



BIBIANA AMÉLIA CUSIM DOS SANTOS

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES ASSOCIADOS AO GLAUCOMA
PRIMÁRIO DE ÂNGULO ABERTO.**

**CAMPINAS
2012**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

BIBIANA AMÉLIA CUSIM DOS SANTOS

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES ASSOCIADOS AO GLAUCOMA
PRIMÁRIO DE ÂNGULO ABERTO.**

Orientador: Prof. Dr. José Paulo Cabral de Vasconcellos

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

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas para obtenção de título de Mestre em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO/ TESE DEFENDIDA PELA ALUNA BIBIANA AMÉLIA CUSIM DOS SANTOS E ORIENTADO PELO PROF. DR. JOSÉ PAULO CABRAL DE VASCONCELLOS.

Assinatura do Orientador

A handwritten signature in blue ink is written over a horizontal dashed line. The signature is stylized and appears to be the name of the supervisor, Prof. Dr. José Paulo Cabral de Vasconcellos.

**CAMPINAS
2012**

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

Sa59i

Santos, Bibiana Amélia Cusim dos, 1985-
Identificação de genes associados ao glaucoma
primário de ângulo aberto / Bibiana Amelia Cosim dos
Santos. -- Campinas, SP : [s.n.], 2012.

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

1. Glaucoma de ângulo aberto. 2. Genes. 3. Pressão
intra-ocular. 4. Polimorfismo de nucleotídeo único. I.
Vasconcellos, Jose Paulo Cabral de. II. Melo, Mônica
Barbosa de. III. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Identification of genes associated with primary open angle glaucoma.

Palavras-chave em

inglês: Open-angle

glaucoma Genes

Intraocular pressure

Polymorphism single nucleotide

Área de concentração: Ciências

Básicas **Titulação:** Mestra em Clínica

Médica **Banca examinadora:**

José Paulo Cabral de Vasconcellos [Orientador]

Niro Kasahara

Edi Lucia Sartorato

Data da defesa: 23-11-2012

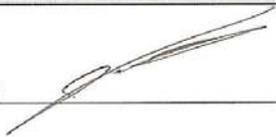
Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

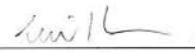
**COMISSÃO EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE
MESTRADO**

BIBIANA AMÉLIA CUSIM DOS SANTOS (RA: 089639)

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

Membros:

1. PROF(A). DR(A). JOSÉ PAULO CABRAL DE VASCONCELLOS 

2. PROF(A). DR(A). NIRO KASAHARA 

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

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

Data: 23 de novembro de 2012

Aos meus pais, Jeronimo e Iracema e meu irmão Leandro,
Meu porto seguro. Agradeço pelo apoio, amor e paciência que sempre tiveram comigo.

Pelos telefonemas, preocupações e disposição.

Um muito obrigado, ainda assim, seria insuficiente por tudo que fizeram.

Dedico a vocês essa grande conquista!

Agradecimentos

À DEUS, pelo dom precioso da vida. Fortalecendo-me sempre para enfrentar os desafios diários.

Aos meus pais Jerônimo e Iracema e irmão Leandro, por tudo que fizeram e fazem por mim. A base de tudo.

Aos meus tios, José e Maria, que me receberam de braços abertos em seu lar como filha. Serei sempre grata por tudo. Obrigada pelas conversas, conselhos e dos bolos de leite ninho e chocolate, sem dúvidas, os mais gostosos que já comi.

Aos primos, Priscila, Anderson, Larissa e ao meu “grudinho” Maria Alice, amigos de filmes e cachorro-quente nos sábados à noite. Alegravam-me em momentos difíceis e quando sentia saudades de casa.

Aos meus familiares, pela preocupação de estar longe.

Ao meu orientador, Professor José Paulo Cabral de Vasconcellos, pela confiança que depositou em mim durante esses anos, pela oportunidade de crescimento profissional, orientação e paciência. A sua motivação e apoio foi essencial para a realização deste trabalho. Profissional admirável. Obrigada!

À minha co-orientadora, Prof^a Dr^a Mônica Barbosa de Melo, pela oportunidade de realização do trabalho em seu laboratório, apoio e aprendizado. Pela amizade que se desenvolveu ao longo dos anos e por sua paciência.

Aos amigos de laboratório do CBMEG, Anderson, Carol, Pedro, Gi, Bruno, Fábio, Eugênio, Mari, Hugo e Dani. Obrigada pela disposição de ajudarem sempre, nas discussões de artigos, na véspera de entregar relatórios, nas PCRs, e por aqueles inúmeros cafézinhos no meio da tarde e os engraçadíssimos “happy hour”.

Aos amigos de laboratório da FCM e Hemocentro. Agradeço pelas amizades que conquisei, pela ajuda com as minhas placas de genotipagem, as conversas e nos esclarecimentos de dúvidas.

Falando em dúvidas, é claro que não poderia ficar de fora o agradecimento ao Fábio Rossi, Rodrigo Secolin e Luciana Bonadia. Obrigada pelas inúmeras tardes em que vocês passaram me ajudando, esclarecendo dúvidas e analisando resultados. Resultados que me lembram algoritmos, que me lembram Rodrigo rs.. Rô, você foi de extrema importância!

Aos meus queridos amigos e companheiros de apartamento Táris e Ilária. Agradeço a Deus por ter colocado vocês em meu caminho. Obrigada pela amizade, pelos conselhos, risadas e apoio quando as lágrimas escorriam, pelos jantares e de nos jogarmos no sofá depois daqueles almoços dominicais.

Às secretárias do CBMEG, Sandra, Tânia e Gabriela, pela eficiência, disposição e amizade.

À secretária da pós-graduação, Adriana, sempre disposta a ajudar-me.

À todas as pessoas que participaram de forma direta ou indiretamente neste trabalho. Aos médicos e funcionários CBMEG e do Departamento de Oftalmologia da UNICAMP.

Aos pacientes e seus familiares pela participação nesse estudo.

À FAPESP pelo apoio financeiro ao projeto (número 2009/03508-0).

Resumo

O glaucoma primário de ângulo aberto (GPAA) é uma doença neurodegenerativa. Suas características clínicas incluem lesão progressiva do disco óptico com perda de campo visual correspondente. Vários fatores de risco estão associados para sua instalação e desenvolvimento, o principal é o aumento da pressão intra-ocular (PIO). Apesar de ser uma doença de herança complexa, foi possível, através da biologia molecular, identificar quatro genes associados a esta forma de glaucoma por meio de estudos de ligação em famílias com esta afecção. O primeiro foi o gene *MYOC*, descrito em 1997, seguido pelos genes *OPTN*, *WDR36* e *NTF4*, identificados em 2002, 2005 e 2009, respectivamente. Existem outros 14 *loci* já descritos em famílias com GPAA com padrão de herança autossômico dominante, cujos genes associados ao glaucoma não foram ainda identificados. Desta forma, através de marcadores do tipo microssatélites - escolhidos a partir do mapa genético humano Génethon serão avaliados os *loci* candidatos (*GLCIA* e *GLCIJ* - *GLCIN*) associados ao glaucoma primário de ângulo aberto em duas famílias informativas portadoras de GPAA. Simultaneamente, será realizada a análise de ligação nestas mesmas famílias por meio de lâminas ou *microarrays* de *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) utilizando-se o GeneChip® Mapping 10K 2.0. Na primeira abordagem por meio de microssatélites foram avaliados 33 indivíduos da família 1 e 18 indivíduos da família 2 enquanto que na análise por meio das lâminas de SNPs foram investigados 19 membros da família 1 e 11 membros da família 2. Não houve ligação dos loci investigados: *GLCIA*, *GLCIJ* - *GLCIN* em ambas as famílias com o GPAA. Entretanto, na análise de ligação por meio de lâminas de SNPs sugeriu possíveis regiões candidatas associadas ao GPAA (*lod score* maior do que 2) nos cromossomos 5q31.2 – 31.3 e 2p22.3 - 23.1

Abstract

Primary open-angle glaucoma is a neurodegenerative disease. Clinical features include progressive damage of the optic disc with corresponding visual field loss. Several risk factors are associated with installation and development, the main is a increased of intraocular pressure (IOP). Although a disease of complex inheritance, it was possible, through molecular biology, identify four genes associated with this form of glaucoma through linkage studies in families with this disease. The first was the MYOC gene, described in 1997, followed by the OPTN genes, WDR36 and NTF4, identified in 2002, 2005 and 2009, respectively. There are 14 other loci already described in POAG families with autosomal dominant, whose genes associated with glaucoma have not yet been identified. Thus, through microsatellite markers - chosen from the human genetic map Génethon will evaluate candidate loci (GLC1A and GLC1J - GLC1N) associated with primary open-angle glaucoma in two informative families carriers from POAG. Simultaneously, will be performed a linkage analysis in these same families through "microarrays" of "single nucleotide polymorphisms" (SNPs) using the GeneChip Mapping 10K 2.0 ®. In the first approach through microsatellites were evaluated 33 individuals of Family 1 and 18 individuals of Family 2 while the analysis through SNPs were investigated in 19 member of family 1 and 11 members of family 2. There was no linkage of investigated loci: GLC1A, GLC1J - GLC1N in both families with POAG. However, in linkage analysis through SNPs suggested possible candidate regions associated with POAG (lod score greater than two) in the chromosome 5q31.2 - 2p22.3 and 31.3 - 23.1.

Lista de Tabelas	página
Tabela 1. Genes candidatos selecionados avaliados por estudos de associação de caso controle. Adaptado de (Fan and Wiggs, 2010).	31
Tabela 2. Dados clínicos da família 1.	46
Tabela 3: Dados clínicos da família 2.	46
Tabela 4. Marcadores do tipo microssatélites por <i>loci</i> associado ao GPAA.	50
Tabela 5. Valores de “lod score” para a família 1 portadora de GPAA.	53
Tabela 6. Valores de “lod score” para a família 2 portadora de GPAA.	53
Tabela 7. Lista de SNPs encontrados no cromossomo 14 com seu respectivo lod score e localização.	55
Tabela 8. Marcadores do tipo microssatélites no locus 5q31.2	55
Tabela 9. Valores de “lod score” para a família 1 portadora de GPAA no locus 5q31.2.	56
Tabela 10. Lista de SNPs encontrados no cromossomo 2 com seu respectivo lod score e localização.	57
 Lista de Ilustrações	
Figura 1. Modelo esquemático das estruturas oculares envolvidos na dinâmica do humor aquoso. Adaptado de (Fan and Wiggs., 2010).	18
Figura 2. Representação esquemática da proteína optineurina.	24

Figura 3: Heredograma família 1	45
Figura 4: Heredograma família 2	45
Figura 5. Representação da distribuição dos SNPs na família 1. Os marcadores com “lod scores” maiores que 1,7 estão indicados pela seta.	54
Figura 6. Representação da distribuição dos SNPs na família 2. Os marcadores com “lod scores” maiores que 2,0 estão indicados pela seta em vermelho.	57
Figura 7. Representação da distribuição dos SNPs com valores de “lod score” maiores que 1,7 na família 1 nos cromossomos 1 (A), 5 (B) e 14 (C).	63
Figura 8. Representação da distribuição dos SNPs com valores de “lod score” maiores que 2,0 na família 2 nos cromossomos 2.	66

Lista de Abreviaturas

CALP13	Calcium-activated neutral proteinase 12
CDH1	Caderina
CDKN1A	Ciclina dependente de inibidores de quinase 1
CFH	Fator de complemento H
cM	Centimorgans
<i>CYP1B1</i>	Citocromo P450, família 1, subfamília B, polipeptídeo 1
C5orf32	Chromosome 5 Open Reading Frame 32
DHT	di-hidrotestosterona
DMRI	Degeneração macular relacionada à idade
GALNT14	polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 14
GCOS	Genechip Operating Software
GLC	Genes associados ao glaucoma
GLC1A	Primeiro locus associado ao glaucoma de ângulo aberto

GLC1B	Segundo locus associado ao glaucoma de ângulo aberto
GLC1C	Terceiro locus associado ao glaucoma de ângulo aberto
GLC1D	Quarto locus associado ao glaucoma de ângulo aberto
GLC1E	Quinto locus associado ao glaucoma de ângulo aberto
GLC1F	Sexto locus associado ao glaucoma de ângulo aberto
GLC1G	Sétimo locus associado ao glaucoma de ângulo aberto
GLC1H	Oitavo locus associado ao glaucoma de ângulo aberto
GLC1I	Nono locus associado ao glaucoma de ângulo aberto
GLC1J	Décimo locus associado ao glaucoma de ângulo aberto
GLC1K	Décimo primeiro locus associado ao glaucoma de ângulo aberto
GLC1L	Décimo segundo locus associado a glaucoma de ângulo aberto
GLC1M	Décimo terceiro locus associado a glaucoma de ângulo aberto
GLC1N	Décimo quarto locus associado a glaucoma de ângulo aberto
GLC1O	Décimo quinto locus associado a glaucoma de ângulo aberto
GLC1P	Décimo sexto locus associado a glaucoma de ângulo aberto
GPN	Glaucoma de pressão normal
GPAA	Glaucoma primário de ângulo aberto
GPAA-A	Glaucoma primário de ângulo aberto do tipo adulto
GPAA-J	Glaucoma primário de ângulo aberto do tipo juvenil
GSTM1	Glutathione S-transferase 1
GSTT1	Glutathione S-transferase teta 1
GTTYPE	Genechip Genotyping Analysis Software
HO	Hipertensos oculares
IL-2	Interleucina 2
KLHL3	Kelch-like 1
LTBP1	Latent transforming growth factor beta binding protein 1
mmHg	milímetro de mercúrio
Mb	Megabases
MTHRF	Metilenotetrahidrofolato redutase
MYOC	Miocilyn
NRG2	Neuregulin 2
NOS3	Óxido Nítrico Sintetase 3
NTF4	Neurotrofina
OPA1	Atrofia óptica 1
OPTN	Optineurin

PCDHA1	Protocadherin Alpha 1
PIO	Pressão intra-ocular
RA	Receptor andrógeno
SIL1	Endoplasmic reticulum chaperone
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SRD5A2	Steroid-5-alpha-reductase, Alpha polypeptide 2
STR	Short Tandem Repeat
TGFβs	fator transformador de crescimento β
TNF	Fator de necrose tumoral
TP53	Proteína tumoral p53
XDH	Xanthine dehydrogenase

SUMÁRIO	Página
RESUMO	iv
ABSTRACT	x
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Conceito	17
1.2 Epidemiologia	18
1.3 Genética	20
1.4 Identificação de genes	32
2. JUSTIFICATIVA	37
3. OBJETIVOS	39
4. CASUÍSTICA	41
4.1 - Recrutamento das famílias com GPAA	42
4.2 - Critérios de Inclusão	42
4.3 – Critério de Exclusão	42
4.4 – Grupo Controle	43
4.5 – Exame Oftalmológico	43
4.6 – Heredogramas	44

5. MÉTODOS	47
5.1 – Extração de DNA	48
5.2 – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	48
5.3 – Genotipagem	49
5.3.1 – Genotipagem por microssatélite	49
5.3.2 - Genotipagem pela técnica de SNP array	50
6. RESULTADOS	52
7. DISCUSSÃO	59
8. CONCLUSÕES	69
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
10. ANEXOS	84

INTRODUÇÃO

1.Introdução

1.1 - Conceito

O glaucoma é uma doença neurodegenerativa progressiva de etiologia multifatorial. Apresenta-se como uma das maiores causas de cegueira no mundo, afetando mais de 70 milhões de pessoas (Quigley. 2011; Jia et al., 2009).

A doença é caracterizada por perda de células ganglionares da retina associada com a degeneração do nervo óptico (afilamento progressivo da rima nervosa e aumento da relação escavação/disco) que levam a alterações correspondentes de campo visual (Liu et al., 2008).

A apoptose parece ser o processo responsável pela perda das células ganglionares da retina. Este processo seria desencadeado por uma série de fatores, incluindo a própria elevação da pressão intra-ocular (PIO), alterações do fluxo sanguíneo no disco óptico, processos de origem auto-imune ou mesmo a condições intrínsecas dos tecidos que compõe o disco óptico que o tornassem mais susceptível para a instalação do dano glaucomatoso (Weinreb, 2007).

A elevação da PIO é o principal fator de risco para o glaucoma. O valor da PIO é o resultado da diferença entre a produção do humor aquoso e seu escoamento, este equilíbrio dinâmico é que mantém o metabolismo e a forma adequada do globo ocular.

O humor aquoso é formado pelo corpo ciliar e é drenado na sua maior proporção pelo seio camerular (ângulo da câmara anterior). Esta região é composta, de forma geral, pela malha trabecular pelo esporão escleral e pela faixa ciliar e raiz da íris. O escoamento do humor aquoso inicia-se através da malha trabecular, posteriormente desemboca no canal de Schlemm e, finalmente é escoado pelas veias episclerais (Figura 1). Um desequilíbrio entre produção e drenagem do humor aquoso pode resultar no aumento da PIO (Leske, 1983).

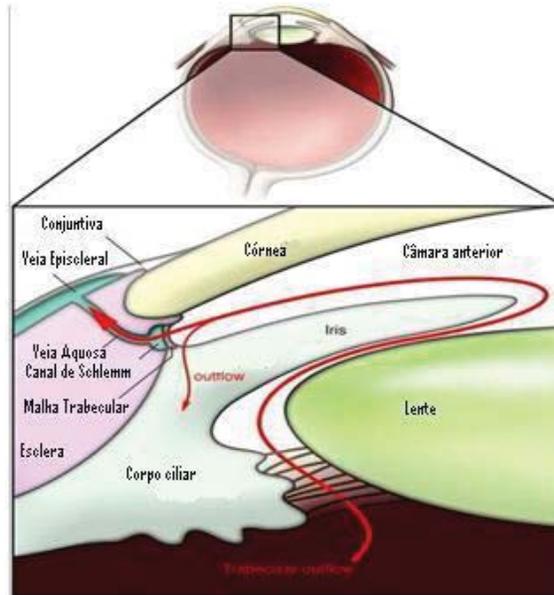


Figura 1. Modelo esquemático das estruturas oculares envolvidos na dinâmica do humor aquoso. Adaptado de (Fan and Wiggs., 2010).

