nos telefones (19) 3521-8936 e (19) 3521-7187.

Consentimento

Eu, _____ RG _____, abaixo assinado, estou de acordo em participar do estudo proposto acima, como sujeito. Foi devidamente informado (a) e esclarecido pelo pesquisador _____ sobre a pesquisa e os procedimentos nela envolvidos, inclusive sobre o estoque do material biológico colhido. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer instante, sem prejuízo em meu acompanhamento ou tratamento.

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

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

Local e data:_____

Nome do paciente:_____

Nome e assinatura do responsável legal:_____.

ANEXO 2

Extração de DNA a partir de sangue periférico

1ª PARTE

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

2ª PARTE

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

ANEXO 3

Purificação da reação de sequenciamento

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

ANEXO 4

Alterações estruturais localizadas nas famílias analisadas no estudo.

Família	Alteração Estrutural		
	<i>CRYAA</i>	<i>CRYGC</i>	<i>CRYGD</i>
1	D2D, G137G		R95R
2	D2D, Y18Y, G137G		R95R
3	D2D, G137G		
4	D2D, G137G		R95R
5	D2D, G137G		R95R
6	D2D, G137G		R95R
7	D2D, G137G		R95R
8	D2D, G137G	G41G, S119S	R95R, Y134C
9	D2D, G137G		
10	D2D, G137G		R95R

Novel human *CRYGD* rare variant in a Brazilian family with congenital cataract

Eugênio Santana de Figueirêdo,^{1,2} Gabriel Gorgone Giordano,¹ Anderson Tavares,² Márcio José da Silva,² José Paulo Cabral de Vasconcellos,^{1,2} Carlos Eduardo Leite Arieta,¹ Mônica Barbosa de Melo²

¹Department of Ophthalmology, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas - UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil;

²Laboratory of Human Molecular Genetics, Center of Molecular Biology and Genetic Engineering (CBMEG), University of Campinas - UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil

Purpose: To describe a novel polymorphism in the γ D-crystallin (*CRYGD*) gene in a Brazilian family with congenital cataract.

Methods: A Brazilian four-generation family was analyzed. The proband had bilateral lamellar cataract and the phenotypes were classified by slit lamp examination. Genomic DNA was extracted from peripheral blood and coding regions and intron/exon boundaries of the α A-crystallin (*CRYAA*), γ C-crystallin (*CRYGC*), and *CRYGD* genes were amplified by polymerase chain reaction and directly sequenced.

Results: Sequencing of the coding regions of *CRYGD* showed the presence of a heterozygous A→G transversion at c. 401 position, which results in the substitution of a tyrosine to a cysteine (Y134C). The polymorphism was identified in three individuals, two affected and one unaffected.

Conclusions: A novel rare variant in *CRYGD* (Y134C) was detected in a Brazilian family with congenital cataract. Because there is no segregation between the substitution and the phenotypes in this family, other genetic alterations are likely to be present.

Congenital cataract is characterized by the presence of an opacification of the lens at birth or during the first decade of life [1-5]. If untreated, it can result in significant visual impairment and even blindness [1]. This condition remains a leading cause of reversible childhood blindness in the world [4].

There are several causes for congenital cataract including metabolic disorders, infections during embryogenesis, gene defects, and chromosomal abnormalities [4]. About 8%-25% of congenital cataracts have hereditary etiology [4,6]. The most common mode of inheritance is autosomal dominant with high penetrance [4,7,8]. Inherited congenital cataracts exhibit a high interfamilial and intrafamilial phenotypic variability with a significant genotypic heterogeneity [1,4].

The water-soluble lens crystallin proteins (α -, β -, and γ -crystallins) account for approximately 90% of the total lens proteins and perform an important function in maintaining the transparency of the lens [1,4,7,9-11]. α -Crystallins exhibit chaperone-like activity and are present in high concentrations in the lens [4,11]. β - and γ -Crystallins have two domains composed of two highly stable protein structures called "Greek key" motifs [1,4,12]. The presence of α - and β - γ -

crystallins within the lens makes their encoding genes excellent candidates for congenital cataract, with several mutations already described [1,4,11].