O glaucoma pode ser classificado de acordo com a sua etiologia em primário ou secundário, quanto ao aspecto anatômico do seio camerular em aberto ou fechado, assim como a idade do diagnóstico (congenito, juvenil e adulto) e evolução clínica (agudo ou crônico) (Ray & Mookherjee, 2009). Quando os mecanismos fisiopatológicos que levam ao desenvolvimento do glaucoma são conhecidos e envolvem condições oculares e/ou sistêmicas que resultem em elevação da PIO e lesão glaucomatosa do disco óptico, o glaucoma é denominado secundário. O termo primário se restringe aos glaucomas cujo mecanismo responsável pelo desenvolvimento da lesão glaucomatosa do disco óptico e, na maioria das vezes, do aumento da PIO não está estabelecido (Leske, 1983).

Além disso, o glaucoma primário de ângulo aberto é classificado de acordo com os valores da PIO. O glaucoma com pressão normal (GPN) é aquele que ocorre vigência de PIOs consistentemente abaixo dos 21 mmHg. Pacientes que apresentam PIOs acima de 21 mmHg são considerados portadores de glaucoma primário de ângulo aberto (GPAA) (Leske 1983).

1.2 - Epidemiologia

Entre as diversas formas de glaucoma, o mais prevalente é o GPAA (Fuse 2010). Sua prevalência varia de acordo com as populações estudadas, sendo predominante entre as

populações caucasóides e negras. Leske em 2007 realizou uma revisão epidemiológica incluindo a população de todos os continentes avaliando a prevalência e incidência de glaucoma em indivíduos acima de 40 anos de idade (Leske, 2007).

Esse estudo estimou a prevalência do GPAA na população Européia, Africana e Asiática, e os achados variam de 1-3%, 1-8% e 1-4%, respectivamente. Uma maior prevalência, em torno de 7-9%, foi encontrada em africanos estudados no caribe que eram provenientes principalmente do Oeste da África (Leske, 2007; Sommer et al., 1991). Nos Estados Unidos, a prevalência varia de acordo com a ancestralidade dos subgrupos incluídos no estudo, com 1-2% encontrados em pessoas de origem européia, 4% americanos africanos e 2-5% em mexicanos americanos (Leske, 2007).

O aumento da PIO é o principal fator de risco para o desenvolvimento do GPAA. Tal é a sua importância na propedêutica do glaucoma, que indivíduos com PIO acima de 21 mmHg, sem lesão glaucomatosa do disco óptico, são considerados como suspeitos de glaucoma ou hipertensos oculares (HO) (Foster et al 2002). Indivíduos com GPAA e valores de PIO menor que 21mmHg são classificados como portadores de glaucoma de pressão normal (GPN), sendo que prevalência deste tipo de glaucoma é significativamente maior em Japoneses do que em caucasianos (Fuse et al., 2010; Werner, 1996). O GPAA geralmente afeta ambos os olhos e não apresenta sintomas perceptíveis em muitos pacientes até os últimos estágios da doença, quando os pacientes perdem a visão central (Kroese, 2003).

Entretanto, alguns pacientes que apresentam níveis elevados da PIO não chegam a desenvolver a doença; nesse contexto acredita-se que o desenvolvimento da lesão glaucomatosa dependeria, dentre outros fatores, dos níveis da PIO e da susceptibilidade individual de dano ao disco óptico (Sigal et al., 2005; Burgoyne et al., 2005);

Outros fatores de risco, além da PIO, associados ao GPAA, incluem idade avançada, a raça negra, o histórico familiar e a miopia (Kroese, 2003).

Um fator limitante para estudar a incidência do GPAA é a baixa frequência de novos casos por ano na maioria das populações, tamanhos de amostras pequenas resultando em poder estatístico insuficiente para identificar fatores de risco. A fim de superar esse problema, foi realizado um estudo em uma população em Barbados no Caribe, os quais são descendentes de africanos, os quais apresentam uma alta frequência de GPAA. A incidência de glaucoma nessa população foi de 4,4%. Reforçando os fatores de risco para o GPAA, esse estudo demonstrou que o risco relativo para a doença aumenta conforme a idade em 4% e que o histórico familiar de glaucoma aumenta o risco em quase três vezes (Leske et al., 2008). Além desse, outro estudo demonstrou que a história familiar de glaucoma na primeira

geração e PIO acima de 21 mmHg tem uma associação estatisticamente significativa com o desenvolvimento da doença (Vegine et al., 2008).

1.3 – Genética Molecular do GPAA

Com o desenvolvimento da biologia molecular, vários pesquisadores têm procurado identificar genes associados aos mais diversos tipos de moléstias humanas; assim um grande número de afecções oculares já tem seu *locus* (posição no cromossomo) e gene determinado através do mapeamento genético e da análise de ligação, como ocorre no GPAA.

Para classificar e organizar a avaliação fenotípica do glaucoma a Organização Mundial do Genoma Humano propôs ordenar os *loci* de maneira que é utilizada a sigla “GLC” para os genes associados ao glaucoma. Os números “1”, “2” e “3”, que seguem a sigla geral para os glaucomas, representam ângulo aberto, ângulo fechado e glaucoma congênito e as letras “A”, “B”, “C” e assim por diante, indicam o primeiro e os subsequentes *loci* identificados para determinado tipo de glaucoma (Raymond, 1997).

Mais de 20 *loci* foram mapeados para o GPAA (Fan et al.; 2010). Apesar de o GPAA apresentar, principalmente, o padrão complexo de herança (Allighan et al., 1998), os quatro genes identificados até o momento foram obtidos por meio de estudos de ligação em famílias com GPAA e herança autossômica dominante (Fan, B. J; Wiggs, 2010; Carbone et al., 2011).

Baseado em estudos de mapeamento genético, foram classificados 17 *loci* – *GLCIA* – *GLCIQ*, que estão envolvidos no início do GPAA.

1.3.1 – *GLCIA*

O primeiro *locus* (*GLCIA*) associado ao GPAA foi descrito por Sheffield et al. (1993), através de um estudo de ligação genética em uma família com GPAA de início precoce, abaixo dos 35 anos de idade (GPAA-J) e padrão autossômico dominante. O estudo de ligação por meio de marcadores do tipo microssatélites nesta família demonstrou associação da doença com o *locus* localizado no braço longo do cromossomo 1 (1q21-1q31). Posteriormente, em 1997, Stone e colaboradores (Stone et al, 1997) identificaram o gene *Trabecular Meshwork-Induced Glucocorticoid Response Gene/Myocilin*, ou *TIGR/MYOC* em famílias portadoras de GPAA-J associado ao *locus GLCIA*. Estudos

subsequentes mostraram que mutações no gene *MYOC* podem ser observadas em indivíduos de diferentes faixas etárias na mesma família, o que tornaria esta divisão, GPAA juvenil ou GPAA adulto (GPAA-A) questionável (Allighan et al., 1998; Alward, et al., 1998; Fingert et al., 1999)

Como citado anteriormente, a história familiar positiva é um importante fator de risco para o desenvolvimento do glaucoma. Estudos indicam que aproximadamente de 3 a 5% dos indivíduos com GPAA resultam de mutações no gene *MYOC*, o que aumenta a possibilidade de identificar indivíduos que são geneticamente predispostos a desenvolver a doença (Vegini et al., 2008).

O gene *MYOC* é composto por 3 exons com 606, 126 e 718 pares de bases, respectivamente, e dois domínios maiores: *miosina-like* (exon 1) e *olfactomedina-like* (exon 3), este último representa a localização onde a maioria das mutações, em torno de 90%, foram identificadas (Vasconcellos et al., 2003; Resch & Fautsch, 2009); além de codificar uma proteína de 57-KDa, conhecida como miocilina (Clark et al., 2001). Essa proteína foi descrita após exposição a glicocorticóides em células humanas da malha trabecular (Polansky et al., 1997). No olho humano, a miocilina, é altamente expressa na malha trabecular, esclera, corpo ciliar, e íris; e expressa em quantidades inferiores na retina e nervo óptico, e está presente no humor aquoso (Tamm, 2002); além de sua expressão ser induzida sob condições de estresse, especialmente mecânicos e oxidativos (Polansky et al., 1997; Tamm et al., 1999).

Alterações na sequência do gene *MYOC* associadas ao desenvolvimento do GPAA foram observadas em diversas populações (americanas, francesas, espanhola, alemã, suíça, australiana, canadense, japonesa, chinesa, coreana, indiana, haitiana, colombiana) com uma frequência que varia de 3 a 5% (Finger et al., 1999). Foram descritas mais de 70 mutações no gene *MYOC* (Hewitt 2008), a maior parte delas são populações específicas (Finger et al., 1999; Hogewind et al., 2007). Algumas mutações são observadas em diferentes populações como as alterações estruturais P370L (1.109C>T) e Q368X (368C>T), a primeira associada com GPAA de PIO elevada e desenvolvimento de glaucoma na segunda década de vida, e a segunda observada em indivíduos mais idosos a partir da quinta e sexta décadas de vida e com PIOs mais baixas. Outras mutações são observadas em populações específicas como a Q48H (144G>T) encontrada em indianos (Hogewind et al., 2007).

Acredita-se que várias destas mutações têm um efeito fundador (Fingert et al., 1999; Hewitt et al., 2007). Por exemplo, a mutação T377M no gene da miocilina apresenta um efeito fundador comum, uma vez descrito em cinco diferentes continentes compartilhando o mesmo haplótipo (Hewitt et al., 2007). Como já relatada no parágrafo anterior, mutações no

gene da *MYOC* apresentam diferenças na relação genótipo/fenótipo. Indivíduos com a alteração estrutural (T377M), por exemplo, desenvolvem glaucoma na quarta década de vida, mais tarde que a P370L e mais cedo que a Q368X, além de apresentar PIOs com valores intermediários aos observados nos indivíduos portadores das mutações P370L e Q368X (Fingert et al., 1999; Melki et al., 2003; Puska et al., 2005; Wirtz et al., 2010).

No Brasil, a frequência de mutações no gene *MYOC* em pacientes com GPAA-J e GPAA-A foi de 35,7% e 3,85% respectivamente. Além disso, uma nova alteração foi identificada exclusivamente na população brasileira, que resulta na substituição de uma cisteína por uma arginina no códon 433 no domínio olfactomedina (C433R). Esta mutação está associada com um grave fenótipo: instalação precoce do glaucoma com PIOs elevadas, necessidade frequente de procedimento cirúrgico para controle da doença e alta penetrância (Vasconcellos et al., 2003).

O mecanismo sugerido para o aumento da PIO associado às alterações no gene *MYOC* seria a alteração do enovelamento da proteína codificada pelo gene *MYOC*. Essa alteração acarretaria a redução da secreção desta proteína para o meio extracelular da malha trabecular com conseqüente acúmulo da proteína no retículo endoplasmático rugoso. Tal disfunção facilitaria a apoptose das células trabeculares levando a um desequilíbrio na homeostase do humor aquoso que culminaria com o aumento da PIO (Aroca-Aguilar *et al.*, 2008).

1.3.2- *GLC1B*

O segundo *locus* foi descrito por Stoilova et al (1996). Eles analisaram um grupo de 17 famílias caucasianas do Reino Unido composto por 203 indivíduos, sendo que 90 apresentavam GPAA. O padrão de transmissão hereditária era do tipo autossômico dominante, porém a idade de instalação do glaucoma era variável (20 a 68 anos) e as PIOs mais baixas (no máximo 30 mmHg), caracterizando assim, um fenótipo menos grave em comparação com aquele descrito para o *locus GLC1A*. A análise de ligação nestes heredogramas identificou um novo *locus (GLC1B)* para o GPAA, situado no cromossomo 2 na região 2cen-q13 em um intervalo de 11,2 cM, flanqueado pelos marcadores D2S2161 e D2S176. Até o momento, o gene responsável por essa forma de GPAA ainda não foi identificado.

1.3.3 - *GLC1C*

O terceiro *locus* foi descrito por Wirtz et al. (1997). Foram analisados 44 indivíduos de uma família norte americana caucasiana com três gerações que apresentavam GPAA com padrão de herança autossômico dominante, de início tardio (38–80 anos) e PIO moderadamente aumentada (média 23 mmHg). O novo *locus* (*GLC1C*) foi identificado por meio de haplótipos de recombinação no braço longo do cromossomo 3 (q21–24) entre os marcadores D3S3637 e D3S1744 em um intervalo de 11,1 cM. Um estudo em uma família de origem grega realizado por Kitsos et al., (2001) também estabeleceu ligação no mesmo *locus* (*Lod score* de 3,88 com o marcador D3S1763). Apesar das semelhantes características clínicas entre as famílias norte americanas caucasianas e a de origem grega, os haplótipos são distintos.

Em 2004, um terceiro estudo realizado por Samples et al. (2004), observou que um indivíduo da família norte americana veio a desenvolver GPAA. Através de recombinação do haplótipo no marcador D3S3694; foi possível estreitar essa recombinação de 11,1cM para 3,9cM. Além disso, observou-se que os alelos da doença (marcadores D3S3637 e D3S3612) eram os mesmos, tanto na família grega quanto na família norte americana; sugerindo que as famílias compartilham um haplótipo comum.

1.3.4 - *GLC1D*

O quarto *locus* descrito (*GLC1D*) foi localizado no braço longo do cromossomo 8q23 em um intervalo de 6.3 cM entre os marcadores D8S1830 e D8S592. O haplótipo da doença foi herdado por 8 indivíduos afetados em uma família com 20 membros (Trifan et al., 1998). O fenótipo desta família parece ser variável, com início da perda de campo visual na meia idade, seguida por modesta elevação da pressão intra-ocular e progressão da doença em indivíduos mais velhos.

1.3.5 – *GLC1E*

Identificado por Rezaie *et al.*, (2002), o gene *OPTN* (*Optineurin - optic neuropathy induced protein*), está localizado na região correspondente ao *locus GLC1E*, cromossomo 10p14-15. As primeiras alterações deste gene foram constatadas em 16,7% das famílias,

observado no estudo pioneiro de Rezae *et al.* que constatou fenótipos compatíveis com GPAA e GPN (Rezaie et al., 2002; Ayala-Lugo et al., 2007).

O gene *OPTN* é altamente expresso em tecidos oculares e não oculares, como a malha trabecular, retina, humor aquoso, coração, cérebro, músculo esquelético, dentre outros (Liu et al., 2008). Seu mecanismo na patogênese do glaucoma não está totalmente esclarecido. A proteína optneurina exerce várias funções, pois ela interage com diferentes proteínas as quais estão envolvidas na apoptose, inflamação e vasoconstrição (Swarup, G. and Nagabhushana, A., 2010; Liu et al., 2008).

Este gene contém 16 exons, dos quais três são considerados não codificadores (região 5`- não traduzida ou 5`UTR) e os demais 13 exons codificam uma proteína composta por 577 aminoácidos. A análise da sequência sugere que a proteína codificada pelo gene *OPTN* tem vários domínios putativos (Figura 2).

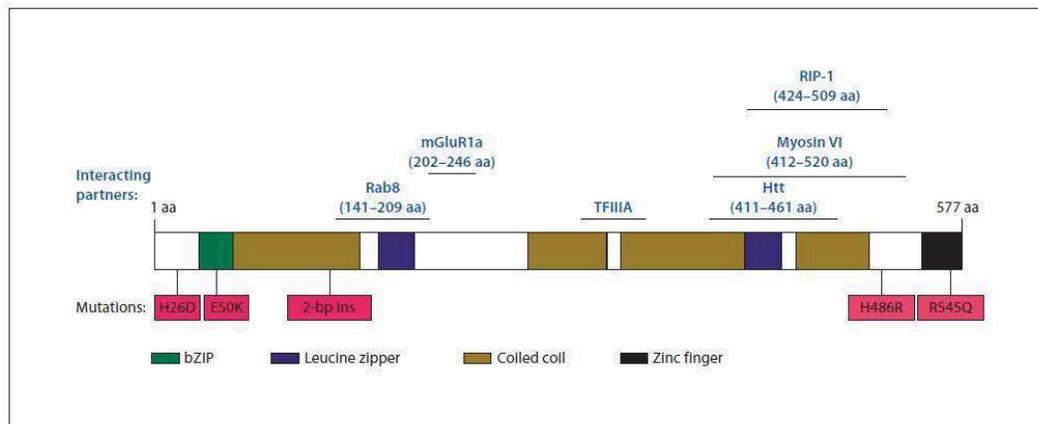


Figura 2. Representação esquemática da proteína optneurina.

Observou-se a que expressão do gene *OPTN* no seio camerular estava aumentada após exposição à dexametasona, ao TNF- α e ao aumento da PIO (Vittiton e Borrás, 2002), sugerindo que *OPTN* poderia desempenhar um papel neuroprotetor ao reduzir a susceptibilidade das células ganglionares da retina a apoptose (Liu et al., 2008). A superexpressão da *OPTN* bloqueia o citocromo c liberado da mitocôndria e regula negativamente o TNF induzido da ativação do NF-Kb (fator nuclear Kb), ambas as condições inibindo a apoptose das células ganglionares da retina (Ray & Mookherjee, 2009).

Até o presente momento, mais que 20 mutações foram encontradas na região codificante do gene *OPTN*, quatro das quais, apresentam associação com o GPAA, sendo estas E50K no exon 4, M98K no exon 5, 691_692insAG no exon 6 e R545Q no exon 16 (Ayala-Lugo et al., 2007; Xião et al., 2009).

Um estudo envolvendo as populações com ancestralidade africana, hispânica e asiática demonstrou uma frequência de mutações de 1,2% no gene *OPTN* em pacientes com GPAA (Ayala-Lugo et al., 2007). Variações na sequência do gene *OPTN* também foram associadas com GPAA nas populações Indianas e Japonesas, enquanto que em populações caucasianas essa associação foi menos significante (Liu et al., 2008).

Por fim, Xião e cols. (2009) descreveram o primeiro relato de uma mutação, K322E, no exon 10 da *OPTN* associado com o GPAA em uma grande família do nordeste da China seguindo um padrão autossômico dominante. Essa mutação troca uma lisina por ácido glutâmico – A1274G, com efeitos potenciais sobre a estrutura e função da proteína.

Um estudo realizado na população brasileira relatou a frequência das mutações T34T, E50K, M98K, 691_692insAG e R545Q em 99 pacientes com GPAA e idade variando entre 35 e 87 e em um grupo controle pareado por idade e sexo. Com exceção da mutação R545Q que apresentou uma distribuição estatisticamente mais frequente no grupo controle, sugerindo uma ação protetora, as demais mutações não foram associadas ao GPAA na população brasileira (Caixeta-Umbelino et al., 2009).