In the present study, the analysis of the α A-crystallin (*CRYAA*), γ C-crystallin (*CRYGC*), and γ D-crystallin (*CRYGD*) genes was performed in a large Brazilian family presenting congenital cataract with phenotypic variability and suggestive high genetic heterogeneity.

METHODS

The study protocols adhered to the tenets of the Declaration of Helsinki and were approved by the Research Ethics Committees of the Faculty of Medical Sciences of the University of Campinas (Campinas, SP, Brazil). Appropriate informed consent from each participant was obtained.

Patients and clinical data: A Brazilian family of four generations (8 affected members and 30 unaffected members) was investigated at the University of Campinas Ophthalmology Department. Affected status was determined by ophthalmic examination that included visual function, slit lamp examination, measurement of intraocular pressure, and fundus evaluation with dilated pupil. Cataract was classified based on its characteristics present at slit lamp evaluation or by the analysis of patients' records who presented a history of cataract extraction. Detailed ocular, medical, and family histories were obtained from each available family member. Individuals had no suggestive history of intrauterine infection, unilateral cataract, and other ocular or systemic disorders.

Correspondence to: Eugênio Santana de Figueirêdo, Department of Ophthalmology, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas - UNICAMP, R. Tessália Vieira de Camargo, 126, Campinas, São Paulo, Brazil, 13083-887; Phone: +55-19-3521-7380; FAX: 55-88-3512-1489; email: eugsantana@ig.com.br

TABLE 1. PRIMERS FOR PCR AMPLIFICATION OF THE *CRYAA*, *CRYGC*, AND *CRYGD* GENES, PRODUCT SIZES, AND ANNEALING TEMPERATURES.

Gene	Exon	Strand	Sequence (5'→3')	Fragment Size (bp)	T (°C)
<i>CRYAA</i>	1	sense	CACGCCTTTCCAGAGAAATC	466	63.9
	1	antisense	CTCTGCAAGGGGATGAAGTG		
	2	sense	CTTGGTGTGTGGGAGAAGAGG	377	58.0
	2	antisense	TCCCTCTCCAGGGTTGAAG		
	3	sense	CCCCCTTCTGCAGTCAGT	989	57.0
	3	antisense	GCTTGAGCTCAGGAGAAGGA		
<i>CRYGC</i>	1-2	sense	ACCAGAGAACAAGGACACAATC	674	66.6
	1-2	antisense	TGGCTTATTCAGTCTCTGATG		
	3	sense	ATTCCATGCCACAACCTACC	590	66.3
	3	antisense	CCAACGCTCTGAGGCTTGTTT		
<i>CRYGD</i>	1-2	sense	CCCTTTTGTGCGGTTCTTG	596	54.0
	1-2	antisense	TTTGTCCACTCTCAGTTATTGTGAC		
	3	sense	TGTGCTCGGTAATGAGGAG	700	61.0
	3	antisense	AGGCCAGAGAATCAAAATGAG		

Fifty subjects without diagnostic features of congenital cataract were recruited as normal controls, representing a sample of the Brazilian population.

Genomic DNA preparation and molecular analysis: Venous blood (5–10 ml) was collected for genomic DNA extraction and subsequent molecular genetic analysis. Polymerase chain reaction (PCR) was used to amplify all the exons and intron/exon boundaries of the candidate genes (*CRYAA*, *CRYGC* and *CRYGD*). The PCR cycling conditions were: initial denaturation at 94 °C for 5 min followed by 35 cycles of 94 °C for 1 min, X °C for 1 min, 72 °C for 1 min, and final extension at 72 °C for 7 min. Amplification of samples was performed in a "Mastercycler EP Gradient S" thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Germany). Oligonucleotide primer pairs, PCR product sizes, and annealing temperatures are described in Table 1. PCR products were electrophoresed in 1.5% agarose gels containing 0.05% ethidium bromide, purified, and submitted to direct sequencing on the ABI PRISM 3700 Genetic Analyzer automated sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA). The sequencing reactions conditions were: 1 cycle of 96 °C for 1 min 30 s and 24 cycles of 96 °C for 12 s, 50 °C for 6 s, and 60 °C for 4 min, using Big Dye Terminator Ready Reaction v3.1 (ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit; Applied Biosystems). Sequencing results were analyzed through submission to similarity search using the "search algorithm" BLAST.