1.3.6 - *GLCIF*

O sexto *locus* descrito (*GLCIF*) foi mapeado no cromossomo 7 (região 7q35 – q36) em um intervalo de 5,3 cM entre os marcadores D7S2442 e D7S483. O estudo foi realizado em uma família com 4 gerações e 25 membros, dos quais 10 eram afetados. A idade de manifestação da doença variava entre 25 e 70 anos e os valores pressóricos situavam-se entre 22 e 38 mmHg (Wirtz et al., 1999).

Um segundo estudo do tipo caso-controle, avaliou a associação do *locus GLCIF* em pacientes japoneses com GPN. Foram incluídos 141 pacientes com GPN e cerca de 11 marcadores microssatélites localizados na região 7q35-36. Os autores observaram que o alelo D7S1277 aumentava de forma significativa o risco de GPN nesta população (Murakami et al., 2010).

Recentemente, foi identificado o gene *ASB10*, inicialmente mapeado em 1999 (*GLCIF*) a partir do estudo de famílias com GPAA pelo grupo que originalmente descreveu este *locus*. Para a sua identificação realizou-se o sequenciamento nos familiares acometidos e não acometidos em 42 genes localizados no intervalo do *locus GLCIF*. A mutação sinônima T255T no gene *ASB10* segregou e estava presente em todos os familiares afetados. Esta mutação ocasiona a perda da transcrição do exon 3 e parte dos exons 4 e 5. O

mecanismo proposto para o desenvolvimento do GPAA seria de que a expressão da proteína codificada por este gene (*Ankyrin repeat and SOCS Box containing*) interage com outras proteínas da malha trabecular como a fibronectina e tenascina C. Posteriormente, os autores rastreamos mutações em 256 pacientes não relacionados com GPAA e 559 controles. Identificou-se 11 variantes alélicas não sinônimas presentes no grupo com GPAA (6,6%), com exceção de uma, também presente no grupo controle (R304C) (Wirtz et al, 2010).

Um possível gene candidato para o GPAA também localizado no cromossomo 7 q35 é o *Nitric Oxide Synthetase 3 (NOS3)*, analisado em 18 probandos norte americanos com GPAA. Foi identificado um polimorfismo de G para T no exon 7 acarretando a troca do aminoácido glutamato para aspartato no códon 298 (E298D) e uma substituição de T para C na região promotora – 786. Até o momento, os autores concluíram que não era possível associar tais alterações moleculares no gene *NOS3* com GPAA. (FUSE et al., 2010).

1.3.7 - *GLC1G*

Monemi e cols (2005) relataram, através de mapeamento genético em uma família, o *locus* para o GPAA na região 5q22.1. Eles identificaram o gene causador da doença, denominado *WDR36 (WD40 repeat 36)*, constituído por 23 éxons e codificando uma proteína com 951 aminoácidos.

A expressão do gene, através de estudos de RNA mensageiro (RNAm), demonstrou estar presente em tecidos não-oculares como, coração, placenta, fígado, músculo esquelético e pâncreas; e nos tecidos oculares como, íris, esclera, corpo ciliar, malha trabecular, nervo óptico, dentre outros.

Este gene apresentou uma variação na sequência codificadora no éxon 17, uma troca do ácido aspártico por uma glicina (1.953GAC>GGC) no aminoácido 658 (D658G). Essa mutação segregou com o GPAA em uma família ligada ao *locus GLC1G* e estava ausente em 476 cromossomos de indivíduos normais avaliados (Monemi et al., 2005). Os autores observaram 4 diferentes tipos de mutações em 17 indivíduos com GPAA; sendo 11 com PIO elevada e 6 com Glaucoma de Pressão Normal (GPN).

Muitos dos estudos no gene *WDR36* foram realizados em populações caucasianas (Ray & Mookherjee, 2009). Um estudo realizado por Hauser et al. (2006) buscou determinar a distribuição de sequências variantes do gene *WDR36* em pacientes com GPAA. Foram identificadas 24 sequências variantes: quatro foram definidos como causador de doença, três como predisposições, e 17 como polimorfismos de SNPs. Entretanto, a distribuição destas

na genealogia, não demonstrou segregação consistente com a doença. Os autores concluíram que, em indivíduos portadores de GPAA e que apresentavam a variação – SNPs eram mais propensos a desenvolver uma doença mais severa do que aqueles pacientes afetados que não possuíam a variante; desta forma o gene *WDR36* parece agir como modificador. Outro estudo realizado por Finger et al. também não encontrou associação do gene *WDR36* com o GPAA (Finger et al., 2007). Entretanto, na população asiática, pesquisadores demonstraram uma variante I264V associada à doença (Miyazawa et al., 2007; Fan et al., 2009). Finalmente, um estudo na população Alemã com GPAA e GPN concluiu que o gene *WDR36* tem contribuição menor na patogênese da doença (Weisschuh et al. 2007; Pasutto et al. 2008).

Apesar de o gene *WDR36* ser considerado como um gene de maior influência no desenvolvimento do GPAA, a sua contribuição para a ocorrência do glaucoma ainda é controversa, devido à inconsistência das associações relatadas nas diferentes populações avaliadas (Fan et al., 2009).

Embora a função da proteína *WDR36* e o seu papel no glaucoma serem desconhecidos, há uma evidência sugerindo que o gene *WDR36* pode participar na ativação das células T em resposta a interleucina 2 (IL-2). Estudos iniciais sugeriram que alguns pacientes com glaucoma poderiam ter uma alteração da imunidade celular dependente de IL-2. Recentemente, outros estudos sugeriram que a resposta imunológica mediada pelas células T poderia influenciar a degeneração do nervo óptico tanto no glaucoma humano como em modelos da doença em ratos (Hauser et al., 2006).

1.3.8 - *GLC1H*

O oitavo *locus*, foi descrito no cromossomo 2 região p15- p16, em um intervalo de 7 cM entre os marcadores D2S123 e D2S2165. O estudo era proveniente de uma família com 113 membros, dos quais 10 eram afetados. A idade variava entre 48 - 78 anos (idade média de início aos 64 anos) e PIO variando de moderada a alta (18 – 36 mmHg) (Suriyapperuma et al., 2007).

Um segundo estudo, realizado em duas grandes famílias chinesas com GPAA de início juvenil, revelou que elas compartilham o mesmo haplótipo da doença, sugerindo um efeito fundador comum para a mutação na região 2p15 – p16. (Lin et al., 2008). O intervalo da doença estava localizado a 9,2 cM entre os marcadores D2S123 e D2S2397 sobrepondo em parte a região descrita previamente para o *locus GLC1H*.

1.3.9 - *GLCII*

O nono *locus*, *GLCII*, foi descrito em subtipos de famílias com GPAA de início precoce, estabelecendo ligação no cromossomo 15 região q 11 – 13, em um intervalo de 11 cM (Allingham, et al., 2005). Além disso, foi realizado um segundo estudo em famílias com GPAA de descendência Européia, onde evidenciou a ligação próxima ao *locus GLCII* previamente identificado (Woodroffe et al., 2006).

1.3.10 - *GLCIJ*

O décimo *locus*, *GLCIJ*, foi mapeado no cromossomo 9q22, por meio da avaliação dos haplótipos em 7 famílias com GPAA-J. Houve ligação entre os marcadores D9S1803 e D9S196 (Wiggs et al., 2004).

1.3.11 - *GLCIK*

O décimo primeiro *locus*, *GLCIK*, foi também descrito por Wiggs et al. (2004) em 5 famílias apresentando diagnóstico GPAA-J. O haplótipo representado por microssatélites nesta região mostrou ligação no cromossomo 20p12, entre os marcadores D20S189 e D20S104. A fim de refinar os limites dessa região e selecionar genes candidatos para mutações com importância funcional, Sud et al. (2008) estudaram 4 famílias (44 indivíduos) com GPAA-J. Utilizando a combinação de SNPs e marcadores microssatélites, o intervalo da região *GLCIK* foi reduzida para um máximo de 12,7 Mb e um mínimo de 9 Mb. Nesta região, foram encontrados 4 genes (*BMP2*, *PLCB1*, *PLCB4*, *BTBD*) considerados candidatos para o GPAA-J já que apresentam expressão e função ocular. Entretanto, após um rastreamento de mutações, estes foram excluídos como genes causadores de GPAA-J. (Sud et AL., 2008).

1.3.12 - *GLCIL*

O décimo segundo *locus*, *GLCIL*, foi identificado por meio de análise de ligação não-paramétrica em uma única e grande família da Tasmânia. Através de estudos anteriores em seis gerações dessa família, foi possível detectar a mutação Q368STOP (glutamina-368-STOP) no gene *MYOC* em nove dos 24 membros afetados; isto sugere uma heterogeneidade genética, indicando que algum outro gene poderia determinar um aumento da susceptibilidade para o desenvolvimento GPAA nesta família. Por este método foi possível identificar esse *locus* no braço curto do cromossomo 3 (3p21-22) em um intervalo de 8.3cM entre os marcadores D3S3521 e D3S1289. Nesta família, 11 membros afetados compartilham o mesmo alelo ancestral na região 3p21-22; dos quais 7 também apresentavam a mutação Q368STOP. O resultado deste estudo sugere uma possível interação entre o gene *MYOC* e o *locus* no cromossomo 3 (Shaarawy et al., 2009; Baird et al., 2005).

Outro estudo revelou o fenótipo do GPAA com ausência de PIOs elevadas associado com o *locus GLCIL*, com média máxima registrada de 23.9mmHg (Sherwin et al., 2009).

1.3.13 - *GLCIM*

O décimo terceiro *locus* descrito, *GLCIM*, foi mapeado no cromossomo 5 (5q22.1 – q32) em uma família da Filipinas de 5 gerações totalizando 55 membros dos quais 22 eram portadores de GPAA-J. A região flanqueada pelos marcadores D5S2051 e D5S2090 compreendia uma distância de 36Mb. É interessante ressaltar que esse novo *locus* identificado estava próximo, mas não sobreposto, ao *locus* previamente descrito *GLCIG* associado ao gene *WDR36* (Pang et al., 2006).

1.3.14 - *GLCIN*

O décimo quarto *locus*, *GLCIN*, foi descrito uma família Chinesa com 25 membros, no qual oito eram portadores de GPAA-J. O resultado da análise dos haplótipos por meio da utilização de microssatélites e SNPs permitiu o mapeamento do *locus* no cromossomo 15 (15q22 – q24). A extensão de 16.6Mb desta região era delimitada pelos marcadores D15S1036 e rs922693 (Wang et al., 2006).

1.3.15 - *GLCIO*

Relatos recentes têm sugerido que as neurotrofinas e seus receptores têm um papel protetor nas células ganglionares da retina. O gene *NTF4* está localizado no cromossomo 19q13.33, o qual foi previamente identificado como um *locus* para o glaucoma putativo por meio de *genome-wide linkage scan* (Pasutto et al., 2009).

O décimo quinto *locus* descreve sequências variantes no gene *NTF4*. Pasutto et al (2009) relataram sete mutações neste gene, representando cerca de 1,7% dos pacientes portadores de GPPA com origem européia, o que confere um aumento do risco para o desenvolvimento do GPAA, devido a alterações na função da proteína.

Outro estudo revela que não há associação de variantes no gene *NTF4* com o risco elevado de GPPA em indivíduos com ancestralidade européia (Liu et al., 2010). Entretanto, um estudo realizado por Vithana et al (2010) identificou uma mutação, Leu113Ser, no gene *NTF4* em um dos 174 pacientes com etnia chinesa portadores de GPAA. Este achado indica que mutações neste gene são causa rara de GPAA na China. Entretanto, é preciso analisar o gene *NTF4* em vários outros grupos de GPAA com diferentes etnias para esclarecer seu envolvimento com a doença (Vithana et al., 2010).

1.3.16 - *GLC1P*

O décimo sexto *locus*, *GLC1P*, foi identificado em uma família africano-americana. Por meio de estudos de ligação, foi possível identificar a região 12q14. Além disso, por meio de hibridização genômica comparativa e PCR quantitativa foi possível identificar uma região duplicada co-herdada com GPN neste *locus*. Foram encontrados alguns genes nesta região duplicada que são expressos na retina (Fingert et al., 2011).

1.3.17 - *GLC1Q*

O décimo sétimo *locus* foi descrito por Porter et al. (2011) em um estudo de quatro gerações de uma família britânica. Estes foram diagnosticados com GPAA apresentando um modelo de herança autossômico dominante. Este *locus* foi identificado no cromossomo 4 (4q35.1 – 4q35.2) por meio de estudo de ligação genômica por meio de SNPs com extensão de 1.866Mb.

1.3.18 - Outras regiões associadas ao GPAA.

O GPAA apresenta-se predominantemente como poligênico multifatorial (padrão complexo de herança), portanto é provável que diferentes conjuntos de fatores de riscos genéticos e ambientais contribuem para a regulação da PIO e da apoptose das células ganglionares (Wiggs et al., 2010). Estudos do tipo caso/controle em pacientes com GPAA e glaucoma de pressão normal (GPN) têm sido realizados identificando-se polimorfismos associados ao glaucoma em genes que estão envolvidos na apoptose, no estresse oxidativo, na disfunção mitocondrial e no controle da PIO. Parte destes genes incluem *CDH1* (Caderina 1), *CDKN1A* (cyclin dependent kinase inhibitor 1), *MTHFR* (5,10-methylenetetrahydrofolate reductase), *TNF* (Fator de Necrose Tumoral), *TP53* (Proteína tumoral p53), *GSTM1* (Glutationa S-transferase um 1), *GSTT1* (Glutationa S-transferase teta 1), *OPAI* (Atrofia óptica 1), *CYP1B1* (Citocromo P450, família 1, subfamília B, polipeptídeo 1) e *NOS3* (Óxido Nítrico Sintetase 3) . Utilizando estudo do tipo caso/controle, uma série de genes candidatos foram avaliados, no entanto, a força de associação desses estudos é variável, já que a maioria não foi replicado em outros estudos ou populações; provavelmente devido a pequenas amostras ou diferenças étnicas. Assim, uma avaliação mais aprofundada destes genes é justificada em amostras maiores e em diferentes populações. (Tabela 1) (Fan and Wiggs., 2010).

Tabela 1. Genes candidatos selecionados avaliados por estudos de associação de caso controle. Adaptado de (Fan and Wiggs, 2010).

Gene - Símbolo	Gene – Nome	Localização cromossômica	Condição
<i>ADRB1</i>	Receptor β 1 adrenérgico	10q24-q26	GPN
<i>ADRB2</i>	Receptor β 2 adrenérgico	5q32-q34	GPAA-A
<i>APOE</i>	Apolipoproteína E	19q13.2	GPN
<i>CYP46A1</i>	Citocromo P450, família 46, subfamília A, polipeptídeo 1	14q32.1	GPAA-A
<i>EDNRA</i>	Receptor endotelial,	4q31.2	GPN

	tipo A		
<i>HSPA1A</i>	Heat shock 70-Kd proteína A1	6p21.3	GPAA-A/GPN
<i>IGF2</i>	Fator de crescimento insulina-like II	11p15.5	GPAA-A
<i>MTHFR</i>	5,10 metileno tetraidrofolato redutase	1p36.3	GPAA-A/GPN
<i>MFN1</i>	Mitofusina 1	3q25-q26	GPN
<i>MFN2</i>	Mitofusina 2	1p36.2	GPN
<i>NOS3</i>	Óxido nítrico sintetase 3	7q36	GPAA-A
<i>OLFM2</i>	Olfactomedina 2	19p13.2	GPAA-A
<i>OPA1</i>	Atrofia óptica 1	3q28-q29	GPN
<i>PARL</i>	Presenilina associado com proteína rombóide	3q27	GPN
<i>PON1</i>	Paraoxonase 1	7q21.3	GPN
<i>TAP1</i>	Complexo de histocompatibilidade principal transportador de ATP	6p21.3	GPAA-A
<i>TLR4</i>	Toll like receptor 4	9q32-q33	GPN
<i>TNF</i>	Fator de necrose tumoral	6p21.3	GPAA-A
<i>TP53</i>	Proteína tumoral p53	17p13.1	GPAA-A

GPAA-A: Glaucoma primário de ângulo aberto do tipo juvenil. GPN: Glaucoma de pressão normal.

1.4 - Identificação de genes:

1.4.1 – Polimorfismos genéticos

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

Existem vários tipos de polimorfismos que podem ser constituídos desde variações como deleções, duplicações, triplicações de centenas a milhares de pares de bases de DNA até alterações de uma ou poucas bases no DNA localizadas entre genes, íntrons, e exons de

um determinado gene e em regiões reguladoras. Estas variações normalmente não estão associadas a qualquer fenótipo de doença, entretanto, os polimorfismos são elementos-chave na pesquisa e na prática da genética humana. A capacidade destes para distinguir diferentes formas de herança de um gene ou a diferentes segmentos do genoma associados a determinados fenótipos são ferramentas utilizadas no diagnóstico e tratamento de doenças (Thompson et al., 2008).

1.4.2 - Análise de ligação

A ligação é a tendência que os alelos nos *loci* reunidos no mesmo cromossomo têm de serem transmitidos juntos em blocos na genealogia; esses blocos são assim conhecidos como haplótipos (Thompson et al., 2001). É uma estratégia a fim de verificar se dois genes correspondentes apresentam ligação (segregação na família) através da avaliação de uma determinada característica ou doença em famílias.

O estudo de ligação foi inicialmente descrito em 1931, pelo físico alemão Bernstein, e tem como princípio determinar a frequência de recombinação meiótica entre duas entidades genéticas (atualmente microssatélites, *Single Nucleotide Polymorphisms* - SNPs) situados em um mesmo cromossomo. Quanto menor a distância entre estas duas entidades, menor a frequência de recombinação entre elas, ou seja, quanto menor a frequência, mais próxima está os dois *loci*. Portanto, a ligação genética é detectada quando os haplótipos são transmitidos de uma geração a outra sem que ocorra recombinação entre elas (Strachan, Read, 2002; Griffiths et al., 2008).

Se dois *loci* estão próximos que $\theta = 0$ entre eles, estes são considerados fortemente ligados; se por sua vez estiverem tão distantes entre si que $\theta = 0,5$, eles estão se distribuindo independentemente e não estão ligados. A distância do mapa entre dois *loci* é medida em centimorgans (cM), definida como o comprimento genético sobre o qual, em média, ocorre um *crossing over* em 1% das meioses (o centimorgan equivale a 1/100 de um morgan, designado a partir de Thomas Hunt Morgan, que foi o primeiro observador de um *crossing over* genético na mosca das frutas – *Drosophila*). A medida de θ , requer métodos estatísticos para saber o grau de exatidão e confiabilidade da medida. O método estatístico para medir θ a partir de dados provenientes de famílias é denominado o método de valor *lod*, é a base para a análise de ligação (Thompson et al., 2008).