Computational methods: Algorithms available in the internet as automated methods were used as tools to evaluate the possible influence of the substitution of an amino acid in the protein function. Sorting Intolerant from Tolerant (SIFT) amino acid substitutions assumes that the important amino acids tend to be conserved between species. This method assigns a substitution probability from 0 to 1 for each possible

amino acid change. Substitution with probabilities less than 0.05 are considered intolerant. Polymorphism Phenotyping 2 (PolyPhen-2) algorithm considers the conservation of amino acids between species and physicochemical differences between wild and mutant proteins. The Align-GVGD method is based on chemical differences, polarity and molecular volume between permuted amino acids. Scores range from 15 to 215, with scores >100 predictive of deleterious mutations and tolerable <60.

RESULTS

Clinical evaluation: This family is represented by four generations of individuals. Four members were affected by bilateral lamellar cataract, including the proband (III-19, IV-5, IV-6, and IV-7). Four individuals had bilateral pulverulent cataract (II-11, III-6, III-21, and III-22). The two oldest individuals of the family (I-1 and I-2) had nuclear and anterior cortical lens opacities with characteristics of senility. One patient with lamellar cataract underwent surgery at another hospital, presenting bilateral aphakia and severe amblyopia in his right eye. Three other individuals with lamellar cataract were operated at 1, 12, and 18 months of age, respectively (Figure 1). Visual acuity in this family subsequently to surgery ranged from count fingers to 1.0 (Table 2).

Mutation analysis: Direct sequencing was performed to cover exons and intron-exon boundaries of *CRYAA*, *CRYGC*, and *CRYGD*. A heterozygous A→G transition was identified at c. 401 position of exon 3 in two affected members (III-22 and IV-7) and in one unaffected member (II-15; Figure 2). This alteration resulted in the missense substitution of a wild type tyrosine to a cysteine (Y134C) in the *CRYGD* protein. The variant was completely absent in 100 chromosomes of 50 unrelated controls. The other affected members showed no alterations in any of the evaluated crystallins.

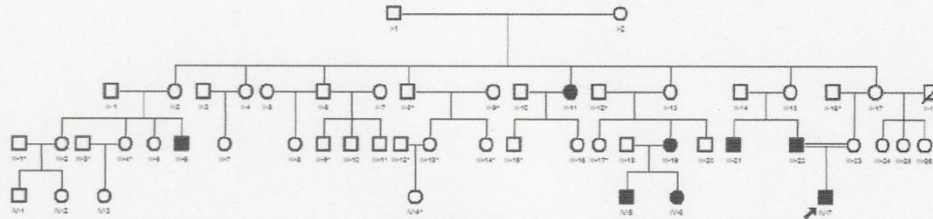


Figure 1. Pedigree of a four-generation family harboring congenital cataract. The proband is marked with an arrow. Squares and circles indicate males and females, respectively. Black and white symbols denote affected and unaffected individuals, respectively. A slash through the symbol means that the family member is deceased. Thirty-eight individuals (eight affected and thirty unaffected) from the family were enrolled and underwent ophthalmic examinations and genetic analysis (individuals marked by an asterisk did not participate in the study).

TABLE 2. CLINICAL EVALUATION OF PATIENTS AFFECTED BY CONGENITAL CATARACT.

Individual	Diagnostic Age (years)	Phenotype	Surgery	BCVA OD	BCVA OS	Polymorphism Y134C in <i>CRYGD</i>
II-11	46	Pulvulent	No	1.0	1.0	No
III-6	24	Pulvulent	No	1.0	1.0	No
III-19	at birth	Lamellar	Yes	CF	0.6	No
III-21	26	Pulvulent	No	1.0	1.0	No
III-22	25	Pulvulent	No	1.0	1.0	Yes
IV-5	at birth	Lamellar	Yes	0.4	0.5	No
IV-6	at birth	Lamellar	Yes	0.05	0.05	No
IV-7	at birth	Lamellar	Yes	0.4	0.3	Yes

BCVA OD: Best corrected visual acuity in right eye. BCVA OS: Best corrected visual acuity in left eye. CF: Count fingers.