Como dito acima, um dos cálculos estatísticos paramétricos utilizados para confirmar ou afastar ligação é o *lod score* (Z). Este teste é dito paramétrico porque exige um modelo

genético preciso, que especifique o modo de herança, as frequências gênicas e a penetrância de cada genótipo (Kruglyak et al., 1996).

O cálculo é baseado na razão entre a probabilidade de ligação e a probabilidade de não-ligação. Por definição, os valores de Z maiores que 3.00 sugerem ligação, enquanto valores de Z menores que -2.00 excluem ligação e valores intermediários entre 3.00 e -2.00 são não conclusivos. Portanto, o valor de Z pode fornecer uma melhor estimativa da frequência de recombinação entre um *locus* marcador e o *locus* da doença. Para calcular estas probabilidades são utilizados programas computacionais que realizam o cálculo de *Lod score*, como o programa LINKAGE (Strachan, T. and Read, A. P.; 1999).

Para o estudo de ligação são utilizados marcadores moleculares. Estes são definidos como qualquer característica, herdadas geneticamente, localizada na mesma posição num par de cromossomos homólogos permitindo distinguir um homólogo do outro. Os dois principais tipos de marcadores moleculares usados no mapeamento de genes são polimorfismos de um só nucleotídeo (SNP) e polimorfismos de tamanho de sequência simples (microsatélites), e serão descritos a seguir (Thompson et al., 2002; Griffiths et al., 2009).

1.4.3 - Microsatélites

Os marcadores do tipo microsatélites ou *Short Tandem Repeat* (STR) são bastante utilizados por serem altamente polimórficos. Esses marcadores são baseados em número de repetições em tandem de uma sequência mais simples, são trechos de unidades de di, tri ou tetranucleotídeos, sendo a repetição dinucleotídica CA a mais abundante. O número de unidades de nucleotídeos repetidos contidos dentro do microsatélite pode diferir entre os dois cromossomos homólogos de uma pessoa e entre pessoas na população, o que determina sua característica polimórfica fundamental para a análise de ligação.

Um determinado microsatélite é, portanto, um *locus* polimórfico, e os diferentes números de unidades repetidas em um determinado microsatélite constituem os alelos deste *locus* e pode ser genotipado a partir da análise do tamanho do fragmento de PCR gerado pelos iniciadores que flanqueiam os microsatélites repetidos (Thompson et al., 2008).

Os microsatélites são bastante úteis no mapeamento genético por serem abundantemente distribuídos pelo genoma, um conjunto desses marcadores, com distâncias semelhantes entre si, cobrem todo o genoma. Além disso, são altamente polimórficos; decorrentes de altas taxas de mutações. As variações no número de repetições em *tandem*

minimizam as chances de dois indivíduos apresentarem o mesmo perfil de marcadores microssatélites, distribuídos no genoma ou em parte deles.

Para classificar e organizar os microssatélites é seguida uma notação, como exemplo têm-se o marcador D1S166. A letra D significa *Dinucleotide*, o próximo caractere indica o cromossomo onde o microssatélite se encontra (cromossomo 1), sendo X ou Y se o marcador se encontra nos cromossomos sexuais. A próxima letra, S, significa *Sequence* (sequência 166), e o número a seguir indica a ordem em que este microssatélite foi identificado por cromossomo (Secolin *et al.*, 2008).

1.4.4 – Polimorfismos de nucleotídeos únicos – SNPs

Os polimorfismos de nucleotídeos únicos ou *Single Nucleotide Polymorphism* (SNPs) são uma classe mais geral de polimorfismos, que surgem a partir de mudanças em nucleotídeos únicos (A, T, C ou G) de uma determinada sequência de DNA. Para uma variação ser considerada um SNP, sua distribuição deve ocorrer em pelo menos 1% na população, além disso, são mais frequentes que os polimorfismos de microssatélites e estão uniformemente distribuídos por todo o genoma. Estas características os tornam excelentes marcadores para gerar mapas genéticos densos, tais como os necessários para avaliar a contribuição potencial de um determinado gene para um distúrbio complexo, assim como os seres humanos respondem a fatores ambientais, fármacos entre outros. (Thompson *et al.*, 2008). Muitos SNPs não são responsáveis pelo estado da doença, mas apontam para ela através do mapa genético, porque geralmente estão localizados perto do gene associado à doença.

De acordo com o projeto *HapMap* (projeto que inclui vários países para identificar e catalogar semelhanças e diferenças genéticas em seres humanos) há aproximadamente 10 milhões de SNPs presentes no genoma humano (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>). Em humanos, acredita-se que existam 3 milhões de SNPs distribuídos mais ou menos aleatoriamente, com uma frequência de 1 em cada 300 a 1.000 bases (Griffiths *et al.*, 2008).

Embora todos os SNPs possam ser usados no mapeamento, alguns têm outras aplicações, dependendo de seu efeito fenotípico. Os SNPs podem ser classificados, de forma geral, como silenciosos quando não levam a troca de um aminoácido; SNPs nos quais um alelo causa um fenótipo mutante relacionado a herança monogênica, o qual dentro da sequência codificante um alelo de SNP inativa ou altera a função gênica e SNPs cuja presença contribui para a variação na intensidade ou na suscetibilidade para determinado

fenótipo. Finalizando, SNPs intergênicos, que não apresentam efeito fenotípico mensurável, mas são úteis como marcadores de genes de interesse, e SNPs cuja presença altera o tamanho do fragmento gerado por uma enzima de restrição sítio dirigida (Griffiths et al., 2008).

Um modelo de mapeamento genético por SNPs é no estudo da degeneração macular relacionada à idade – DMRI. A DMRI é uma doença ocular que afeta a mácula, a parte central da retina, levando a perda da visão central (Wysokinski et al., 2012). Por meio desta abordagem identificaram-se variantes de risco no gene que codifica o fator de complemento H (gene CFH) para o desenvolvimento desta condição (Almeida et al, 2009).

JUSTIFICATIVA

2 - Justificativa

O GPAA é uma neuropatia óptica crônica e irreversível, responsável pela incapacidade visual grave de milhões de pessoas, sendo considerada a segunda maior causa de cegueira no mundo. Apesar de ser um processo irreversível, a cegueira pelo glaucoma pode ser prevenida. O diagnóstico precoce e a identificação dos casos que apresentam um maior risco de desenvolver a cegueira podem possibilitar uma aplicação adequada dos limitados recursos de saúde pública para uma efetiva prevenção da cegueira pelo glaucoma.

O estudo epidemiológico torna-se um importante instrumento na contribuição para o conhecimento do GPAA. Os dados epidemiológicos documentam a frequência e a distribuição da doença em muitas populações indicando fatores de risco genéticos e não genéticos para o desenvolvimento da GPAA.

Por ser uma doença complexa e apresentar base genética ainda não compreendida em sua totalidade, estudos envolvendo diferentes populações com GPAA, particularmente na população brasileira, tem o potencial de aumentar a resolução de mapas genéticos de *loci* associados ao GPAA, contribuindo para o melhor entendimento da base genética desta afecção. A determinação dos *loci* investigados foi baseada, inicialmente, nos *loci* já descritos associados ao GPAA e, entre estes, naqueles não excluídos em estudos realizados previamente nestas mesmas famílias brasileiras por meio de estudos de ligação utilizando-se marcadores do tipo microssátelites. Uma segunda abordagem seria a utilização de “microarrays” de SNPs para uma busca genômica completa.

OBJETIVOS

3 - Objetivos

- Avaliar os *loci* candidatos associados ao glaucoma (*GLCIA*, *GLCIJ* - *GLCIN*) por meio de estudo de ligação em famílias informativas portadoras de GPAA, com a utilização de microssatélites (“Human Linkage Mapping Set”, Applied Biosystems, Foster City, CA).

- Realizar, simultaneamente, a análise de ligação em duas famílias por meio de lâminas ou “microarrays” de SNPs (“SNP array”), utilizando-se o “GeneChip® Mapping 10K 2.0 Array” (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA).

CASUÍSTICA

4 - Casuística

4.1 - Recrutamento das famílias com GPAA

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em seres humanos da Faculdade de Ciências Médica da Unicamp. Todos os participantes assinaram o termo de consentimento Livre e Esclarecido de acordo com a Declaração de Helsink (anexo1) – Resolução 196/96- Ministério da saúde. Foram recrutados pacientes pertencentes as famílias com GPAA, os quais foram selecionados no Serviço de Glaucoma do Ambulatório de Oftalmologia da Unicamp.

Foram avaliados neste estudo 30 pacientes pertencentes a duas famílias, incluindo indivíduos sem glaucoma (não afetados) e pacientes com GPAA/HO (afetados) tabelas 2 e 3.

4.2 - Critérios de Inclusão

O GPAA será definido como:

- ângulo aberto à gonioscopia, com visibilização até esporão escleral em pelo menos 180 graus
- Combinações de alteração glaucomatosa do disco óptico incluindo pelo menos duas das condições a seguir: redução localizada da rima neural; aumento vertical da razão escavação/disco, com alteração do padrão inferior, superior, nasal e temporal de maior para menor espessura da rima nervosa; hemorragia e assimetria da razão escavação/disco maior ou igual a 0,2 segundo avaliação oftalmológica sob visão binocular e,
- lesão glaucomatosa do disco óptico acompanhada por perda de campo visual correspondente na perimetria computadorizada acromática, caracterizada por: três pontos adjacentes não periféricos com $p < 5\%$, sendo que um deles com $p < 1\%$ pertencentes ao gráfico de probabilidades do *pattern deviation*; *corrected pattern standard deviation* com $p < 5\%$ e *glaucoma hemifield test* apresentando o resultado *borderline* ou *outside normal limits*.

4.3 - Critérios de exclusão

Foram excluídas do estudo famílias de pacientes que apresentaram:

- alterações de segmento anterior compatíveis com glaucomas secundários (ou de desenvolvimento) e/ou,
- qualquer outra doença ocular ou sistêmica que pudesse levar a alterações de disco óptico e campo visual simulando lesões glaucomatosas.
- além disso, pacientes com GPAA nos quais não foi possível avaliação oftalmológica e genética de seus familiares também foram excluídos do estudo.

4.4 - Grupo controle

O grupo controle incluiu indivíduos atendidos no Serviço de Glaucoma do Ambulatório de Oftalmologia da UNICAMP sem sinais de alteração glaucomatosa do disco óptico e de campo visual. Além disso, esses indivíduos deveriam apresentar:

- idade superior a 50 anos,
- ausência de antecedente familiar com glaucoma e cegueira ocular de causa desconhecida,
- PIOs menores que 15mmHg sem qualquer forma de glaucoma retinar,
- razão escavação/disco menor do que 0,3.

Este grupo controle foi utilizado na determinação da frequência alélica dos microssatélites empregados no estudo de ligação dos *loci* candidatos associados ao GPAA.

4.5 - Exame Oftalmológico

Pacientes com glaucoma e membros da família, além dos indivíduos pertencentes ao grupo controle, foram submetidos a exame oftalmológico, que consistia:

1. Medida da acuidade visual com correção, utilizando a tabela de optotipos de Snellen, localizada a seis metros de distância do paciente;
2. Medida do erro refracional em dioptrias com refrator Topcon VT-10 (Tóquio, Japão), seguido do cálculo do equivalente esférico (EE). Este valor foi obtido a partir da fórmula: $EE = DE + DC/2$, sendo DE correspondente ao grau em dioptrias esféricas e DC correspondente ao grau em dioptrias cilíndricas;

3. Biomicroscopia do segmento anterior realizada em lâmpada de fenda Haag-Streit, modelo 900 (Haag Streit, Berna, Suíça);
4. Tonometria de aplanção com tonômetro calibrado de Goldmann (modelo R-500 – Haag Streit, Berna Suíça). Medida da espessura central da córnea por meio de paquímetro ultrassônico;
5. Gonioscopia com lente de Posner (Ocular Instruments Inc., Belleue, E.U.A.);
6. Biomicroscopia de fundo de olho (retina, com a lente 2.2 (Volk Optical Inc., Mentor, E.U.A.) e disco óptico com a lente esférica Volk + 78 dioptrias (Volk Optical Inc., Mentor, E.U.A) após midríase obtida com a instilação de 1 gota de tropicamida 1%;
7. Perimetria computadorizada branco no branco realizada no perímetro *Humphrey Field Analyzer II*, modelo 750, software versão A-10 (Zeiss Humphrey Systems, Califórnia, E.U.A) estratégia 24.2 SITA Standard. Os indivíduos receberam orientações prévias de como proceder durante a realização do exame.

4.6 - Heredogramas

O núcleo familiar de cada paciente apresenta-se na forma de um heredograma (figura3 e 4). Além disso, foi descrito informações como o diagnóstico, a idade de diagnóstico da doença, PIO máxima, relação escavação/disco e número de medicações assim como a necessidade ou não de procedimento cirúrgico para controle do glaucoma (Tabelas 2 e 3). A classificação étnica das famílias baseou-se na autoreferência, a família 1 de cor branca e a família 2 de cor parda.

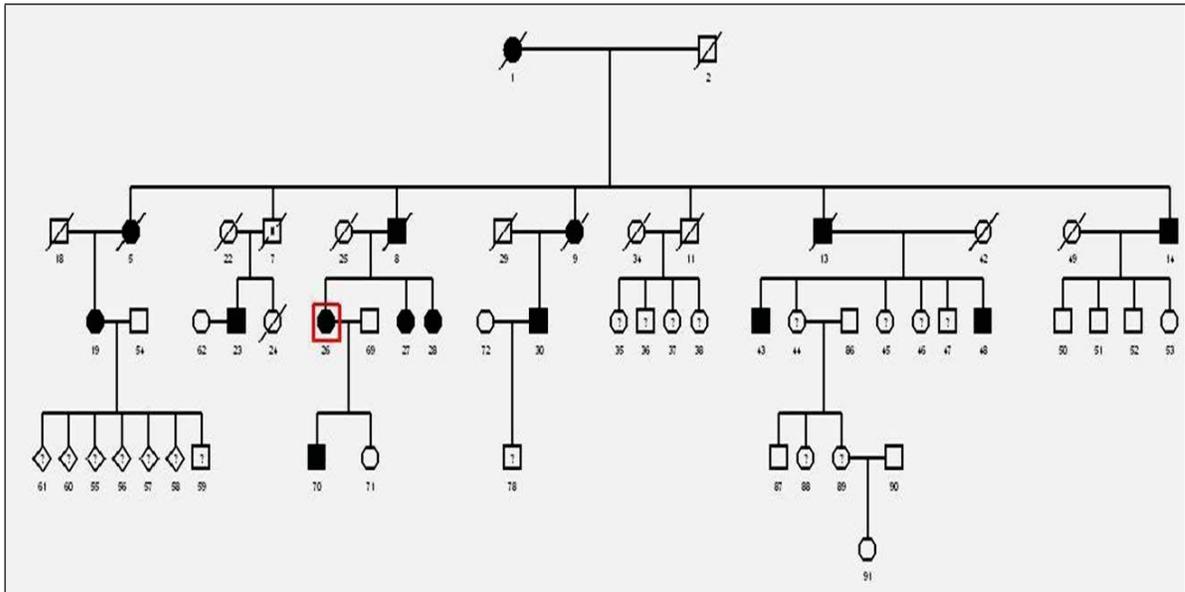


Figura 3: Heredograma família 1. □ Homem não afetado. ○ Mulher não afetada. Homem afetado ■ Homem afetado. ● Mulher afetada. ◇ Sexo indefinido. Indivíduo destacado em vermelho: probando.

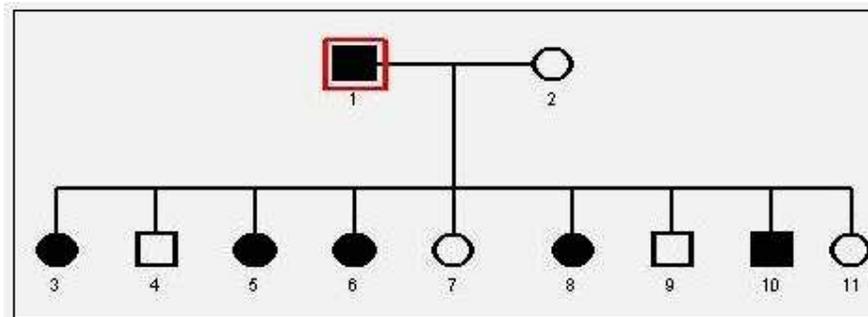


Figura 4: Heredograma família 2. □ Homem não afetado. ○ Mulher não afetada. ■ Homem afetado. ● Mulher afetada. ◇ Sexo indefinido. Indivíduo destacado em vermelho: probando.

Tabela 2. Dados clínicos da família 1.

identificação	diagnóstico	Idade/ idade ao diagnóstico (anos)	PIO máxima olho direito (mmHg)	PIO máxima olho esquerdo (mmHg)	Relação escavação disco olho direito vertical	Relação escavação disco olho esquerdo vertical	Número decirurgias para glaucoma/ número de colírios para glaucoma
01	GPAA	93/30	21	21	0.9	0.9	1/1
02	GPAA	90/80		20		0.9	-/3
03	GPAA	84/40	16	21	0.7	0.9	-/2
04	GPAA	78/50	20	36	0.5	1.0	1/3
05	GPAA	75/52	32	30	0.9	0.9	2/1
06	GPAA	80/37	> 23	> 23	0.8	0.8	-/3
07	GPAA	63/-	14	14	0.3	0.3	-/-
08	GPAA	83/72	23	24	0.7	0.8	-/-
09	nl	55/-	20	21	0.3	0.2	-/-
10	nl	54/-	19	19	0.5	0.5	-/-
11	nl	61/-	12	12	0.3	0.3	-/-
12	nl	64/-	16	15	0.3	0.3	-/-
13	GPAA	54/51	>20	>20	0.5	0.5	-/2
14	nl	78/-	18	19	0.3	0.3	-/-
15	GPAA	55/40	24	23	0.7	0.7	-/2
16	nl	60/-	18	16	0.3	0.4	-/-
17	nl	53/-	19	18	0.5	0.4	-/-
18	nl	60	16	17	0.4	0.4	-/-
19	nl	46	15	13	0.6	0.4	-/-

GPAA: glaucoma primário de ângulo aberto. PIO: pressão intra-ocular. mmHg: milímetros de mercúrio.

Tabela 3: Dados clínicos da família 2.

identificação	diagnóstico	Idade/ idade ao diagnóstico (anos)	PIO máxima olho direito (mmHg)	PIO máxima olho esquerdo (mmHg)	Relação escavação disco Olho direito vertical	Relação escavação disco Olho esquerdo vertical	Número decirurgias para glaucoma/ número de colírios para glaucoma
01	GPAA	79/64	27	26	0.8	0.9	2/2
02	nl	76/-	16	15	0.7	0.6	-/-
03	GPAA	41/34	21	22	0.7	0.6	-/1
04	nl	42/-	15	15	0.5	0.5	-/-
05	GPAA	43/42	21	22	0.8	0.8	-/1
06	GPAA	47/33	38	35	0.9	0.9	-/4
07	nl	48	20	20	0.6	0.6	-/-
08	GPAA	49/37	30	27	0.9	0.9	-/3
9	nl	51	19	18	0.4	0.4	-/-
10	GPAA	52/38	25	25	0.8	0.8	-/1
11	nl	55/-	18	19	0.6	0.7	-/-

GPAA: glaucoma primário de ângulo aberto. PIO: pressão intra-ocular. mmHg: milímetros de mercúrio.

MÉTODOS

5 – Métodos

5.1 – Extração de DNA

Foram colhidos de 20 a 30 ml de sangue periférico em frasco estéril, com EDTA 10% como anticoagulante, de todos os indivíduos incluídos no estudo para posterior extração de DNA. As amostras foram extraídas por meio do *QIAamp® DNA Blood Midi Kit* (Qiagen, Hamburg, Germany). A coleta de sangue periférico para a extração de DNA genômico desses indivíduos foi obtido mediante a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

5.2 – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As amostras foram amplificadas em placas de 96 amostras contendo um volume final de 7,5µL, composto por:

- 0,6µL de DNA genômico (50ng/uL);
- 0,5µL da mistura de *primers* (5 µM de cada “primer”; Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA);
- 0,75µL da mistura de dNTPs (2,5mM),
- 0,06µL de Taq DNA polimerase (5 unidades/µL); 0,75µL do Tampão 10x (100 mM Tris-HCl - 500 mM KCl - 0.8% (v/v) Nonidet P40);
- 0,75µL de MgCl₂ (50 mM) e
- 4,09µL H₂O (com exceção dos *primers*),

Os reagentes para a PCR foram provenientes da empresa - Invitrogen™ Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA). As reações de PCR foram conduzidas sob as seguintes condições:

- 1 ciclo de 95°C por 12min,
- 10 ciclos de 94°C por 15seg,
- X°C por 15seg,
- 72°C por 30seg;
- 20 ciclos de 89°C por 15seg,
- X°C por 15seg,
- 72°C por 30seg; e
- 72°C por 10min,

- onde X é igual à temperatura de anelamento que variou de 51 a 59°C.

5.3 Genotipagem

5.3.1 - Genotipagem por meio de microsatélite

A genotipagem foi realizada por meio de 10 marcadores do tipo microssatélites, marcados com fluorescência, espalhados pelo genoma humano a uma resolução média de 10 cM. Os marcadores utilizados foram customizados ou escolhidos a partir do *Human Linkage Mapping Set* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Os critérios para escolha dos marcadores foram a sua localização nos *loci* candidatos e o maior grau de heterozigosidade – mínimo de 75%, segundo os mapas descritos acima. (Tabela 4).

Os produtos das reações de PCR foram submetidos à eletroforese no analisador automático de DNA *MegaBACE 1000 96-capillary sequencer* (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) na presença de um padrão interno de peso molecular.

Foram avaliadas as regiões candidatas, previamente descritas, associadas ao GPAA: *GLCIA*, *GLCIJ* a *GLCIN*. Os outros *loci* associados ao GPAA, *GLCIB* a *GLCII* foram excluídos previamente em outro estudo envolvendo estas famílias (Vasconcellos et al 2010). Na hipótese de identificação de regiões do genoma relacionadas a este grupo de pacientes com GPAA, estas áreas foram saturadas por marcadores com uma menor distância genética, utilizando os mesmos critérios para a escolha dos marcadores iniciais.

Os genótipos foram determinados por meio da utilização do programa *Fragment Profiler* (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Os resultados obtidos com o uso deste programa foram submetidos à análise estatística por métodos paramétricos, o qual se utiliza o cálculo de *lod scores* (*Z*) de dois pontos através do programa LINKAGE para verificar se houve ou não ligação. *Lod scores* iguais ou acima de 3,00 indicam ligação, e *lod scores* menores que ou iguais a -2,00 excluem ligação.

Tabela 4. Marcadores do tipo microssatélites por *loci* associado ao GPAA.

<i>LOCUS</i>	MARCADOR	LOCALIZAÇÃO (cM)	PIC	VTF	CPR	CORANTE
<i>GLCIA</i> <i>MYOC</i>	D1S2815	188,85	0,83	205-248	CA	NED
<i>GLCIJ</i> 9q22	D9S1690	106,5	0,78	226-240	CA	FAM
<i>GLCIK</i> 20p12	D20S119	61	0,82	103-123	CA	FAM
	D3S2338	36,3	0,86	89-109	CA	VIC
<i>GLCIL</i> 3p21-22	D3S1289	69,1	0,81	202-224	CA	NED
	D3S1285	91	0,73	233-251	CA	NED
	D5S471	129,6	0,76	235-255	CA	NED
<i>GLCIM</i> 5q22.1 - q32	D5S2115	138,6	0,76	142-170	CA	VIC
<i>GLCIN</i> 15q22 - q24	D15S117	50,8	0,78	321-339	CA	NED
	D15S153	62,1	0,87	240-274	CA	NED

PIC = *polymorphism information content* (heterozigosidade); VTF = variação do tamanho do fragmento amplificado; CPR = caracterização dos padrões de repetições; CORANTE = marcação utilizada no *primer sense*.

5.3.2 - Genotipagem pela técnica de SNP array

A varredura no genoma foi realizada utilizando-se o *GeneChip® Mapping 10K 2.0 Array* (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA). Esta técnica, cujo princípio é a hibridização, foi desenvolvida de acordo com as recomendações do fabricante e seguiu as seguintes etapas:

- Digestão das amostras com enzima de restrição *XbaI*
- Reação de ligação com adaptadores
- Amplificação dos fragmentos por PCR e posterior purificação
- Fragmentação dos produtos da PCR
- Marcação do DNA por fluorescência
- Hibridização das amostras de DNA marcadas aos chips de *array* e posterior lavagem
- Escaneamento dos chips por meio do *GeneChip® Scanner 3000 7G* (Affymetrix)

· Análise das imagens e dados através do programa *GeneChip® Operating Software (GCOS)* (Affymetrix®).

Os dados dos “SNPs arrays” foram compilados em um único arquivo utilizando-se o *GENECHIP® OPERATING SOFTWARE (GCOS)* (Affymetrix®) e a qualidade desses dados foram analisadas pelo *GENECHIP® GENOTYPING ANALYSIS SOFTWARE (GTYPE)* v. 4.0 (Affymetrix®). Para processar os dados do *GTYPE* em dados utilizáveis para as análises estatísticas foi utilizado o programa JINGLEFIX (Secolin et al., 2008). Valores de *lod score* foram obtidos por meio de análise de ligação paramétrica MERLIN (Abecasis et al., 2002), onde valores de $Z \geq 3$ indicam ligação e valores $Z \leq -2$ excluem ligação, e a prevalência do GPAA foi estimada em 2%. Os parâmetros utilizados como referência pelo programa *GTYPE* foram: *call rate* e erros mendelianos, o *call rate* considerado para análise foi 85% e erros mendelianos maiores que 2 foram excluídos da análise.

RESULTADOS

6. Resultados

6.1. Microssatélites

Durante a realização dos experimentos de genotipagem por meio dos marcadores do tipo microssatélites para os loci *GLCIA*, *GLCIJ*, *GLCIK*, *GLCIL*, *GLCIM*, *GLCIN* constatou-se que não houve heterozigidade de varios microssatélites para estas regiões nestas famílias brasileiras, ou seja, não foram informativos o que restringiu a análise de ligação para um pequeno número de marcadores.

Foram avaliados seis *loci* associados ao GPAA (*GLCIA*, *GLCIJ*, *GLCIK*, *GLCIL*, *GLCIM*, *GLCIN*) por meio da análise de ligação em 33 indivíduos da família 1 e em 18 indivíduos da família 2 portadores de GPAA. A frequência de recombinação de cada marcador foi calculada para ambas a famílias separadamente (tabelas 5 e 6).

Tabela 5. Valores de *lod score* para a família 1 portadora de GPAA.

<i>Locus</i>	Marcador	Frequência de Recombinação								
		0.00	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35	0.40
<i>GLCIA</i>	D1S2815	-4.19	-2.16	-1.50	-1.05	-0.74	-0.51	-0.34	-0.21	-0.12
<i>GLCIJ</i>	D9S1690	-6.51	-2.69	-2.02	-1.58	-1.20	-0.88	-0.62	-0.41	-0.23
<i>GLCIK</i>	D20S119	-3.20	-1.80	-1.19	-0.80	-0.53	-0.33	-0.20	-0.11	-0.05
	D3S2338	-0.95	0.20	0.40	0.49	0.51	0.50	0.45	0.37	0.27
<i>GLCIL</i>	D3S1285	-3.34	-0.96	-0.52	-0.31	-0.20	-0.14	-0.11	-0.08	-0.05
	D3S1289	-2.66	-0.73	-0.25	-0.01	0.1	0.14	0.15	0.13	0.1
<i>GLCIM</i>	D5S471	-6.35	-3.03	-2.08	-1.44	-0.97	-0.62	-0.37	-0.19	-0.07
	D5S2115	-5.04	-2.99	-2.04	-1.41	-0.95	-0.62	-0.39	-0.22	-0.11
<i>GLCIN</i>	D15S153	-0.81	-0.71	-0.58	-0.48	-0.43	-0.38	-0.33	-0.27	-0.19
	D15S978	-3.57	-1.52	-0.83	-0.36	-0.06	0.12	0.20	0.21	0.17

Tabela 6. Valores de *lod score* para a família 2 portadora de GPAA.

<i>Locus</i>	Marcador	Frequência de Recombinação								
		0.00	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35	0.40
<i>GLCIA</i>	D1S2815	-0.05	-0.05	-0.05	-0.04	-0.03	-0.02	-0.02	-0.01	-0.01
<i>GLCIJ</i>	D9S1690	0.95	0.90	0.82	0.73	0.63	0.51	0.39	0.26	0.13
<i>GLCIK</i>	D20S119	-0.03	-0.03	-0.02	-0.02	-0.02	-0.02	-0.01	-0.01	-0.01
	D3S2338	-2.81	0.43	0.57	0.59	0.55	0.47	0.37	0.26	0.15
<i>GLCIL</i>	D3S1285	-2.03	-1.25	-0.87	-0.61	-0.42	-0.28	-0.17	-0.1	-0.04
	D3S1289	-2.85	-0.76	-0.43	-0.25	-0.13	-0.05	-0.00	0.02	0.03

<i>GLCIM</i>	D5S471	-3.67	-0.77	-0.44	-0.26	-0.14	-0.07	-0.02	0.01	0.02
	D5S2115	-0.03	-0.03	-0.02	-0.02	-0.01	-0.01	-0.01	-0.00	-0.00
<i>GLCIN</i>	D15S153	0.54	0.55	0.53	0.49	0.43	0.36	0.27	0.17	0.08
	D15S978	-0.22	-0.10	-0.03	0.02	0.04	0.04	0.03	0.01	-0.01

A família 1 apresentou ausência de ligação nos *loci* *GLCIA*, *GLCIJ*, *GLCIK* e *GLCIM*. A família 2 apresentou exclusão apenas no *locus* *GLCIL*. Para ambas as famílias, não houve valores de *lod scores* acima de 3,00 nos *loci* analisados. Entretanto, alguns marcadores não puderam ser totalmente excluídos, pois apresentaram um valor intermediário entre -2,00 e 3,00 na frequência $\theta = 0.00$.

6.2. SNP

Os nucleotídeos de polimorfismos únicos (SNPs) foram utilizados para genotipar 19 indivíduos da família 1 e 11 indivíduos da família 2.

Na família 1, após a análise das lâminas de *microarray* de 10k foram encontradas três regiões cromossômicas (1, 5 e 14) com valores de *lod scores* variando entre 1,7 e 2,08. (Figura 5).

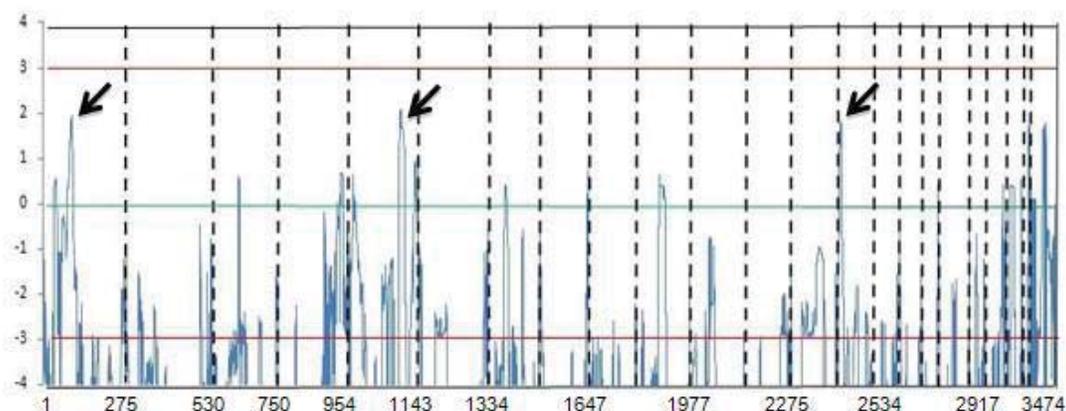


Figura 5. Representação da distribuição dos SNPs na família 1. Os marcadores com “*lod scores*” maiores que 1,7 estão indicados pela seta.

No cromossomo 1 região p22.3 foram encontrados 6 SNPs; rs1775986, rs2014733, rs1032959, rs719015, rs719795 e rs726300 com valores de *lod scores* de 1.78, 1.79, 1.82, 1.84, 1.85 e 1.87, respectivamente; além desses, foram encontrados 3 SNPs - rs1391802,

rs1074541 e rs972314 na região 1p22.2 com valores de *lod scores* de 1.92, 1.95 e 1.73, respectivamente.

No cromossomo 5 foram encontrados 8 SNPs - rs2060428, rs1034664, rs2349034, rs700627, rs2351463, rs1368374, rs443587 e rs436404 na região 5q31.2 com valores de *lod scores* de 2.00; 2.01; 2.01; 2.06; 2.08; 2.08; 2.08; 2.08; respectivamente. Além destes, 4 SNPs – rs155947, rs1368375, rs56002 e rs1363448 com valores de *lod scores* de 2,08, 2,08, 2.05 e 2.03, respectivamente na região 5q31.3.

Por fim, no cromossomo 14 foram encontrados 13 SNPs com valores de *lod scores* maiores que 1,2 na região 14q12 (tabela 7).

Tabela 7. Lista de SNPs encontrados no cromossomo 14 com seu respectivo *lod score* e localização.

<i>SNP</i>	<i>Localização</i>	<i>Lod score</i>
rs1115240	14q12	1,21
rs721282	14q12	1,25
rs719484	14q12	1,33
rs1998462	14q12	1,34
rs1998463	14q12	1,34
rs1367317	14q12	1,36
rs1950710	14q12	1,59
rs2225899	14q12	1,68
rs1953721	14q12	1,69
rs1033706	14q12	1,75
rs2144876	14q12	1,76
rs720045	14q12	1,76
rs717332	14q12	1,81

O cromossomo 5 atingiu valores de *lod score* maiores do que nos cromossomos 1 e 14, chegando muito próximo a 2,1 em um grupo de *SNPs*. Mesmo com *lod scores* menores que 3,00 essas regiões são potenciais candidatas, conseqüentemente foram refinadas com quatro marcadores do tipo microssatélites para identificação de possíveis genes de susceptibilidade para o GPAA. (tabela 8). Os marcadores utilizados foram escolhidos a partir do mapa genético humano *Généthon*.

Tabela 8. Marcadores do tipo microssatélites no *locus* 5q31.2

<i>Locus</i>	<i>Marcador</i>	<i>LOCALIZAÇÃO</i> (cM)	<i>PIC</i>	<i>VTF</i>	<i>CPR</i>	<i>CORANTE</i>
<i>GLC1E</i>	D5S2117	137.39	0.88	179 - 237	CA	FAM

<i>GLC1E</i>	D5S2057	135.25	0.80	100 - 124	CA	FAM
<i>GLC1E</i>	D5S414	141.82	0,83	185 - 206	CA	FAM
<i>GLC1E</i>	D5S816	139.33	0,83	225-257	CA	FAM

PIC = *polymorphism information content* (heterozigosidade); VTF = variação do tamanho do fragmento amplificado; CPR = caracterização dos padrões de repetições; CORANTE = marcação utilizada no *primer sense*.

Os genótipos foram determinados por meio da utilização do programa *Fragment Profiler* (Amersham Biosciences). Os resultados obtidos com o uso deste programa foram submetidos à análise estatística por métodos paramétricos, o qual se utiliza o cálculo de *lod scores* (*Z*) de dois pontos através do programa LINKAGE para verificar se houve ou não ligação. *Lod scores* iguais ou acima de 3,00 indicam ligação, e *lod scores* menores que ou iguais a -2,00 excluem ligação. A frequência de recombinação de cada marcador foi calculada para a família. Para os marcadores D5S2117, D5S2057 e D5S414 observou-se ausência de ligação na frequência $\theta = 0.00$ (Tabela 9). Para o marcador D5S816, na mesma frequência de recombinação, o valor de *lod score* foi inconclusivo (tabela 9).

Tabela 9. Valores de *lod score* para a família 1 portadora de GPAA no locus 5q31.2.

Marcador	Frequência de Recombinação								
	0.00	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35	0.40
D5S2117	-9.74	-2.85	-1.72	-1.11	-0.73	-0.47	-0.28	-0.15	-0.06
D5S2057	-5.75	-2.7	-1.8	-1.26	-0.88	-0.59	-0.38	-0.21	-0.1
D5S414	-12.64	-4.15	-2.73	-1.92	-1.35	-0.91	-0.58	-0.32	-0.15
D5S816	-1.39	0.25	0.45	0.51	0.5	0.43	0.33	0.22	0.12

Na segunda família, identificou-se através das lâminas de *microarray* de 10k valores de *lod scores* maiores que 2,0 no cromossomo 2 (Figura 6).