Computational method analysis: The SIFT method revealed a score of 0.00 to position Y134. The PolyPhen-2 algorithm showed a score of 1.000 and the Align-GVGD method presented a score of 193.72.

DISCUSSION

A considerable amount of mutations associated with human congenital cataracts have been described in *CRYGD* [1,4,13]. These mutations alter the stability and/or the solubility of γ -crystallins and contribute to loss of transparency of the lens fibers [1]. Therefore, several crystallin genes have been considered as candidates for hereditary congenital cataract [4,6].

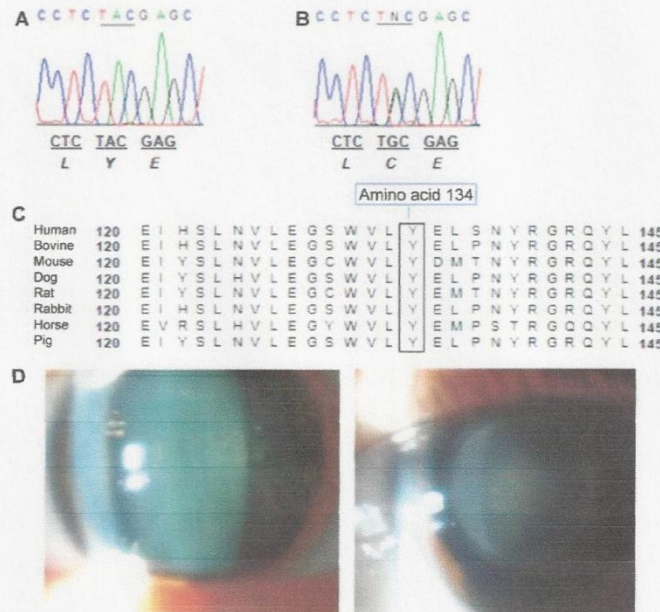
The autosomal dominant congenital cataract has a high penetrance and is usually symmetric in affected individuals. However, there may be considerable variability within a pedigree and between the two lenses of the same individual [14-21]. This may explain the different phenotypes observed in the family evaluated.

There are few studies about genetic alterations related to congenital cataract in the Brazilian population. Santana et al. [4] related the Y56X substitution in exon 2 of *CRYGD* in a Brazilian family with the nuclear phenotype, resulting in a

truncated protein missing 118 amino acids. In the same study, a mutation in exon 1 of *CRYAA* (R12C) was reported.

This study describes the Y134C substitution, located in exon 3 of *CRYGD*, which, to our knowledge, was not reported in any population to date. The effect of this amino acid substitution was evaluated through Polyphen-2, SIFT, and Align-GVGD computational programs. The results of in silico analysis of these algorithms suggest that a variation Y134C in *CRYGD* tends to be intolerant as evaluated by the SIFT method that revealed a score of 0.00 to position Y134. Furthermore, PolyPhen-2 achieved a score of 1.000, showing that the amino acid tyrosine at this position is highly conserved among species (Figure 2) as well as the physicochemical differences between wild and mutant proteins indicate "probably damaging." Finally, the Align-GVGD method presented a score of 193.72, demonstrating that the substitution is probably deleterious as well. Santana and colleagues [4] used these same algorithms to analyze the R12C mutation in *CRYAA* which was segregating with congenital cataract in a Brazilian family. They found similar scores to those obtained in this study.

The other mutation described by Santana and colleagues [4], the Y56X in *CRYGD*, does not apply for the three in silico methods due to generation of a truncated protein. Chan et al.

Figure 2. Sequence analysis of *CRYGD*.