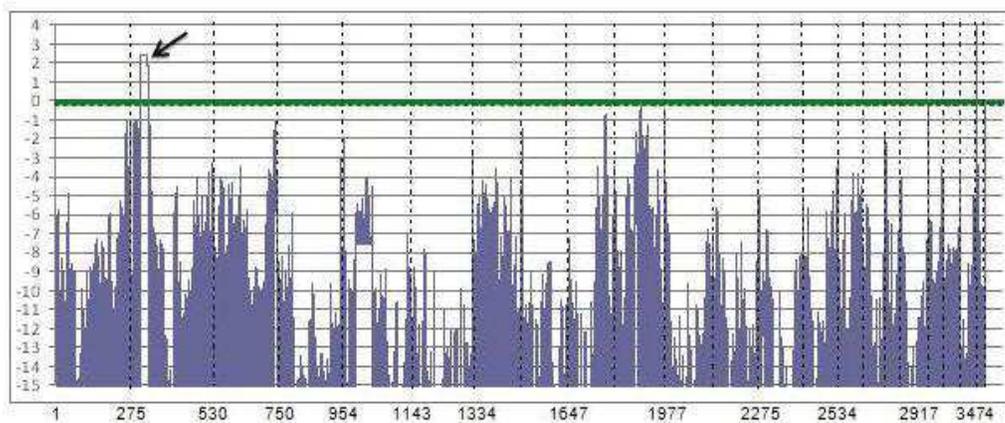


Figura 6. Representação da distribuição dos SNPs na família 2. Os marcadores com *lod scores* maiores que 2,0 estão indicados pela.

Esta região corresponde ao cromossomo 2p23.3, cuja análise encontrou quatro SNPs - rs2384511, rs722911, rs724311 e rs2078616 com valores de *lod scores* de 2,04, 2,07, 2,07 e 2,34; respectivamente. Já na região 2p23.1 e 2p22.3 foram encontrados 32 SNPs com valores de *lod scores* de 2,4 (Tabela 10). E por fim, um SNP - rs2373001 na região 2p22.2 apresentou valor de *lod score* de 2,14.

Tabela 10. Lista de SNPs encontrados no cromossomo 2 com seu respectivo *lod score* e localização.

<i>SNP</i>	<i>Localização</i>	<i>Lod score</i>
rs718152	2p23.1	2,4
rs718153	2p23.1	2,4
rs1074066	2p23.1	2,4
rs499476	2p23.1	2,4
rs2364445	2p23.1	2,4
rs1862975	2p23.1	2,4
rs2365842	2p23.1	2,4
rs206847	2p23.1	2,4
rs2365778	2p23.1	2,4
rs2208532	2p23.1	2,4
rs219085	2p22.3	2,4
rs723042	2p22.3	2,4
rs723043	2p22.3	2,4
rs602622	2p22.3	2,4
rs2197804	2p22.3	2,4
rs1961268	2p22.3	2,4
rs722289	2p22.3	2,4
rs918328	2p22.3	2,4

rs2371923	2p22.3	2,4
rs3845765	2p22.3	2,4
rs3910275	2p22.3	2,4
rs3910275	2p22.3	2,4
rs1583365	2p22.3	2,4
rs892457	2p22.3	2,4
rs1371427	2p22.3	2,4
rs1371426	2p22.3	2,4
rs1401221	2p22.3	2,4
rs1401223	2p22.3	2,4
rs1401224	2p22.3	2,4
rs965332	2p22.3	2,4
rs1018328	2p22.3	2,4
rs833764	2p22.3	2,4
rs1510726	2p22.3	2,4
rs2078220	2p22.3	2,4
rs717806	2p22.3	2,4

DISCUSSÃO

7. Discussão

A identificação de genes envolvidos em doenças humanas tem importante papel na compreensão da fisiopatologia da doença, assim como no desenvolvimento de novos testes para o diagnóstico e terapias. Isto foi incrementado por meio da descoberta de marcadores genéticos que permitiu uma evolução nos estudos visando a identificação de genes.

A análise de ligação é um método que permite a utilização de marcadores genéticos para a localização de genes responsáveis por doenças. Esta análise é mais eficiente na detecção de genes que apresentem uma participação maior na instalação da doença (Carson et al, 2004). Esta estratégia auxilia na identificação de *loci* em famílias com vários indivíduos afetados que sugiram padrão monogênico de herança. Entretanto, a análise de ligação é limitante quando é aplicada a genes de efeitos menores ou quando o número de famílias não é suficiente para estabelecer ligação (Carson et al, 2004).

Estudos envolvendo famílias com GPAA em grupos populacionais diferentes, além de estabelecer as características genéticas desta mesma população, podem auxiliar na identificação de novos genes relacionados ao desenvolvimento do glaucoma.

Os marcadores microssatélites são repetições em *tandem* os quais se mostraram extremamente úteis como marcadores moleculares para o mapeamento genético, principalmente por dois fatores: o primeiro é a abundância destes distribuídos pelo genoma e o segundo é o seu alto grau de polimorfismo. O polimorfismo desses marcadores baseia-se na variação do número dos elementos repetidos, provavelmente originados a partir de erros da DNA polimerase durante o processo de replicação e reparo da molécula de DNA. A análise de ligação é um método de triagem para localizar genes responsáveis por desordens genéticas e tem contribuído para a identificação de genes relacionados com doenças humanas. Por este método, é possível confirmar ou excluir ligação genética entre marcadores selecionados e o *locus* da doença; além de serem úteis na investigação de *loci* candidatos (Thompson 2001).

No presente estudo, foi utilizado o cálculo de *lod Scores* de dois pontos para 10 marcadores microssatélites da família 1 e os mesmos 10 para a família 2. Nas duas famílias não observou-se ligação entre os marcadores e o GPAA; ou seja, nenhum *lod score* positivo acima ou igual a 3,00 foi obtido para qualquer marcador genotipado.

Na família 1 os valores de *lod score* variaram de -0,81 até -6,51 na frequência $\theta = 0.00$. Os *loci* *GLCIA*, *GLCIJ*, *GLCIK* e *GLCIM* foram excluídos por apresentarem valores

de *lod scores* menores que -2,00. Os *loci GLCIL* e *GLCIN* não puderam ser totalmente excluídos, pois dois marcadores apresentaram valores de *lod scores* na zona não significativa (-2,00 e 3,00), apesar de que outros microssatélites avaliados nestas regiões apresentaram valores abaixo de -2,00, sugerindo uma não ligação destes dois *loci* com a doença. O *locus GLCIA* apresentou exclusão até a frequência de recombinação 0,05. Os *loci GLCIJ* e *GLCIM* mantiveram a exclusão até a frequência de recombinação de 0,1.

Na família 2 os valores de *lod scores* variaram entre -0,03 e -3.67 na frequência $\theta = 0.00$. Nesta frequência foi excluído apenas o *locus GLCIL* considerando os três marcadores avaliados: D3S2338, D3S1285 e D3S1289. Já os *loci GLCIA*, *GLCIJ*, *GLCIK*, *GLCIM* e *GLCIN* ficaram na zona não significativa (*lod scores* entre -2,00 e 3,00).

Comparando-se as duas famílias houve diferença no padrão de exclusão. Na família 2, por exemplo, foi excluído apenas o *locus GLCIL*, enquanto na família 1 este mesmo *locus* não pode ser excluído devido o marcador D3S2338 apresentar valor de *lod score* -0,95. A exclusão dos *loci GLCIA*, *GLCIJ*, *GLCIK* e *GLCIM* foi somente observada na família 1. Em ambas as famílias observaram-se a não exclusão definitiva do *locus GLCIN* (*lod score* entre -2,00 e 3,00). A discordância nos valores de *lod scores* entre as duas famílias pode ser justificada pelo diferente perfil clínico do glaucoma. Na família 1 o glaucoma se manifesta mais tardiamente, a partir da quinta década de vida com PIOs entre 20 e 36mmHg. Enquanto na família 2 o glaucoma desenvolve-se mais precocemente com PIOs entre 21 e 38mmHg.

Comparando-se os resultados dos *loci* candidatos acima (*GLCIA*, *GLCIJ*, *GLCIK*, *GLCIL*, *GLCIM* e *GLCIN*) com dados já descritos na literatura, pode-se observar semelhanças entre as famílias 1 e 2 em relação às características clínicas com as famílias avaliadas nos estudos originais que identificaram estes mesmo *loci* associados ao GPAA (Wiggs et al., 2004, Sud et AL., 2008, Baird et al., 2005, Pang et al., 2006, Wang ET AL 2006).

Apesar dos *loci GLCIA*, *GLCIJ* e *GLCIK* apresentarem apenas um marcador, estes foram excluídos na família 1 e inconclusivos na família 2 em relação a ligação e não-ligação. A família 2 assim como as famílias relatadas nos estudos iniciais ligadas aos *loci GLCIA*, *GLCIJ* e *GLCIK* eram portadoras de GPAA-J; e ao contrário, a família 1 cujos *loci* candidatos foram excluídos, eram portadores de GPAA-A.

Como citado anteriormente, na família 1 o *locus GLCIL* não pode ser excluído devido o marcador D3S2338 apresentar valor de *lod score* na região intermediária (*lod score* = -0,95); dado contrário ao ocorrido na família 2 o qual teve o *locus GLCIL* excluído devido os marcadores apresentarem valores de *lod score* menores que -2.00. O *locus GLCIL* está associado com famílias apresentando GPAA com PIOs médias de 23.9mmHg e

desenvolvimento da doença a partir da sexta década de vida (Baird et al, 2005 e Sherwin et al., 2009). Essas características clínicas são semelhantes às apresentadas na família 1 e discordantes em relação a idade de desenvolvimento e valores de PIOs observadas na família 2.

O *locus GLCIM* foi descrito por Pang et al. (2006) em um estudo no qual o objetivo era mapear o *locus* associado à doença em uma família com GPAA-J. A família descrita era proveniente das Filipinas, composta por 5 gerações, incluindo 22 indivíduos afetados. Esses indivíduos apresentaram idade de diagnóstico variando entre 12 e 33 anos e PIO com valores de 24 a 44 mmHg. O valor máximo de *lod score* foi 4.82 na frequência $\theta = 0.00$, resultado oposto ao observado na família 1 para *lod scores* menores do que -2,00 até a frequência $\theta = 0.10$. Porém as características clínicas da família da Filipinas se assemelham às características clínicas da família 2 (GPAA-J e valores de PIO) , cujo marcador D5S2115 apresentou valores de *lod score* -0.03, inconclusivo na frequência $\theta = 0.00$.

O *locus GLCIN* foi descrito por Wang et al. (2006) em uma família chinesa com 25 membros, no qual oito eram portadores de GPAA-J. O resultado da análise dos haplótipos por meio da utilização de microssatélites e SNPs permitiu o mapeamento do *locus* no cromossomo 15 (15q22 – q24). A extensão de 16.6Mb desta região era delimitada pelos marcadores D15S1036 e rs922693. O valor máximo de *lod score* encontrado foi de 3.31 na frequência $\theta = 0.00$. Os resultados encontrados nas famílias 1 e 2 não foram significativos, porém não se pode excluir ligação ou não ligação devido ao fato dos marcadores estarem na região não conclusiva.

Na análise por meio de SNPs *array* 10k, a família 1 apresentou três regiões cromossômicas (cromossomo 1, 5 e 14) com valores de *lod scores* maiores que 1,7 (figura 7), as outras regiões foram excluídas por confirmarem regiões não ligadas com o GPAA, pois apresentaram resultados menores que -2,00 variando até -13,00.

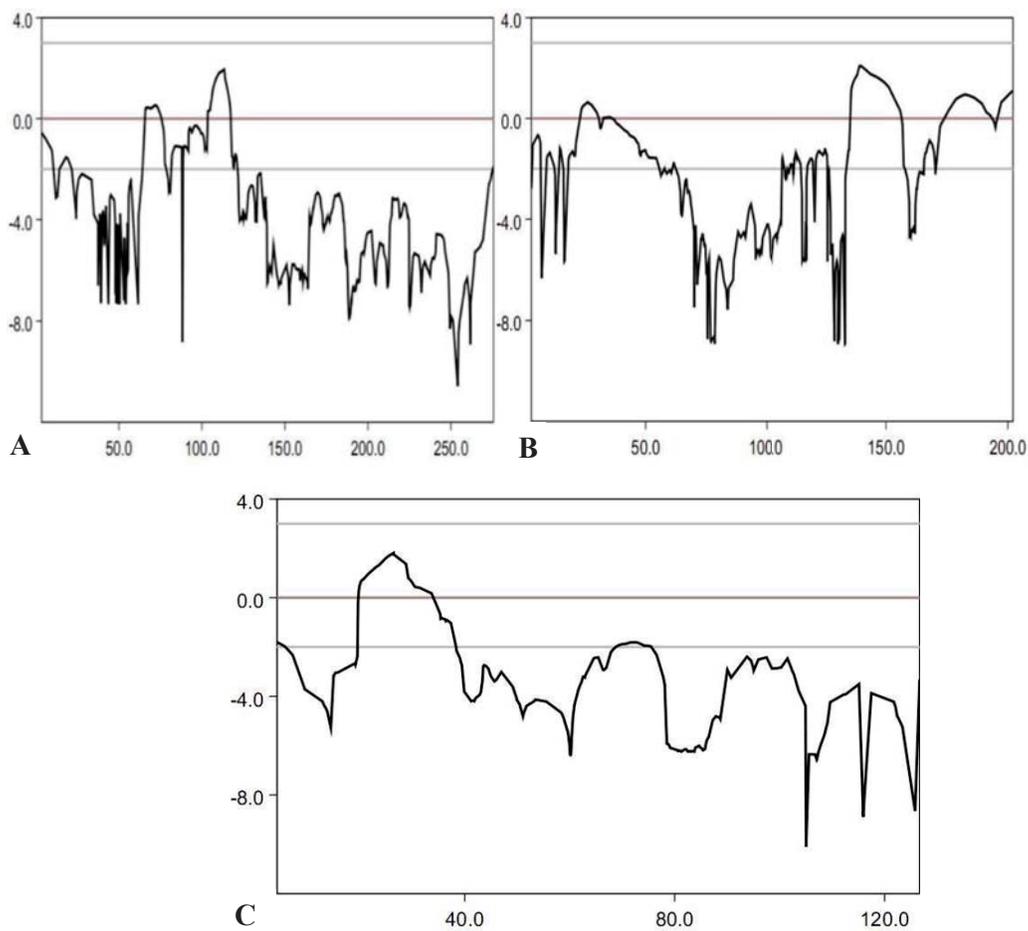


Figura 7. Representação da distribuição dos SNPs com valores de *lod score* maiores que 1,7 na família 1 nos cromossomos 1 (A), 5 (B) e 14 (C) .

Para as três regiões com valores de *lod score* acima de 1,7, foram analisados genes candidatos que pudessem estar relacionado com o GPAA. Para que pudessem ser considerados candidatos, estes genes deveriam se enquadrar a um dos seguintes critérios: ser expresso nos tecidos oculares, envolvido na regulação da PIO, afetando a viabilidade das células ganglionares, associado com outras afecções oculares. Incluindo outras doenças neurodegenerativas e localizado em *loci* já relatado.

Seguindo os critérios acima, apenas os genes dentro da região 5q31 (cromossomo 5) poderiam apresentar-se como candidatos para o GPAA. Estes são: *Sparc/Osteonectin*, *cwcv and kazal-like Domains Proteoglycan/Secreted Protein, Acid and Rich in Cysteine (SPOCK1/SPARC)*, *Kelch-like 1 (KLHL3)*, *Catenin (cadherin-associated protein)*, *Alpha 1 (CTNNA1)*, *Endoplasmic reticulum chaperone (SIL1)*, *Neuregulin 2 (NRG2)*, *Chromosome 5 Open Reading Frame 32 (C5orf32)*, *Protocadherin Alpha 1 (PCDHA1)* and *PCDHGB4*.

O gene *SILI* atua como um fator de troca de nucleotídeo para a chaperona Hsp70 Bip, no qual é um regulador chave das principais funções do retículo endoplasmático, participando da degradação e resposta a proteína não dobrada. Mutações neste gene estão associadas com a Síndrome de Marinesco-Sjögren, doença neurodegenerativa que leva a disfunção do retículo endoplasmático. O papel sugerido para esta organela são desordens multisistêmicas, incluindo catarata (Senderek et al. 2005; Riazuddin et al. 2009). Entre os genes candidatos existem duas protocaderinas, *PCDHAI* (Protocaderina alfa 1) e *PCDHGB4* (subfamília protocaderina gama). As protocaderinas são predominantemente expressas no sistema nervoso e constituem a maior das subfamílias caderinas (Giagtzoglou et al. 2009) e muitos destes genes são encontrados em 3 grupos (Pcdh- α , Pcdh- β , and Pcdh- γ) localizados no cromossomo 5q31. O gene *PCDHAI* faz parte da cadeia Pcdh- α , e o gene *PCDHGB4* faz parte da cadeia Pcdh- β , ambas codificam a *neural cadherin-like cell adhesion protein* que provavelmente desempenha um papel crítico no estabelecimento e função de específicas conexões célula-célula no cérebro. Em geral, caderinas atuam como proteínas que contribuem para a adesão celular, são essenciais em vários processos, incluindo a morfogênese e a manutenção da integridade dos tecidos, mutações em genes correspondentes podem ser responsáveis por várias doenças humanas, incluindo algumas síndromes que também podem afetar os olhos (El-Amraoui, A. and Petit, C., 2010). O gene *CTNNA1* codifica uma proteína associada à caderina que interage, intracelularmente e indiretamente, com o citoesqueleto de base actina (*actin-based cytoskeleton*). O gene *NRG2* é um membro da família da neuregulinas, associado com fatores de crescimento e diferenciação e, relacionado com o fator de crescimento epidérmico. Além disso, regula a proliferação e diferenciação das células de Schwann, que são células formadoras de mielina no sistema nervoso periférico. Um estudo realizado por Fan e colaboradores (2007) avaliou uma família da Filipinas com GPAA-J e considerou o gene *NRG2* um excelente candidato para o glaucoma no *locus GLCIM*. Porém, após o sequenciamento de exons e regiões de Splice do gene, este foi excluído como gene causal do GPAA-J nesta família.

Outro potencial gene candidato na região 5q31 é o *SPOCK1/SPARC*. Este gene está distribuído em vários tipos celulares e tecidos, incluindo o ocular, especialmente na malha trabecular e na região justacanalicular. O *SPOCK* é uma glicoproteína matricelular que funciona principalmente em promover a deposição de matriz extracelular (Chen et al., 2010), e está localizado no *locus GLCIM*. É um dos genes mais regulados positivamente em células porcinas da malha trabecular, em resposta ao alongamento mecânico. Um estudo realizado por Chen e colaboradores (2010), avaliou por meio de mutações e variações no número de cópias, o gene *SPARC* como candidato para GPAA-J em uma família da

Filipinas. Entretanto, não foi encontrado nenhuma mutação ou variação no número de cópias em indivíduos afetados e não-afetados na *locus GLCIM* da respectiva família. Embora, por si só o *SPARC* seja gene potencial para o glaucoma, ele pode não ser o responsável pelo GPAA-J nesta família.

Outro estudo realizado por Arouca-Aguilar e colaboradores (2011) analisou a interação da miocilina com a proteína *SPARC*. Os autores observaram que essa interação ocorre através dos seus respectivos domínios C-terminais, além disso, dados sugerem que a clivagem específica da miocilina pode modular suas interações com outras proteínas extracelulares, além do *SPARC*. Finalmente, o aumento da expressão do *SPARC* foi observado na lâmina cribosa de olhos glaucomatosos, bem como na íris de pacientes com glaucoma primário de ângulo fechado (Kang et al., 2011). Embora o *SPARC* não fosse o causador da doença na família da Filipinas, o seu padrão de expressão no olho e sua função torna um gene candidato para o GPAA na família brasileira.

Através de estudo de ligação, o mesmo método utilizado no trabalho, Crooks et al. (2011) evidenciou ligação no cromossomo 1, porém no braço longo - região q22-23 com valor de *lod score* = 2,03 para o marcador rs876537. Lee et al. (2010), através de marcadores do tipo microssatélites, evidenciou sugestiva ligação na região 5q22.1 com valor de *lod score* de 2,4, mesma região que abriga o gene *WDR36* e próxima a região encontrada neste estudo – 5q31, cujo valores de *lod scores* chegaram a 2,08.

Por fim, foi realizado o refinamento no cromossomo 5 devido os SNPs apresentarem valores de *lod score* próximos a 2,1; valores maiores que os SNPs do cromossomos 1 e 14. Para o refinamento foram utilizados marcadores do tipo microssatélites os quais se situam entre as regiões 5q31.2 e 5q31.3 compreendendo um total de 4kb e estão distantes uns dos outros em 2cM. O refinamento, entretanto, foi útil para excluir estas regiões, pois apresentaram valores de *lod scores* menores que -2,00 na frequência = 0.00; assim foi possível sugerir que esta região não está associada com o GPAA

Utilizando-se a mesma técnica de *SNP array* para a família 2, foi encontrada uma região cromossômica (cromossomo 2) apresentando valores de *lod scores* maiores que 2,0 (gráfico 3). Nenhuma outra região sugestiva de ligação foi detectada, pois apresentaram valores de *lod score* variando entre -2,00 e -15,00 (figura 8).

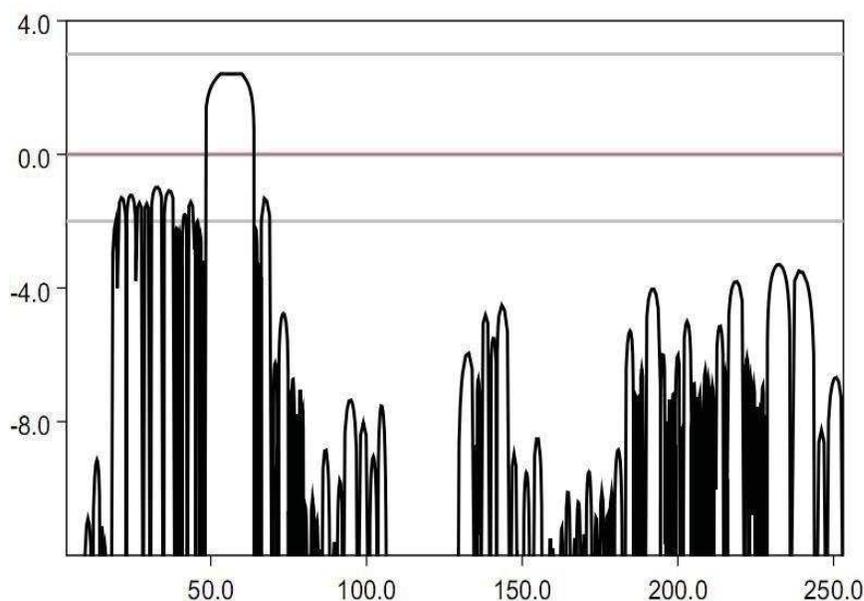


Figura 8 . Representação da distribuição dos SNPs com valores de *lod score* maiores que 2,0 na família 2 nos cromossomos 2.

Essa região, cujo valor de *lod score* foi de 2,4, corresponde ao cromossomo 2p22-23 e abrange 32 SNPs, a partir do rs718152 até o rs717806, incluindo os seguintes genes candidatos: *Calcium-activated neutral proteinase 13 (CAPN13)*, *UDP – N- acetyl-alpha-D- galactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 14 (GALNT14)*, *Xanthine dehydrogenase (XDH)*, *Steroid-5-alpha-reductase, Alpha polypeptide 2 (SRD5A2)*, and *Latent transforming growth factor beta binding protein 1 (LTBP1)*.

O gene *CAPN13* codifica uma proteína que pertence a família de calpaínas, alguns dos quais tem sido mostrados para funcionar como proteases dependentes de cálcio cisteína. O *CAPN13* está envolvido em doenças neurodegenerativas como a esclerose múltipla, que pode levar a neurite óptica (inflamação do nervo óptico), e desencadear um processo apoptótico (Guyton *et al.*, 2005; Dear *et al.*, 2000). O gene *GALNT14* pode influenciar a ação apoptótica do *IGFBP-3* (Insuline-Like Growth Factor Binding Protein-3) e pode mediar a sua via de sinalização (Flachsbart *et al.*, 2010). O gene *SRD5A2* desempenha um papel crucial na via do metabolismo androgênico na próstata humana. Ele codifica a enzima *SRD5A2*, que catalisa a testosterona em di-hidrotestosterona (DHT). A DHT é a estrutura principal de ligação com o receptor de andrógeno (RA). Importante relatar um caso em uma mutação no RA de um recém-nascido de origem étnica egípcio com insensibilidade androgênica completa foi associado com glaucoma congênito. Um histórico detalhado da família paterna mostrou nove membros com diagnóstico de glaucoma antes dos 40 anos de idade (Gad *et al.*, 2003).

Na análise do locus 2p22-3, o mais importante gene candidato é o gene *LTBP1*. O fator transformador de crescimento β (TGF β s) são citocinas que atuam como fatores multifuncionais com importantes funções reguladoras do sistema adulto e embrionário. (Azhar ET AL., 2009; Fuchshofer et al. 2009). Elas são transportadas como moléculas precursoras latentes, covalentemente ligadas à proteína TGF- β latente de ligação (LTBP), que são componentes da matriz extracelular. As LTBPs têm como função o armazenamento de citocinas bem como a ativação de TGF β s (Fuchshofer et al. 2001; Lorda-Diez et al., 2010). A sinalização da TGF- β 2 parece estar envolvida em mecanismos que levam a alterações funcionais e estruturais das vias de escoamento da malha trabecular, o que podem contribuir para o aumento da PIO (Tamm and Fuchshofer, 2007; Fuchshofer et al. 2009; Fuchshofer, R. and Tamm, E. R.; 2012). Além disso, têm sido observados níveis mais elevados de TGF- β 2 no humor aquoso de pacientes com GPAA (Tripathi et al., 1994; Fuhshofer et al. 2009). Fuhshofer e colaboradores (2009) relataram através de *microarray* o perfil de expressão gênica de células da malha trabecular tratadas com TGF β 2- e/ou BMP7(bone morphogenetic protein), eles puderam observar que o *LTBP1* estava aumentado após exposição ao TGF β e TGF β 2- e BMP7. Em outro estudo, a *LTBP-1* estava aumentada na malha trabecular humana após o tratamento com TGF- β 2 (Fleenor et al., 2006). Outros estudos indicaram que o gene *LTBP1* pode agir como proteína matriz extracelular (Schlötzer-Schrehardt et al., 2001; Isogai et al., 2003; Hirani et al., 2007). No olho humano, a *LTBP1* também tem sido localizada em fibrilas de matriz extracelular no segmento anterior do olho, incluindo a malha trabecular e o esporão escleral (Fuchshofer et al. 2009; Fuchshofer et al., 2001). Estes achados sugerem que o gene *LTBP1* pode ser o primeiro gene candidato para o GPAA a ser sequenciado nesta família a fim de procurar mutações segregando com a doença.

Mesmo que o estudo não tenha revelado regiões cromossômicas com valores de *lod scores* acima de 3,00, os dados encontrados podem sugerir ligação no cromossomo 5 e na família 1 e no cromossomo 2 na família 2, devido seus valores de *lod scores* maiores que 2,0. Através destes achados identificaram-se possíveis genes candidatos para o GPAA, já que estes podem exercer alguma função biológica na fisiopatologia da doença.

Os resultados obtidos até o momento em relação aos marcadores microssatélites e *SNPs* apontam para a heterogeneidade genética, ou seja, outros genes e fatores ambientais podem estar envolvidos no desenvolvimento do GPAA.

Embora, a procura seja por *lod scores* positivos, as exclusões têm seu valor, elas nos informam onde a doença não está; isso pode eliminar um possível gene candidato, e se, uma

quantidade suficiente do genoma for excluída, restringir o número de locais possíveis (Strachan, 2002).

Os maiores problemas associados com estudos genéticos de doenças complexas são: penetrância incompleta (presença do alelo que predispõem a doença, mas sem manifestação clínica), fenocópias (manifestação da doença como resultado de fatores ambientais, sem a presença de alelos que predispõem a doença), heterogeneidade genética (mutações em genes diferentes resultado em um mesmo fenótipo), herança poligênica (para a manifestação da doença necessita-se da presença de mutações em múltiplos genes) ou multifatorial (fatores genéticos e ambientais influenciando a manifestação clínica doença) e a alta prevalência na população geral (Lander & Schork, 1994; Serratos, 1999).

A pesquisa contínua em busca de novos genes poderá levar a um melhor entendimento das bases genéticas do glaucoma contribuindo para a compreensão de sua fisiopatologia e auxiliar na concretização de potenciais aplicações clínicas para novas estratégias terapêuticas no glaucoma

CONCLUSÕES

8. Conclusões

1. Por meio da análise de ligação com marcadores do tipo microssatélites não foi possível estabelecer ligação do GPAA, nas duas famílias avaliadas, com os *loci* *GLCIA*, *GLCIJ* - *GLCIN*.
2. A análise de ligação por meio de lâminas de SNPs sugere possíveis regiões candidatas associadas ao GPAA (*lod score* maior do que 2) nos cromossomos 5q31.2 - 31.3 e 2p22.3 - 23.1.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências:

Abecasis GR, Cherny SS, Cookson WO, Cardon LR. Merlin-rapid analysis of dense genetic maps using sparse gene flow threes. *Nat Genet* 2002; 30:97-101.

Allingham RR, Wiggs J L, De La Paz MA, Vollrath D, Tallett D A, Broome B *et al.* Gln368STOP myocilin mutation in families with late-onset primary open-angle glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39:2288-95.

Allingham RR, Wiggs JL, Hauser ER, Larocque-Abramson KR, Santiago-Turla C, Broome B *et al.* Early adult-onset POAG linked to 15q11-13 using ordered subset analysis. *Invest Ophthalmol* 2005;46:2002-5.

Almeida LN, Carolino RM, Sperandio DC, Nehemy MB, De Marco LA. The role of molecular genetic factors in age-related macular degeneration. *Arg Bras Oftalmol* 2009; 72:567-72.

Alward WLM, Fingert JH, Coote MA, Johnson AT, Lerner SF, Jungua D *et al.* Clinical features associated with mutations in the chromosome 1 open-angle glaucoma gene (GLC1A). *N Engl J Med* 1998; 338:1022-102.

Aroca-Aguilar JD, Sánchez-Sánchez F, Ghosh S, Fernández-Navarro A, Coca-Prados M, Escribano J. Interaction of recombinant myocilin with the matricellular protein SPARC: functional implications. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52:179-89.

Aroca-Aguilar JD, Sánchez-Sánchez F, Martínez-Redondo F, Coca-Prados M, Escribano J. Heterozygous expression of myocilin glaucoma mutants increases secretion of the mutant forms and reduces extracellular processed myocilin. *Mol Vis* 2008; 14:2097-108.

Ayala-Lugo RM, Pawar H, Reed DM, Lichter P R, Moroi SE, Page M *et al.* Variation in optineurin (OPTN) allele frequencies between and within populations. **Mol Vis** 2007; 13:151-63.

Azhar M, Yin M, Bommireddy R, Duffy JJ, Yang J, Pawlowski SA *et al.* Generation of mice with a conditional allele for transforming growth factor beta 1 gene. *Genesis* 2009; 49:423-31.

Baird PN, Foote S J, Mackey D A, Craig J, Speed T P, Bureau A. Evidence for a novel glaucoma locus at chromosome 3p21-22. *Hum Genet* 2005; 117:249-57.

Burgoyne CF, Downs JC, Bellezza AJ, Suh JK, Hart RT. The optic nerve head as a biomechanical structure: a new paradigm for understanding the role of IOP-related stress and strain in the pathophysiology of glaucomatous optic nerve head damage. *Prog Retin Eye Res.* 2005; 24:39-73.

Caixeta-Umbelino C, de Vasconcellos JP, Costa VP, Kasahara N, Della Paolera M, de Almeida GV *et al.* Lack association between optineurin gene variants T34T, E50K, M96K, 6921_692insAG and R545Q and a primary open angle glaucoma in Brazilian patients. *Ophthalmic Genet* 2009; 30:13-8

Carbone MA, Chen Y, Hughes GA, Weinreb RN, Zabriskie NA, Zhang K, Anholt RR. Genes of the unfolded protein response pathway harbor risk alleles for primary open angle glaucoma. *Plos One.* 2011; 6:e20649.

Carlson CS, Eberle MA, Kruglyak L. Mapping complex disease loci in whole genome association studies. *Nature* 2001; 429:446-52

Chen L, Tam PO, Tham CC, Liang XY, Chiang SW, Canlas O *et al.* Evaluation of SPARC as a candidate gene of juvenile-onset-primary-open-angle glaucoma by mutation and copy number analyses. *Mol Vis* 2010; 16:2016-25.

Clark, AF, Kawase K, English-Wright S, Lane D, Steely HT, Yamamoto T *et al.* Expression of the glaucoma gene myocilin (MYOC) in the human optic nerve head. *FASEB J* 2001; 15:1251-3.

Crooks KR, Allingham RR, Quin X, Liu Y, Gibson JR, Santiago-Turla C *et al.* Genome-wide linkage scan for primary open angle glaucoma: influences of ancestry and age at diagnosis. *Plos One* 2011; 6:e21967.

Dear TN, Meier NT, Hunn M, Boehm T. Gene structure, chromosomal localization,

and expression pattern of Capn12, a new member of the calpain large subunit gene family. *Genomics* 2000; 68:152-60.

El-Amraoui A, Petit C. Cadherins as targets for genetic diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; 2:a003095.

Fan BJ, Ko WC, Wang DY, Canlas O, Ritch R, Lam DS et al. Fine mapping of new glaucoma locus GLC1M and exclusion of neuregulin 2 as the causative gene. *Mol Vis* 2007; 13:779-84.

Fan BJ, Wiggs JL. Glaucoma: genes, phenotypes, and new directions for therapy. *J Clin Invest* 2010; 120:3064-72.

Fan B J, Wang D Y, Cheng C Y, Ko W C, Lam S C, Pang C P. Different WDR36 mutation pattern in Chinese patients with primary open-angle glaucoma. *Mol Vis* 2009; 15:646-53.

Fan BJ, Liu K, Wang DY, Tham CC, Tam PO, Lam DS *et al.* Association of polymorphisms of tumor necrosis factor and tumor protein p53 with primary open-angle glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51:41106

Fingert JH, Robin AL, Stone JL, Roos BR, Davis LK, Scheetz TE et al. Copy number variations on chromosome 12q14 in patients with normal tension glaucoma. *Hum Mol Genet* 2011, 15:20:2482-94.

Fingert JH, Alward WL, Kwon YH, Shankar SP, Andorf JL, Mackey DA *et al.* No association between variations in the WDR36 gene and primary open-angle glaucoma. *Arch. Ophthalmol* 2007; 125, 434–436.

Fingert JH, Héon E, Liebmann JM, Yamamoto T, Craig JE, Rait J et al. - Analysis of myocin mutations in 1703 glaucoma patients from five different populations. *Hum Mol Genet* 1999; 8:899-905.

Foster PJ, Buhrmann R, Quigley H.A.; Johnson GJ. The definition and classification of glaucoma in prevalence surveys. *Br. J. Ophthalmol* 2002; 86:238-242.

Fuse N. Genetic basis for glaucoma. *J Exp Med* 2010; 221:1-10.

Fuchshofer R, Tamm ER. The role of TGF- β in the pathogenesis of primary open-angle glaucoma. *Cell Tissue Res* 2012; 347:279-90.

Fuchshofer R, Stephan DA, Russell P, Tamm ER. Gene expression profiling of TGF β 2- and/or BMP7-treated trabecular meshwork cells: Identification of Smad7 as a critical inhibitor of TGF- β 2 signaling. *Exp Eye Res* 2009; 88:1020-32.

Flachsbart F, Franke A, Kleindorp R, Caliebe A, Blanché H, Schreiber S *et al.* Investigation of genetic susceptibility factors for human longevity - a targeted nonsynonymous SNP study. *Mutat Res* 2010; 694:13-9.

Fleenor DL, Shepard AR, Hellberg PE, Jacobson N, Pang IH, Clark AF. TGF β 2-induced changes in human trabecular meshwork: implications for intraocular pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47:226-34.

Gad YZ, Mazen I, Lumbroso S, Temtamy SA, Sultan C. A novel point mutation of the androgen receptor (F804L) in an Egyptian newborn with complete androgen insensitivity associated with congenital glaucoma and hypertrophic pyloric stenosis. *Clin Genet* 2003; 63:59-63.