A: Sequence of a member without the polymorphism. **B:** Heterozygous polymorphism detected in exon 3 of *CRYGD* (individuals II-15, III-22, and IV-7). **C:** Multiple sequence alignment of the *CRYGD* protein (codons 120–145) in different species, demonstrating that residue 134 is highly conserved. **D:** Slit-lamp photograph, showing pulvulent cataract in individual III-22 (left) and lamellar cataract in individual IV-7 (right).

[22] reinforced that when the results of these algorithms are combined, their isolated predictive value is increased.

Besides the analysis of these three algorithms suggesting that the Y134C variant in *CRYGD* could be a causative disease mutation and that it occurred in a gene already associated with congenital cataract, the evaluation of its segregation pattern within this family is not consistent with its relation to the disease. The presence of this alteration in individuals II-15, III-22, and IV-7 and its absence in the other family members might indicate the occurrence of a de novo mutation. The fact that individual III-21 is affected but does not have the same variation as his brother as well as the presence of congenital cataract in other family members without this variation (II-11, III-6, III-19, IV-5, and IV-6) indicates that other gene is involved in the etiology and that the Y134C variant is a rare SNP probably not associated with the disease.

There are six affected individuals who do not present the substitution. Santana et al. [4] found a novel polymorphism in *CRYGC* (S119S) in a family with bilateral autosomal dominant congenital nuclear cataract and microcornea that was absent in some affected individuals. It was suggested that this absence could be justified by recombination events and that this polymorphism could be a marker of an unidentified gene located in this region.

Isolated autosomal dominant cataract is genetically heterogeneous and to date 14 genes and nine additional loci have been implicated with the disease [11,23]. The manifestation of the disease in this family may be influenced by more than one gene with incomplete penetrance. Additionally, the possible interaction with other genes, not analyzed in this study, may have interfered with the Y134C substitution in the susceptibility to congenital cataract development.

In conclusion, we found a novel substitution in *CRYGD* in a Brazilian family with congenital cataract in which there is no accurate segregation with the disease, hence, it is probably not a disease causing mutation. Further studies in this family involving structural and functional genes associated with congenital cataract are necessary to better understand the mechanisms underlying congenital cataract development.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to acknowledge the members of the family for their participation in this study.

REFERENCES

1. Yao K, Jin C, Zhu N, Wang W, Wu R, Jiang J, Shentu X. A nonsense mutation in *CRYGC* associated with autosomal

- dominant congenital nuclear cataract in a Chinese family. *Mol Vis* 2008; 14:1272-6. [PMID: 18618005]
2. Haddad MA, Sei M, Sampaio MW, Kara-Jose N. Causes of visual impairment in children: a study of 3,210 cases. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 2007; 44:232-40. [PMID: 17694828]
3. Thylefors B, Negrel AD, Pararajasegaram R, Dadzie KY. Global data on blindness. *Bull World Health Organ* 1995; 73:115-21. [PMID: 7704921]
4. Santana A, Waiswol M, Arcieri ES, Vasconcellos JPC, Melo MB. Mutation analysis of CRYAA, CRYGC, and CRYGD associated with autosomal dominant congenital cataract in Brazilian families. *Mol Vis* 2009; 15:793-800. [PMID: 19390652]
5. Mamer E, Rosenberg T, Eiberg H. Autosomal dominant congenital cataract. Morphology and genetic mapping. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1989; 67:151-8. [PMID: 2728866]
6. Messina-Baas OM, Gonzalez-Huerta LM, Cuevas-Covarrubias SA. Two affected siblings with nuclear cataract associated with a novel missense mutation in the CRYGD gene. *Mol Vis* 2006; 12:995-1000. [PMID: 16943771]
7. Beby F, Morle L, Michon L, Bozon M, Edery P, Burillon C, Denis P. The genetics of hereditary cataract. *J Fr Ophtalmol* 2003; 26:400-8. [PMID: 12843900]
8. Scott MH, Hejtmancik JF, Wozencraft LA, Reuter LM, Parks MM, Kaiser-Kupfer MI. Autosomal dominant congenital cataract. Interocular phenotypic variability. *Ophthalmology* 1994; 101:866-71. [PMID: 8190472]
9. Graw J. Cataract mutations and lens development. *Prog Retin Eye Res* 1999; 18:235-67. [PMID: 9932285]
10. Wistow GJ, Piatigorsky J. Lens crystallins: the evolution and expression of proteins for a highly specialized tissue. *Annu Rev Biochem* 1988; 57:479-504. [PMID: 3052280]
11. Reddy MA, Bateman OA, Chakarova C, Ferris J, Berry V, Lomas E, Sarra R, Smith MA, Moore AT, Bhattacharya SS, Slingsby C. Characterization of the G91del CRYBA1/3-crystallin protein: a cause of human inherited cataract. *Hum Mol Genet* 2004; 13:945-53. [PMID: 15016766]
12. Blundell T, Lindley P, Miller L, Moss D, Slingsby C, Tickle I, Turnell B, Wistow G. The molecular structure and stability of the eye lens: x-ray analysis of gamma-crystallin II. *Nature* 1981; 289:771-7. [PMID: 7464942]
13. Santhiya ST, Soker T, Klopp N, Illig T, Prakash MV, Selvaraj B, Gopinath PM, Graw J. Identification of a novel, putative cataract – causing allele in CRYAA (G98R) in an Indian family. *Mol Vis* 2006; 12:768-73. [PMID: 16862070]
14. He W, Li S. Congenital cataracts: gene mapping. *Hum Genet* 2000; 106:1-13. [PMID: 10982175]
15. Conneally PM, Wilson AF, Merritt AD, Helveston EM, Palmer CG, Wang LY. Confirmation of genetic heterogeneity in autosomal dominant forms of congenital cataracts from linkage studies. *Cytogenet Cell Genet* 1978; 22:295-7. [PMID: 752489]
16. Bateman JB, Spence MA, Marazita ML, Sparkes RS. Genetic linkage analysis of autosomal dominant congenital cataracts. *Am J Ophthalmol* 1986; 101:218-25. [PMID: 3456204]
17. Salmon JF, Wallis CE, Murray AD. Variable expressivity of autosomal dominant microcornea with cataract. *Arch Ophthalmol* 1988; 106:505-10. [PMID: 3355418]
18. Mamer E, Rosenberg T, Eiberg H. Autosomal dominant congenital cataract. Morphology and genetic mapping. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1989; 67:151-8. [PMID: 2728866]
19. Lund AM, Eiberg H, Rosenberg T, Warburg M. Autosomal dominant congenital cataract; linkage relations; clinical and genetic heterogeneity. *Clin Genet* 1992; 41:65-9. [PMID: 1544213]
20. Scott MH, Hejtmancik JF, Wozencraft LA, Reuter LM, Parks MM, Kaiser-Kupfer MI. Autosomal dominant congenital cataract. Interocular phenotypic variability. *Ophthalmology* 1994; 101:866-71. [PMID: 8190472]
21. Basti S, Hejtmancik JF, Padma T, Ayyagari R, Kaiser-Kupfer MI, Murty JS, Rao GN. Autosomal dominant zonular cataract with sutural opacities in a four-generation family. *Am J Ophthalmol* 1996; 121:162-8. [PMID: 8623885]
22. Chan PA, Duraisamy S, Miller PJ, Newell JA, McBride C, Bond JP, Raevaara T, Ollila S, Nyström M, Grimm AJ, Christodoulou J, Oetting WS, Greenblatt MS. Interpreting missense variants: comparing computational methods in human disease genes CDKN2A, MLH1, MSH2, MECP2, and tyrosinase (TYR). *Hum Mutat* 2007; 28:683-93. [PMID: 17370310]
23. Reddy MA, Francis PJ, Berry V, Bhattacharya SS, Moore AT. Molecular genetic basis of inherited cataract and associated phenotypes. *Surv Ophthalmol* 2004; 49:300-15. [PMID: 15110667]

Articles are provided courtesy of Emory University and the Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, P.R. China. The print version of this article was created on 11 August 2011. This reflects all typographical corrections and errata to the article through that date. Details of any changes may be found in the online version of the article.