Giagtzoglou N, Ly CV, Bellen HJ. Cell adhesion, the backbone of the synapse: vertebrate perspectives. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009; 1:a003079.

Guyton MK, Sribnik EA, Ray SK, Banik EL. A role for calpain in optic neuritis. *Ann NY Acad Sci* 2005; 1053:48-54.

Hauser MA, Allingham RR, Linkroum K, Wang J, LaRocque- Abramson K, Figueiredo D. *et al.* Distribution of WDR36 DNA sequence variants in patients with primary open-angle glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47, 2542–2546.

Hewitt A, Samples J, Allingham R, Jarvela I, Kitsos G, Krishnadas SR *et al.* Investigation of founder effects for the Thr377Met Myocilin mutation in glaucoma families from differing ethnic backgrounds. *Mol Vis* 2007; 13:487– 492.

Hewitt AW, Mackey DA, Craig JE. Myocilin allele-specific glaucoma phenotype database. *Hum Mutat.* 2008; 29:207-11.

Hirani R, Hanssen E, Gibson MA. LTBP-2 specifically interacts with the amino terminal region of fibrillin-1 and competes with LTBP-1 for binding to this microfibrillar protein. *Matrix Biol* 2007; 26:213-23.

Hogewind, BF, Gaplovska-Kysela K, Theelen T, Cremers FP, Yam GH, Hoyng CB. Identification and functional characterization of a novel MYOC mutation in two primary open angle glaucoma families from The Netherlands. *Mol Vis* 2007; 27;13:1793-801.

Isogai Z, Ono RN, Ushiro S, Keene DR, Chen Y, Mazzieri R *et al.* Latente transforming growth factor beta-binding protein 1 interacts with fibrillin and is a microfibril-associated protein. *J Biol Chem* 2003; 278:2750-7.

Jia LY, Tam PO, Chiang SW, Ding N, Chen LJ, Yam GH, *et al.* Multiple gene polymorphism analysis revealed a different profile of genetic polymorphisms of primary open-angle glaucoma in northern Chinese. *Mol. Vis.* 2009; 15:89-98.

Kang MH, Oh DJ, Rhee DJ. Effect of hevin deletion in mice and characterization in trabecular meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52:2187-93.

Kitsos G, Eiberg H, Economou-Peterson E, Wirtz MK, Kramer PL, Aspiotis M *et al.* Genetic linkage of autosomal primary open angle glaucoma to chromosome 3q in a greek pedigree. *Eur J Hum Genet* 2001; 9:452-457.

Kroese M, Burton H. Primary open angle glaucoma. The need for a consensus case definition. *J Epidemiol Community Health* 2003; 57(9):752-4.

Kruglyak L, Daly MJ, Reeve-Daly MP, Lander ES. Parametric and nonparametric linkage analysis: a unified multipoint approach. *Am J Hum Genet* 1996; 58:1357-63.

Lander ES, Schork NJ. Genetic Dissection of complex trait. *Science*; 265:2037-48.

Lee MK, Woo SJ, Kim JI, Cho SI, Kim H, Sung J et al. Replication of a glaucoma candidate gene on 5q22.1 for intraocular pressure in Mongolian populations: the GENDISCAN Project. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51:1335-40.

Leske MC. Ocular perfusion pressure and glaucoma: clinical trial and epidemiologic findings. *Curr Opin Ophthalmol* 2009; 20:73-8.

Leske MC, Wu SY, Hennis A, Honkanen R, Nemesure B, BESs Study Group. Risk factors for incident open-angle glaucoma: the Barbados Eye Studies. *Ophthalmology* 2008; 115:85-93.

Leske MC. Open-angle glaucoma *Ophthalmic Epidemiol* 2007; 14:166-72

Leske, MC. The epidemiology of open-angle glaucoma: a review. *Am J Epidemiol* 1983; 118:166-91

Liu Y, Akafo S, Santiago-Turla C, Cohen CS, Larocque-Abramson KR, Qin X et al. Optineurin coding variants in Ghanaian patients with primary open-angle glaucoma. *Mol Vis* 2008; 14:2367-72.

Liu Y, Liu W, Crooks K, Schmidt S, Allingham RR, Hauser MA. No evidence of association of heterozygous NTF4 mutations in patients with primary open-angle glaucoma. *Am J Hum Genet* 2010;86:498-9.

Lorda-Diez CI, Montero JA, Garcia-Porrero JA, Hurlé JM. TGF-beta2 and 3 are coexpressed with their extracellular regulator Ltbp1 in the early limb bud and modulate mesodermal outgrowth and BMP signaling in chicken embryos. *BMC Dev Biol* 2010; 10-69.

McKusick V. A. Human genetics: the last 35 years, the present, and the future. *Am J Hum Genet* 1992; 50(4):663-70.

Melki R, Belmouden A, Brézin A, Garchon HJ. Myocilin analysis by DHPLC in French POAG patients: increased prevalence of Q368X mutation. *Hum Mutat* 2003; 22(2):179.

Miyazawa A, Fuse N, Mengkegale M, Ryu M, Seimiya M, Wada Y *et al.* Association between primary open-angle glaucoma and WDR36 DNA sequence variants in Japanese. *Mol.Vis* 2007; 13,1912–1919.

Monemi S, Spaeth G, DaSilva A, Popinchalk S, Ilitchev E, Liebmann J *et al.* Identification of a novel adult-onset primary open-angle glaucoma (POAG) gene on 5q22.1. *Hum Mol Genet* 2005; 15;14:725-33.

Murakami K, Meguro A, Ota M, Shiota T, Nomura N, Kashiwagi K *et al.* Analysis of microsatellite polymorphisms within the GLC1F locus in Japanese patients with normal tension glaucoma. *Mol Vis* 2010; 16:462-6.

Pang, CP, Fan BJ, Canlas O, Wang DY, Dubois S, Tam PO *et al.* A genome-wide scan maps a novel juvenile-onset primary open angle glaucoma locus to chromosome 5q. *Mol Vis* 2006; 12:85-92.

Pasutto F, Mardin CY, Michels-Rautenstrauss K, Weber BH, Sticht H, Chavarria-Soley G *et al.* Profiling of WDR36 missense variants in German patients with glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008; 49:270-4.

Pasutto F, Matsumoto T, Mardin CY, Sticht H, Brandstätter JH, Michels- Rautenstrauss K *et al.* Heterozygous NTF4 mutations impairing neurotrophin-4 signaling in patients with primary open-angle glaucoma. *Am J Hum Genet* 2009; 85:447-56.

Polansky JR, Fauss DJ, Chen P, Chen H, Lutjen-Drecoll E, Johnson D *et al.* Cellular pharmacology and molecular biology of the trabecular meshwork inducible glucocorticoid response gene product. *Ophthalmologica* 1997; 211:126-39.

Porter L F, Urquhart JE, O'Donoghue E, Spencer AF, Wade EM, Manson FD *et al.* Identificatin of a novel locus for autosomal dominant primary open angle glaucoma on 4q35.1-135.2. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52:7859-65.

Puska P, Lemmelä S, Kristo P, Sankila EM, Järvelä I. Penetrance anda phenotype of the Thr377Met Myocilin mutation in a large Finnish family with juvenile-and adult-onset primary open-anlge glaucoma. *Ophthalmic Genet* 2005; 26:17-23.

QuigleyY, H.A. - Open-angle glaucoma. *N Engl J Med* 2011; 377:1367-77.

Ray K, Mookherjee S. Molecular complexity of primary open angle glaucoma: current concepts. *J Genet.* 2009; 88:451-67.

Raymond V. Molecular genetics of the glaucomas: mapping of the first five "GLC" loci. *Am J Hum Genet.* 1997; 60(2):272-7.

Resch ZT, Fautsch MP. Glaucoma-associated myocilin: a better understanding but much more to learn. *Exp Eye Res.* 2009; 88:704-12.

Rezaie T, Child A, Hitchings R, Hitchings R, Brice G, Miller L *et al.* Adult-Onset Primary Open-Angle Glaucoma caused by Mutations in Optineurin. *Science* 2002; 295:1077-1079

Riazuddin AS, Amiri-Kordestani L, Kaul H, Butt T, Jião X, Riazidsumet S *et al.* Novel SIL1 mutations in consanguineous Pakistani families mapping to chromosome 5q31. *Mol Vis* 2009; 15:1050-6.

Hiekkalinna T, Göring HH, Lambert B, Weiss KM, Norrgrann P, Schäffer AA, Terwilliger JD. On the statistical properties of family-based association tests in datasets containing both pedigrees and unrelated case-control samples. *Eur J Hum Genet* 2001; 20:217-23.

Samples JR, Kitsos G, Economou-Petersen E, Steinkamp P, Sykes R, Rust *et al.* Refining the primary open-angle glaucoma GLC1C region on chromosome 3 by haplotype analysis. *Clin Genet* 2004; 65:40-4.

Swarup G, Nagabhushana A. Optineurin, a multifunctional protein involved in glaucoma, amyotrophic lateral sclerosis and antiviral signalling. *J Biosci.* 2010; 35:501-5.

Secolin R, Rocha CS, Torres FR, Santos ML, Maurer-Morelli CV, Santos NF *et al.* LINKGEN: a new algorithm to process data in genetic linkage studies. *Genomics* 2008; 91:544-2.

Senderek J, Krieger M, Stendel C, Bergmann C, Moser M, Breitback-Faller N *et al.* Mutations in SIL1 cause Marinesco-Sjögren syndrome, a cerebellar ataxia with cataract and myopathy. *Nat Genet* 2005; 37:1312-4.

- Serratos JM. Lafora disease at the beginning of the XXI century. *Neurologia* 1999; 14:325-7.
- Sigal IA, Flanagan JG, Tertinegg I, Ethier CR. Reconstruction of human optic nerve heads for finite element modeling. *Technol Health Care* 2005; 13:313-29.
- Sommer A, Tielsch JM, Katz J. Racial differences in the cause-specific prevalence of blindness in East Baltimore. *N Engl J Med* 1991; 395:1412–17.
- Shaarawy TM, Sherwood MB, Crowston JG. ed SAUNDERS Elsevier. *Glaucoma: Medical Diagnosis & Therapy*. 1° vol., 2009 [acesso em 01/08/2012].
- Sheffield VC, Stone EM, Alward WLM, Drack AV, Johnson AT, Streb LM *et al*. Genetic linkage of familial open angle glaucoma to chromosome 1q21-q31. *Nat Genet* 1993; 4:47-50.
- Sherwin JC, Hewitt AW, Bennett SL, Baird PN, Craig JE, Mackey *et al*. Primary open angle glaucoma in subjects harbouring the predicted GLC1L haplotype reveals a normotensive phenotype. *Clin Experiment Ophthalmol* 2009; 37:201-7.
- Schlötzer-Schrehardt U, Zenkel M, Küchle M, et al. Role of transforming growth factor-beta 1 and its latent form binding protein in pseudoexfoliation syndrome. *ExpEye Res* 2001; 73:765-80.
- Strachan T, Read AP. *Genética Molecular Humana*. 2ª edição. Artmed; 2002.
- Stoilova D, Child A, Trifan OC, Crick RP, Coakes RL, Sarfarazi M. Localization of a locus (GLC1B) for adult-onset primary open angle glaucoma to the 2cen–q13 region. *Genomics*, 2996; 36:142–150.
- Stone EM, Fingert JH, Alward WLM, Nguyen TD, Polansky RJ, Sunden SL *et al*. Identification of a gene that causes primary open angle glaucoma. *Science*. 1997; 275:668-670.
- Sud A, Del Bono EA, Haines JL, Wiggs JL. Fine mapping of the GLC1K juvenile primary open-angle glaucoma locus and exclusion of candidate genes. *Mol Vis*. 2008; 21;14:1319-26.

Kim S, Zhang K, Sun F. Detecting susceptibility genes in case-control studies using set Association. *BMC Genetics* 2003; 31;4.

Suriyapperuma S P, Child A, Desai T, Brice G, Kerr A, Crick RP, Sarfarazi M. A new locus (GLC1H) for adult-onset primary open-angle glaucoma maps to the 2p15-p16 region. *Arch Ophthalmol.* 2007; 125:86-92.

Tamm ER, Fuchshofer R. What increases outflow resistance in primary open-angle glaucoma? *Surv Ophthalmol* 2007; 52(suppl2):101-4.

Tamm, E. R. Myocilin and glaucoma: facts and ideas. *Prog Retin Eye Res* 2002; 21:395-428.

Tamm E, Russel LP, Epstein DL, Johnson DH, Piatigorsky J. Modulation of myocilin/TIGR expression in human trabecular meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40:2577-82.

Thompson E. Detection of Human Genetic Linkage: Foundations. *Theoretical Population Biology* 60, 203–213 (2001).

Thompson, M. W. *Genética Médica*. 7ª edição. Guanabara Koogan, 2008.

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

Trifan OC, Traboulsi EI, Stoilova D, Alozie I, Nguyen R, Raja S et al. A third locus (GLC1D) for adult-onset primary open-angle glaucoma maps to the 8q23 region. *Am J Ophthalmol.* 1998; 126:17-28.

Tripathi RC, Li J, Chan WF, Tripathi BJ. Aqueous humor in glaucomatous eyes contains an increased level of TGF-beta 2. *Exp Eye Res* 1994; 59:723-7.

Vegini F, Figueiroa-Filho N, Lenci RF, Garcia-Neto D, Susanna-Junior R. Prevalence of open angle glaucoma in accompanying first degree relatives of patients with glaucoma. *Clinics.* 2008; 63:329-32.

Vithana EM, Nongpiur ME, Venkataraman D, Chan SH, Mavinahalli J, Aung T. Identification of a novel mutation in the NTF4 gene that causes primary open-angle glaucoma in a Chinese population. *Mol Vis* 2010; 16:1640-5

Xiāo Z, Meng Q, Tsai JC, Yuan H, Xu N, Li Y. A novel optineurin genetic mutation associated with open-angle glaucoma in a Chinese family. *Mol Vis* 2009; 20:15:1649-54.

Wang DY, Fan BJ, Chua JK, Tam PO, Leung CK, Lam DS, Pang CP. A genome-wide scan maps a novel juvenile-onset primary open-angle glaucoma locus to 15q. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006; 47:5315-21.

Weinreb RN. Glaucoma neuroprotection: What is it? Why is it needed? *Can. J. Ophthalmol*. 2007; 42(3):396-8.

Weisschuh N, Wolf C, Wissinger B, Gramer E. Variations in the WDR36 gene in German patients with normal tension glaucoma. *Mol Vis*. 2007; 13:724-9.

Werner E. Progressive normal-tension glaucoma. I. Analysis. *J. Glaucoma*. 1996; 5:422-6.

Wiggs JL, Lynch S, Ynagi G, Maselli M, Auguste J, Del Bono EA, Olson LM, Haines JL. A genomewide scan identifies novel early-onset primary open-angle glaucoma loci on 9q22 and 20p12. *Am J Hum Genet* 2004; 74(6):1314-20.

Wirtz MK, Samples JR, Kramer PL, Rust K, Topinka JR, Yount J *et al*. Mapping a gene for adult-onset primary open-angle glaucoma to chromosome 3q. *Am J Hum Genet* 1997; 60:296-304.

Wirtz MK, Samples JR, Rust K, Lie J, Nordling L, Schilling K, Acott TS, Kramer PL. GLC1F, a new primary open-angle glaucoma locus, maps to 7q35-q36. *Arch Ophthalmol*. 1999; 117:237-41.

Wirtz, MK *et al*. Identification of the GLC1F Gene in Primary Open Angle Glaucoma. *Arvo abstract book*. (Annual meeting – Fort Lauderdale, Florida – 02-06-2010).

Woodroffe A, Krafchak CM, Fuse N, Lichter PR, Moroi SE, Schertzer R *et al*. Ordered subset analysis supports a glaucoma locus at GLC1I on chromosome 15 in families with earlier adult age at diagnosis. *Exp Eye Res* 2006; 82:1068-74.

Wysokinski D, Zaras M, Dorecka M, Waszczyk J, Szaflik J, Blasiak J et al. An association between environmental factors and the IVS4+44C>A polymorphism of the DMT1 gene in age related macular degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2012; 250:1057-65.

ANEXOS



UNICAMP

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

✉ Caixa Postal 6111
13083-970 Campinas, SP
☎ (0_19) 3788-8936
fax (0_19) 3788-8925
✉ cep@head.fcm.unicamp.br

CEP, 19/08/03
(Grupo I)

PARECER PROJETO: Nº 243/2003

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "IDENTIFICAÇÃO DE GENES ASSOCIADOS AO GLAUCOMA PRIMÁRIO DE ÂNGULO ABERTO"

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: José Paulo Cabral de Vasconcellos

INSTITUIÇÃO: Departamento de Oftalmologia/FCM/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 03/06/2003

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 19/02/04 e 19/08/04

II - OBJETIVOS

Avaliar, por meio de estudo de associação e ligação, regiões do genoma humano relacionadas ao glaucoma primário de ângulo aberto (GPAA), com o objetivo de facilitar a identificação de genes candidatos associados a esta moléstia.

III - SUMÁRIO

Serão selecionados 300 pacientes com GPAA e seus 600 familiares (pais e irmãos) para avaliação oftalmológica e genética dos seguintes serviços: ambulatório de glaucoma da Unicamp e hospitais satélites: Divinolândia e Taquaritinga, da Santa Casa de São Paulo, do Hospital de olhos de Londrina e da FCM de Uberlândia. Os pacientes passarão por exame oftalmológico próprio e coleta de exame de sangue para extração de DNA por métodos convencionais. A abordagem molecular será realizada em três laboratórios da UNICAMP (Hemocentro, Núcleo de Biologia Molecular em Oftalmologia e no Depto. de Genética), além do laboratório da Santa Casa de São Paulo. Também será feito grupo controle com número semelhante aos de GPAA. Critérios de inclusão e exclusão bem definidos, e metodologia adequada.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Protocolo bem elaborado, com técnicas novas, sem utilização de placebo e sem riscos para o paciente. Termo de consentimento adequado e completo. Projeto submetido à FAPESP para auxílio jovem pesquisador, ainda sem resposta de orçamento.

Trabalho interessante, que engloba vários centros e profissionais de áreas diferentes. Projeto atual, que utiliza tecnologia avançada e importante para o desenvolvimento científico.

V - PARECER DO CEP

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

VI – INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

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

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

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

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

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

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na VIII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 19 de agosto de 2003.


Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP