

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



Carolina Ayumi Braghini

**“AVALIAÇÃO DE ALELOS MUTANTES DOS GENES
MYOC E CYP1B1 EM PACIENTES PORTADORES DE
GLAUCOMA PRIMÁRIO DE ÂNGULO ABERTO”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Carolina Ayumi Braghini
Mônica Barbosa de Melo
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biologia para obtenção do título
de Mestre em Genética e Biologia
Molecular, na área de Genética
Animal e Evolução.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Mônica Barbosa de Melo

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

B73a Braghini, Carolina Ayumi, 1985-
Avaliação de alelos mutantes dos genes MYOC e
CYP1B1 em pacientes portadores de glaucoma primário
de ângulo aberto / Carolina Ayumi Braghini. – Campinas,
SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Mônica Barbosa de Melo.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Glaucoma de ângulo aberto. 2. Gene MYOC.
3. Gene CYP1B1. 4. Alelos. 5. Mutação (Biologia).
I. Melo, Mônica Barbosa de. II. Universidade Estadual
de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Evaluation of mutant alleles of MYOC and CYP1B1 genes in patients with primary open-angle glaucoma

Palavras-chave em Inglês:

Open-angle glaucoma

MYOC gene

CYP1B1 gene

Alleles

Mutation (Biology)

Área de concentração: Genética Animal e Evolução

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Mônica Barbosa de Melo [Orientador]

Edi Lúcia Sartorato

Cláudia Vianna Maurer Morelli


Data da defesa: 29-02-2012

Programa de Pós Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 29 de fevereiro de 2012

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Mônica Barbosa de Melo (Orientadora)



Assinatura

Profa. Dra. Edí Lúcia Sartorato



Assinatura

Profa. Dra. Cláudia Vianna Maurer Morelli



Assinatura

Dra. Fernanda Caroline Soardi



Assinatura

Dr. Fábio Rossi Torres



Assinatura

**Aos meus pais,
pela dedicação em minha formação
e pelo amor e apoio incondicionais.**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à Mônica Barbosa de Melo e ao José Paulo Cabral de Vasconcellos, por confiarem em meu trabalho, pela enorme paciência e ajuda sempre e pela amizade construída ao longo destes anos de convivência, desde a minha iniciação científica.

A todos os amigos que passaram pelo laboratório, Pedroca, Bruno, Gi, Mari, Hugão, Eugênio, Hirata, Galina, Anderson, Dani Mineira, Caique, Dani Stancato, Sérgio e Farid, pelas discussões, aprendizados e inúmeras risadas juntos!

Um “muito obrigada” especial ao Pedroca, por aguentar meus surtos em nossos *deadlines*, à Gi e à Mari por sempre estarem dispostas a ajudar, ao Hugão, por ajudar a espairer quando era necessário, ao Eugênio por ser essa pessoa tão doce e solícita que sempre me atendia pelo MSN e ao telefone para me acudir, mesmo sendo de madrugada ou estando em Juazeiro do Norte, à Galina pelo seu grande conhecimento e capacidade de compartilhá-lo de forma generosa e brilhante, ao Anderson pela enorme paciência no período de IC e pelos vários quebra-galhos até hoje, e finalmente à Danizinha Stancato, pela imeeeeeensa ajuda em tudo!!!!

Ao Márcio José da Silva por sempre me socorrer quando precisei de reagentes, materiais e do resultado de uma placa de sequenciamento “para ontem”!

À Fer Soardi e ao Reginaldo pela enorme ajuda nas análises *in silico*.

À minha grande amiga Dani Razolli, pelas conversas, discussões, risadas e ajudas mil!!!

À Luli, minha querida amiga, pelas discussões e ideias novas, além da amizade sempre!!

Ao Dudu del Bem, pela ajuda em revisar o projeto e por me fazer ver a ciência com novos olhos!

À Flor e à Mara pelos quebra-galhos em assuntos diversos!

À Sandra, Tânia e Gabi, da secretaria do CBMEG, muito atenciosas, solícitas e dedicadas sempre.

À Lourdes da Secretaria de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, pela paciência e atenção.

A todos do CBMEG que de alguma forma contribuíram para a realização deste projeto!

À minha família pelo apoio, compreensão e dedicação. Ao meu irmão que eu amo muito, por ser essa pessoa maravilhosa, amável e batalhadora.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS	xiii
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xviii
INTRODUÇÃO	19
1. Glaucoma	19
1.1. Definição	19
1.2. Classificação do glaucoma	20
2. Glaucoma primário de ângulo aberto (GPAA)	22
2.1. Definição	22
2.2. Epidemiologia	23
2.3. Fatores de Risco	25
2.4. Estudos populacionais: identificação de <i>loci</i> , genes e mutações relacionados ao GPAA	25
3. Gene <i>Myocilin</i> (<i>MYOC</i>)	30
3.1. Mapeamento, identificação e estrutura do gene <i>MYOC</i>	30
3.2. Expressão do gene <i>MYOC</i>	31
3.3. Estrutura e função da proteína miocilina	32
4. Gene Citocromo P450, família 1, subfamília B, polipeptídeo 1 (<i>CYP1B1</i>)	37
4.1. Mapeamento, identificação e estrutura do gene <i>CYP1B1</i>	37
4.2. Expressão do gene <i>CYP1B1</i>	38
4.3. Função da proteína CYP1B1	38

5. Justificativa	41
OBJETIVOS	43
CASUÍSTICA E MÉTODOS	45
1. Casuística	45
1.1. Heredogramas	46
1.2. Critérios de inclusão	48
1.3. Critérios de exclusão	48
1.4. Grupo controle	49
2. Métodos	49
2.1. Exame oftalmológico	49
2.1.1. Tonometria (medida da pressão intra-ocular) e paquimetria (medida da espessura da córnea)	49
2.1.2. Gonioscopia: avaliação do ângulo	50
2.1.3. Fundoscopia: avaliação do disco óptico (relação escavação/disco)	51
2.2. Coleta de amostras de sangue periférico	52
2.3. Extração de DNA genômico	52
2.4. Quantificação e verificação da integridade do DNA genômico	54
2.5. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	55
2.5.1. Amplificação dos fragmentos do gene <i>MYOC</i>	55
2.5.2. Amplificação dos fragmentos do gene <i>CYP11B1</i>	56
2.6. Reação de sequenciamento	57
2.7. Correlação genótipo/fenótipo – Gene <i>MYOC</i>	58
2.8. Correlação genótipo/fenótipo – Gene <i>CYP11B1</i>	58
2.9. Estudo <i>in silico</i>	59

2.10. Análise dos resultados	59
RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
1. Análises de mutações no gene <i>MYOC</i>	63
2. Correlação genótipo/fenótipo – Gene <i>MYOC</i>	69
3. Análise de mutações no gene <i>CYP1B1</i>	84
4. Correlação genótipo/fenótipo – Gene <i>CYP1B1</i>	88
CONCLUSÃO	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
ANEXO	113

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>ASB10</i>	<i>ankyrin repeat and SOCS box containing 10</i>
CYPs	citocromos P 450
<i>CYP1A1</i>	<i>gene citocromo P450, família 1, subfamília A, polipeptídeo 1</i>
<i>CYP1A2</i>	<i>gene citocromo P450, família 1, subfamília A, polipeptídeo 2</i>
<i>CYP1B1</i>	<i>gene citocromo P450, família 1, subfamília B, polipeptídeo 1</i>
D	direto
DDAH	dimetilamino-hidrolase dimetilarginina
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	didesoxinucleotídeos
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
<i>FISH</i>	hibridização <i>in situ</i> fluorescente (do inglês, <i>fluorescent in situ hybridization</i>)
GLC1A	primeiro <i>locus</i> associado ao GPAA
GLC1B	segundo <i>locus</i> associado ao GPAA
GLC1C	terceiro <i>locus</i> associado ao GPAA
GLC1D	quarto <i>locus</i> associado ao GPAA
GLC1E	quinto <i>locus</i> associado ao GPAA
GLC1F	sexto <i>locus</i> associado ao GPAA
GLC1G	sétimo <i>locus</i> associado ao GPAA
GLC1H	oitavo <i>locus</i> associado ao GPAA
GLC1I	nono <i>locus</i> associado ao GPAA
GLC1J	décimo <i>locus</i> associado ao GPAA
GLC1K	décimo primeiro <i>locus</i> associado ao GPAA
GLC1L	décimo segundo <i>locus</i> associado ao GPAA
GLC1M	décimo terceiro <i>locus</i> associado ao GPAA
GLC1N	décimo quarto <i>locus</i> associado ao GPAA
GLC1O	décimo quinto <i>locus</i> associado ao GPAA
GLC1P	décimo sexto <i>locus</i> associado ao GPAA
GPAA	glaucoma primário de ângulo aberto
GPAA-J	glaucoma primário de ângulo aberto do tipo juvenil

GPAE	glaucoma primário de ângulo estreito
GCP	glaucoma congênito primário
HCl	ácido clorídrico
H ₂ O	água
kb	quilobases
KCl	cloreto de potássio
kDa	quilodaltons
M	molar
mg	miligrama
MgCl ₂	cloreto de magnésio
mRNA	RNA mensageiro
mL	mililitro
mM	milimolar
mmHg	milímetro de mercúrio
<i>MYOC</i>	gene <i>Myocilin</i>
NaCl	cloreto de sódio
ng	nanograma
nm	nanômetro
nM	nanomolar
<i>NTF4</i>	<i>neutrophin-4</i>
<i>OPTN</i>	<i>optineurin</i>
pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia da polimerase (do inglês, <i>polymerase chain reaction</i>)
PDB	banco de dados de proteína (do inglês, <i>Protein Data Bank</i>)
pH	potencial hidrogeniônico
PIO	pressão intraocular
pmol	picomol
q.s.q.	quantidade suficiente para
R	reverso
RE	retículo endoplasmático
RNA	ácido ribonucleico

rpm	rotações por minuto
RSB	tampão de parada da reação (do inglês, <i>reaction stop buffer</i>)
TAG	tonometria de aplanção de Goldmann
TBE	Tris/Borato/EDTA
TCDD	2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina
TE	tampão de eluição (Tris/EDTA)
<i>TIGR</i>	<i>trabecular meshwork glucocorticoid response</i>
SDS	dodecil sulfato de sódio (do inglês, <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
U	unidades
µg	micrograma
µL	microlitro
UPR	resposta a proteína mal-enovelada (do inglês, <i>unfolded protein response</i>)
v:v	relação volume por volume
<i>WDR36</i>	<i>WD repeat domain 36</i>
3D	três dimensões
°C	graus centígrados

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

- Figura 1.** Em A, está representado um olho normal, com destaque para o disco óptico intacto. Em B, está representado um olho com pressão intraocular aumentada e conseqüente dano ao disco óptico. Em destaque, a escavação do disco óptico, decorrente da morte das células ganglionares da retina (modificado de <http://www.indiaglaucoma.com/aboutGlaucoma.html>)..... 20
- Figura 2. A.** Representação de um olho com ângulo (formado entre a córnea e a íris) aberto. As setas azuis mostram o fluxo normal do humor aquoso, que é produzido no corpo ciliar, na câmara posterior, escoia pela pupila até a câmara anterior e é drenado através da malha trabecular, saindo do olho pelo canal de Schlemm e veia episcleral. Em **B**, há a representação de um olho com ângulo fechado, onde o fluxo do humor aquoso torna-se dificultado, devido à anatomia da câmara anterior, da íris e do cristalino. O humor aquoso é um líquido incolor responsável pela nutrição da córnea e do cristalino, além da manutenção da tonicidade ocular (Modificado de <http://www.medrounds.org/glaucoma-guide/2006/06/section-4-d-angle-closure-glaucoma.html>)..... 22
- Figura 3.** Família I, constituída por 44 indivíduos avaliados..... 46
- Figura 4.** Família II, da qual 17 indivíduos foram incluídos na pesquisa..... 47
- Figura 5.** Família III, com 39 indivíduos estudados..... 47
- Figura 6.** Família IV, da qual sete indivíduos foram avaliados..... 48
- Figura 7.** Eletroferograma do sequenciamento do terceiro exon do gene *MYOC* do paciente afetado (A), mostrando a mutação em heterozigose (c.1187_1188insCCCAGA), e do paciente não afetado (B). A seta indica a localização da inserção..... 64
- Figura 8.** Alinhamento múltiplo de aminoácidos de proteínas da família das olfactomedinas, demonstrando que os resíduos D395 e E396 não são bem conservados entre as espécies. A caixa verde indica um dos sítios de fosforilação de caseína quinase II presentes na miocilina..... 65
- Figura 9.** Gráfico de contatos internos da miocilina gerado pelo programa STING Millennium. **A. Sequência normal:** o resíduo D395 interage com o S393 por ligação de hidrogênio na cadeia principal. E396 interage com diferentes aminoácidos: T394 e S393 por ligação de hidrogênio na cadeia principal; E96 por interação repulsiva; K398 e R38 por interação atrativa; N41 por ligação de hidrogênio na cadeia lateral e ligação hidrofóbica. **B. Sequência mutante:** foram observadas alterações de contato relevantes em D395 e E398. A inserção de D396 e P397 permitiu que D395 e E398 criassem muitos contatos internos, sugerindo que estas mudanças podem também causar relevantes mudanças estruturais na proteína. **C.**

Resíduos inseridos: a inserção dos resíduos D396 e P397 leva à criação de novos contatos internos na proteína em uma região bastante conservada. D396 estabelece duas fortes interações com A399 e Y392. O resíduo hidrofóbico P397 estabelece interações hidrofóbicas com T394, S393, T50 e D395..... 66

Figura 10. Eletroferograma do terceiro exon do gene *MYOC*, no qual é possível observar a mutação I345V identificada em heterozigose em indivíduo com GPAA-J. A seta indica o local da mutação, que leva à troca de bases A>G, acarretando na mudança do aminoácido isoleucina por uma valina (A). Indivíduo não portador da mutação I345V (B)..... 68

Tabela I. *Loci* gênicos associados ao GPAA..... 26

Tabela II. Iniciadores direto (D) e reverso (R) do gene *MYOC* utilizados nas reações de PCR e sequenciamento direto e suas respectivas temperaturas de anelamento..... 56

Tabela III. Iniciadores direto (D) e reverso (R) do gene *CYP11B1* utilizados nas reações de PCR e sequenciamento direto e suas respectivas temperaturas de anelamento..... 57

Tabela IV. Frequência alélica dos polimorfismos encontrados no gene *MYOC* nos casos não relacionados de GPAA-J..... 69

Tabela V. Frequência alélica das mutações encontradas no gene *MYOC* nos casos não relacionados de GPAA-J..... 69

Tabela VI. Penetrância da mutação no gene *MYOC* (C433R nas famílias I, II e III e c.1187_1188insCCCAGA na família IV) nos indivíduos das quatro famílias com GPAA estudadas..... 71

Tabela VII. Associação entre o desenvolvimento do GPAA com a presença da mutação C433R no gene *MYOC*, em membros da família I..... 71

Tabela VIII. Dados clínicos dos membros da família I de acordo com a presença/ausência da mutação C433R no gene *MYOC*..... 72

Tabela IX. Comparação entre os parâmetros clínicos de PIO máxima e fundoscopia (relação escavação/disco) em ambos os olhos de acordo com a presença ou ausência da mutação C433R no gene *MYOC*, em membros da família I..... 73

Tabela X. Associação entre o desenvolvimento do GPAA com a presença da mutação C433R no gene *MYOC*, em membros da família II..... 74

Tabela XI. Dados clínicos dos membros da família II de acordo com a presença/ausência da mutação C433R no gene <i>MYOC</i>	74
Tabela XII. Comparação entre os parâmetros clínicos de PIO máxima e fundoscopia (relação escavação/disco) em ambos os olhos de acordo com a presença ou ausência da mutação C433R no gene <i>MYOC</i> em membros da família II.....	75
Tabela XIII. Associação entre o desenvolvimento do GPAA com a presença da mutação C433R no gene <i>MYOC</i> , em membros da família III.....	76
Tabela XIV. Dados clínicos dos membros da família III de acordo com a presença/ausência da mutação C433R no gene <i>MYOC</i>	77
Tabela XV. Comparação entre os parâmetros clínicos de PIO máxima e fundoscopia (relação escavação/disco) em ambos os olhos de acordo com a presença ou ausência da mutação C433R no gene <i>MYOC</i> em membros da família III.....	78
Tabela XVI. Associação entre o desenvolvimento do GPAA com a presença da mutação c.1187_1188insCCCAGA no gene <i>MYOC</i> , em membros da família IV.....	79
Tabela XVII. Dados clínicos dos membros da família IV de acordo com a presença/ausência da mutação c.1187_1188insCCCAGA no gene <i>MYOC</i>	80
Tabela XVIII. Comparação entre os parâmetros clínicos de PIO máxima e fundoscopia (relação escavação/disco) em ambos os olhos de acordo com a presença ou ausência da mutação c.1187_1188insCCCAGA no gene <i>MYOC</i> em membros da família IV.....	80
Tabela XIX. Dados clínicos dos casos não relacionados de GPAA-J que apresentam mutação no gene <i>MYOC</i>	82
Tabela XX. Dados clínicos dos casos não relacionados de GPAA-J que não apresentam mutação no gene <i>MYOC</i>	83
Tabela XXI. Avaliação da associação da presença de mutação no gene <i>MYOC</i> com os dados clínicos de pressão intra-ocular máxima e número de cirurgias realizadas, nos casos não relacionados de GPAA-J....	84
Tabela XXII. Frequência alélica dos polimorfismos encontrados no gene <i>CYP11B1</i> na família I.....	85

Tabela XXIII. Frequência alélica dos polimorfismos encontrados no gene <i>CYP1B1</i> na família II.....	86
Tabela XXIV. Frequência alélica dos polimorfismos encontrados no gene <i>CYP1B1</i> na família III.....	86
Tabela XXV. Frequência alélica dos polimorfismos encontrados no gene <i>CYP1B1</i> na família IV.....	86
Tabela XXVI. Frequência alélica dos polimorfismos encontrados no gene <i>CYP1B1</i> nos casos não relacionados de GPAA-J.....	87
Tabela XXVII. Frequência alélica das mutações encontradas no gene <i>CYP1B1</i> nos casos não relacionados de GPAA-J.....	88

RESUMO

O glaucoma compreende um grupo heterogêneo de neuropatias ópticas, caracterizadas pela escavação do disco óptico e perda progressiva do campo visual, representando uma das maiores causas mundiais de perda irreversível da visão. Em 1997, o gene *Myocilin* (*MYOC*) foi descoberto, e mutações neste gene foram envolvidas no desenvolvimento do glaucoma primário de ângulo aberto (GPAA) e do GPAA do tipo juvenil (GPAA-J). No Brasil, 35,7% e 3,85% dos pacientes com GPAA-J e GPAA, respectivamente, são portadores de mutações no gene *MYOC*. O gene citocromo P450, família 1, subfamília B, polipeptídeo 1 (*CYP1B1*), primeiramente associado ao glaucoma congênito primário, tem sido apontado como modulador do fenótipo do GPAA na presença de alterações no gene *MYOC*. Recentemente, observaram-se mutações no gene *CYP1B1* associadas ao GPAA e GPAA-J, independentemente da presença de alterações estruturais no gene *MYOC*, em diferentes populações. Este projeto se propôs a avaliar mutações nos genes *MYOC* e *CYP1B1*, utilizando técnicas de PCR e sequenciamento direto, em 100 indivíduos pertencentes a famílias com GPAA ou GPAA-J e 43 pacientes não relacionados portadores de GPAA-J, bem como avaliar a possível modulação do gene *CYP1B1* no fenótipo da doença. Uma nova mutação no gene *MYOC*, c.1187_1188insCCCAGA, foi identificada segregando com a doença em três gerações de uma família. De acordo com análises *in silico*, esta mutação pode alterar os contatos internos da proteína, além de comprometer um sítio de fosforilação de caseína quinase II. Nas demais três famílias foi detectada a mutação C433R, já descrita anteriormente. Como os membros das famílias apresentavam fenótipos bastante variados, foi realizada a análise da possível modulação do fenótipo da doença pelo gene *CYP1B1*. Contudo, as análises mostraram a não associação de variantes deste gene na modulação do fenótipo do glaucoma nestas famílias. Nos casos não relacionados de GPAA-J, foram observadas as mutações P370L, Q368X e C433R. Nenhuma mutação no gene *CYP1B1* foi identificada nestes casos, mas somente polimorfismos: R48G, A119S, V243V, V432L, A443G, D449D e N453S. De acordo com este e outros estudos, é possível concluir que mutações no gene *MYOC* tem papel importante no desenvolvimento do GPAA e GPAA-J, sendo a mutação C433R a mais frequente na população brasileira. Além disso, o gene *CYP1B1* parece ter menor contribuição no desenvolvimento destes tipos de glaucoma em nossa população.

ABSTRACT

Glaucoma comprises a group of heterogeneous optic neuropathies characterized by excavation of the optic disc and progressive loss of visual field, representing a major global cause of irreversible blindness. In 1997, the *Myocilin* gene (*MYOC*) was discovered, and mutations in this gene were involved in the development of primary open-angle glaucoma (POAG) and juvenile-onset of POAG (JOAG). In Brazil, 35.7% and 3.85% of patients with POAG and JOAG, respectively, are carriers of mutations in the *MYOC* gene. The gene *cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1* (*CYP1B1*), primarily associated with primary congenital glaucoma, has been related to phenotypic modulation of POAG in the presence of *MYOC* gene mutations. Recently, mutations in the *CYP1B1* gene associated with POAG and JOAG were observed, regardless the presence of structural alterations in the *MYOC* gene in different populations. This project proposed to evaluate mutations in the *MYOC* and *CYP1B1* genes using PCR and direct sequencing, in 100 individuals belonging to families with JOAG or POAG and 43 unrelated JOAG patients, and assess the possible role of the *CYP1B1* gene in modulating the disease phenotype. A novel mutation in the *MYOC* gene, c.1187_1188insCCCAGA, was detected, segregating with the disease in three generations of one family. According to *in silico* analysis, this mutation can change the internal contacts of the protein, and has altered a phosphorylation site of casein kinase II. In the other three families the C433R mutation was detected, as described earlier. As family members presented with very different phenotypes, the *CYP1B1* gene was evaluated as a possible modulator of the disease. However, the analysis showed no association of variants in *CYP1B1* gene in modulating the glaucoma phenotype in these families. In unrelated cases of JOAG, the mutations P370L, Q368X and C433R were detected. No mutation in the *CYP1B1* gene was observed in these cases, but only polymorphisms: R48G, A119S, V243V, V432L, A443G, D449D, and N453S. According to the present and other studies, we conclude that mutations in the *MYOC* gene play an important role in the development of POAG and JOAG, and the C433R mutation is the most frequent *MYOC* alteration in the Brazilian population. Furthermore, the *CYP1B1* gene seems to have less contribution to the development of these types of glaucoma in our population.

INTRODUÇÃO

1. Glaucoma

1.1. Definição

Glaucoma é um grupo heterogêneo de neuropatias ópticas que têm como característica comum a atrofia progressiva do disco óptico, com alteração correspondente de campo visual decorrente da perda de células ganglionares da retina (Shields et al., 1996; Ray et al., 2003; Fan et al., 2006; Sarfarazi, 1996). O aumento da pressão intraocular (PIO) é frequentemente associado ao glaucoma, que se não tratado a tempo, por meio de intervenção medicamentosa ou cirúrgica, pode levar à perda irreversível de campo visual e até à cegueira. Assim, o diagnóstico em estágios iniciais da doença é de grande importância (Bayat et al., 2008). Contudo, os efeitos da perda de visão no glaucoma são frequentemente detectados somente após a perda de 40% dos axônios (Quigley, 1999). Na figura 1 está a representação de um olho com disco óptico normal e outro com aumento da pressão intraocular e conseqüente escavação do disco óptico característico do glaucoma.

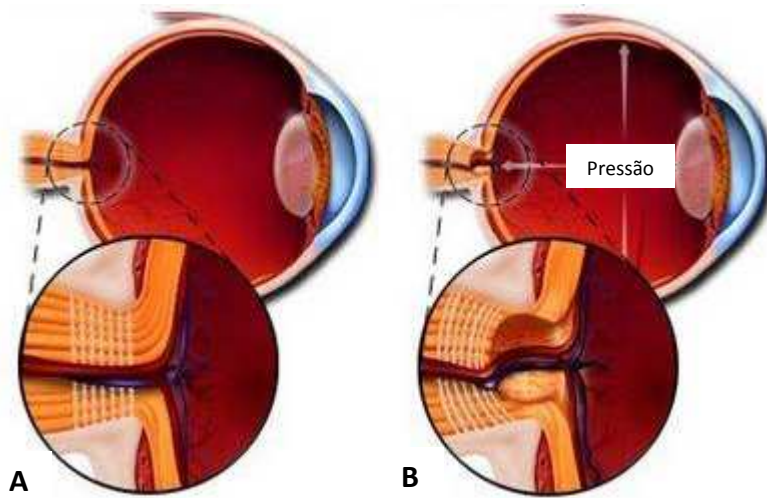


Figura 1. Em A, está representado um olho normal, com destaque para o disco óptico intacto. Em B, está representado um olho com pressão intraocular aumentada e consequente dano ao disco óptico. Em destaque, a escavação do disco óptico, decorrente da morte das células ganglionares da retina (modificado de <http://www.indiaglaucoma.com/aboutGlaucoma.html>).

1.2. Classificação do glaucoma

Os glaucomas podem ser classificados de acordo com três aspectos: 1) fator inicial que leva ao desenvolvimento da lesão glaucomatosa, sendo primário se este é desconhecido (idiopático) ou secundário se envolve condições oculares ou sistêmicas de causas conhecidas, como o uso de corticosteróides tópico e/ou sistêmico, trauma ocular prévio ou catarata; 2) aspecto anatômico do seio camerular (ângulo formado pelo endotélio da córnea e a face anterior da íris), dividindo-o em ângulo aberto ou fechado (também chamado de estreito) (Figura 2); 3) idade de instalação da doença, podendo ser congênito, quando o desenvolvimento da doença se inicia na vida intrauterina e o glaucoma pode ser diagnosticado até o terceiro ano de idade do indivíduo, juvenil quando a doença se manifesta até os 35 anos de idade e adulto, quando o glaucoma se instala após os 35 anos de idade (Leske, 1983).

Três tipos de glaucoma primário são conhecidos: glaucoma primário de ângulo aberto, que é dividido em adulto (GPAA) e juvenil (GPAA-J), o glaucoma primário de ângulo estreito (GPAE) e o glaucoma congênito primário (GCP). O GPAA, a forma mais comum de todos os glaucomas, é definido como neuropatia óptica crônica e progressiva, cujo principal fator de risco é a PIO. O GPAA-J é uma forma relativamente menos frequente do GPAA e costuma ser mais grave, cujos afetados apresentam valores de PIO maiores e necessidade de intervenção cirúrgica mais frequente. O GPAE é caracterizado pela PIO elevada devido ao bloqueio crônico ou agudo do seio camerular através de aderências entre este e a íris (Ritch & Lowe, 1996). O GCP geralmente desenvolve-se nos três primeiros anos de vida com um quadro clínico clássico caracterizado por epífora (lacrimejamento contínuo), blefaroespasma (fechamento repetitivo e involuntário das pálpebras), fotofobia (hipersensibilidade à luz) e bftalmo (aumento do globo ocular) (Deluise & Anderson, 1983). A elevação da PIO ocorre devido à malformação do seio camerular impedindo o escoamento adequado do humor aquoso.

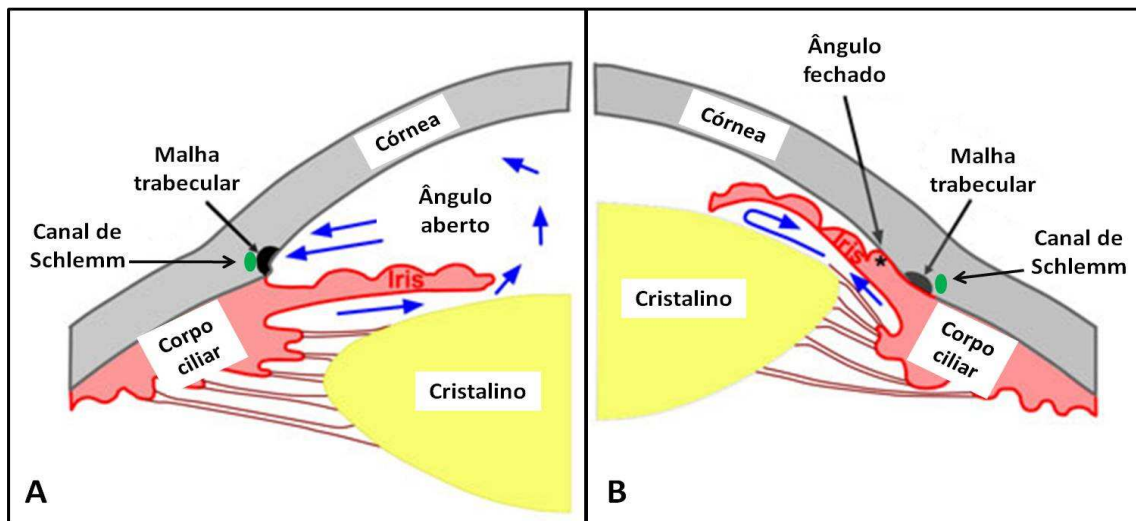


Figura 2. A. Representação de um olho com ângulo (formado entre a córnea e a íris) aberto. As setas azuis mostram o fluxo normal do humor aquoso, que é produzido no corpo ciliar, na câmara posterior, escoo pela pupila até a câmara anterior e é drenado através da malha trabecular, saindo do olho pelo canal de Schlemm e veia episcleral. Em B, há a representação de um olho com ângulo fechado, onde o fluxo do humor aquoso torna-se dificultado, devido à anatomia da câmara anterior, da íris e do cristalino. O humor aquoso é um líquido incolor responsável pela nutrição da córnea e do cristalino, além da manutenção da tonicidade ocular (Modificado de <http://www.medrounds.org/glaucoma-guide/2006/06/section-4-d-angle-closure-glaucoma.html>).

Dentre os glaucomas secundários estão o glaucoma pigmentar, o glaucoma cortisônico e o glaucoma pseudoexfoliativo. O glaucoma pigmentar é caracterizado pela ocorrência de dispersão pigmentar e aumento da PIO, que potencialmente pode desencadear dano glaucomatoso ao nervo óptico. Acomete preferencialmente indivíduos míopes do sexo masculino durante a terceira e quarta décadas de vida (Richter et al., 1986). Desencadeado pelo uso de corticoesteróides tópicos e/ou sistêmicos, que levam ao aumento da PIO (Skuta & Morgan, 1996), o glaucoma cortisônico tem como causa provável, alterações morfológicas e funcionais das células trabeculares e da matriz extracelular circundante (Kimura & Honda, 1982; Wordinger & Clark, 1999). O glaucoma pseudoexfoliativo desenvolve-se tardiamente (na sexta e sétima décadas de vida), como complicação da síndrome pseudoexfoliativa (Naumann et al., 1998). Esta

síndrome consiste na presença de material amilóide-fibrilar proveniente da matriz extracelular, que se acumula em estruturas do segmento anterior do globo ocular bem como em tecidos extra-oculares (Naumann et al., 1998). A presença deste material na malha trabecular ocasiona uma disfunção no sistema de drenagem do humor aquoso, que culmina com a elevação da PIO e dano glaucomatoso ao disco óptico (Naumann et al., 1998).

2. Glaucoma primário de ângulo aberto (GPAA)

2.1. Definição

Em 2002, um painel de consenso internacional publicou definições para o GPAA e GPAE (Quigley & Broman, 2006; Foster et al., 2002). Para ambas as doenças, o glaucoma é definido como uma neuropatia óptica e que deve ser considerado presente somente quando ao menos um dos olhos apresentar típicos defeitos estruturais e funcionais (dano ao disco óptico e perda de campo visual). Esta combinação de danos deve ser suficiente para indicar a morte de um número substancial de células ganglionares da retina e perda de seus axônios no nervo óptico (Quigley, 2011).

Apesar da prevalência do GPAA aumentar com a idade, um subgrupo de pacientes é diagnosticado com a forma juvenil (GPAA-J), que se manifesta entre os 10 e 35 anos de idade. Em muitos casos, o GPAA segue um padrão de herança complexo, enquanto o glaucoma primário de ângulo aberto juvenil (GPAA-J) apresenta, geralmente, um padrão de herança autossômico dominante. Quanto ao fenótipo, estes dois tipos de GPAA também diferem. O GPAA-J normalmente apresenta níveis pressóricos elevados, predomínio de miopia e necessidade frequente de tratamento cirúrgico (Jhonson et al., 1993; Wiggs et al., 1995). Entretanto, esta divisão em idade muitas vezes se mostra

artificial, devido à sobreposição destes subtipos de GPAA (GPAA-J e GPAA-A) em uma mesma família (Stoilova et al., 1996; Wirtz et al., 1999).

2.2. Epidemiologia

O glaucoma é a maior causa de cegueira irreversível do mundo e para o ano de 2020, foi estimado que aproximadamente 80 milhões de pessoas serão afetadas pela doença, sendo 74% destas pessoas, portadoras do GPAA. Dentre elas, 5,9 milhões de pessoas estarão cegas de ambos os olhos (Quigley & Broman, 2006).

No Brasil, Gullo et al. (1995) avaliaram retrospectivamente pacientes atendidos pela primeira vez no Setor de Glaucoma do Hospital das Clínicas da UNICAMP e constataram elevada taxa de cegueira unilateral (51,8%) e bilateral (33,3%).

Além do impacto na qualidade de vida, a perda da função visual tem um custo elevado para a sociedade. Smith & Smith (1996) constataram a perda de um quarto a um sexto do produto interno bruto per capita no Reino Unido devido à cegueira. O custo de um indivíduo cego nos Estados Unidos é de aproximadamente U\$ 12000,00 anuais, o que representa cerca de 0,3% do orçamento federal americano (Javitt, 1995).

A maioria dos médicos tem contato regular com adultos afetados por uma dessas duas formas de glaucoma: GPAA e GPAAE. Dados populacionais indicam que um em cada 40 adultos tem glaucoma, com perda de campo visual, o que equivale a 60 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo 8,4 milhões com cegueira bilateral. Mesmo em países desenvolvidos, metade dos casos de glaucoma não são diagnosticados, já que o glaucoma é frequentemente assintomático até um estágio mais avançado da doença, quando os problemas visuais começam a surgir. Atualmente, o glaucoma é tratado farmacologicamente com colírios diários, mas a aderência ao tratamento é muitas vezes

insatisfatória. A perda da visão pelo glaucoma não é reversível, e, portanto, faz-se necessária a melhoria dos métodos de detecção da doença (Quigley, 2011).

2.3. Fatores de Risco

Existem diversos fatores de risco relacionados ao GPAA. Um deles é a idade, havendo maior prevalência da doença quanto maior a idade do indivíduo (Shiose et al., 1991; Leske et al., 1994). A raça também mostrou-se um fator de risco para o glaucoma, tendo os indivíduos da raça negra maiores chances de desenvolver o GPAA (Tielsch et al., 1991; Wormald et al., 1994). A prevalência da doença em indivíduos com miopia também é maior (Mitchell et al., 1999; Wu et al., 2000). Além destes, há dois importantes fatores de risco associados à doença, sendo um deles, os altos níveis de PIO (acima de 21 mmHg) (Armaly et al., 1980; Hovding & Aesved, 1986; Leske et al., 1995) e o outro, a história familiar positiva para a doença. Várias abordagens têm sido utilizadas para investigar tal associação, incluindo a avaliação de parentes de pacientes com GPAA, estudos do tipo caso-controle, estudos observacionais de prevalência e estudos de avaliação de gêmeos (Vasconcellos, 2001).

2.4. Estudos populacionais: identificação de *loci*, genes e mutações relacionados ao GPAA

Para identificação e classificação de *loci* candidatos que poderiam estar envolvidos com o desenvolvimento do glaucoma, a Organização Mundial do Genoma Humano propôs a sigla “GLC” para os genes associados ao glaucoma. Os números “1”, “2” e “3”, que seguem a sigla geral para os glaucomas, representam ângulo aberto, ângulo estreito e glaucoma congênito, respectivamente. Finalmente, as letras “A”, “B”,

“C” e assim por diante, indicam o primeiro e os subsequentes *loci* identificados para determinado tipo de glaucoma (Raymond, 1997).

Até o momento foram identificados 17 *loci* cromossômicos para o GPAA que foram mapeados por análise de ligação (GLC1A a GLC1Q) (Wirtz et al., 2011, Porter et al., 2011), mostrados na tabela I.

Tabela I. *Loci* gênicos associados ao GPAA.

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

Contudo, somente quatro genes foram associados ao desenvolvimento do GPAA: *myocilin* (*MYOC*/GLC1A; MIM 601652), *optineurin* (*OPTN*/GLC1E; MIM 137760), *WD repeat domain 36* (*WDR36*/GLC1G; MIM 609669) e *neutrophin-4* (*NTF4*/GLC1O; MIM 162662) (Stone et al., 1997; Rezaie et al., 2002; Monemi et al., 2005; Pasutto et al., 2009). Mais recentemente, um novo gene foi associado ao GPAA, o *ankyrin repeat and SOCS box containing 10* (*ASB10*/GLC1F) em um estudo realizado com coortes dos Estados Unidos e da Alemanha, para análise de busca de mutações relacionadas ao

desenvolvimento do GPAA, bem como análises funcionais da proteína (Wirtz et al., 2011). Neste estudo, a variante T255T foi encontrada em uma família com GPAA. Esta variante, presente em região de *splicing*, provavelmente está afetando a formação do RNA mensageiro (mRNA). Adicionalmente, 26 alterações que levam à mudança de aminoácidos foram encontradas em 70 pacientes com GPAA.

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

Monemi et al. (2005) associaram, pela primeira vez, mutações no gene *WDR36* com a desenvolvimento do GPAA. Outros estudos revelaram a presença de variantes raras encontradas no gene *WDR36* em pacientes com GPAA, sugerindo seu envolvimento na fisiopatologia da doença (Weisschuh et al., 2007; Pasutto et al, 2008). Contudo, em estudo realizado por Hauser et al. (2006), as variantes encontradas no gene *WDR36* não foram associadas à doença. Porém, a presença destas variantes em indivíduos com maior severidade da doença, levaram os autores a sugerir a possível ação moduladora do gene no fenótipo do glaucoma.

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

al., 2000). Estudos de Pasutto et al. (2009) revelaram que mutações no gene *NTF4* podem prejudicar a sinalização das neurotrofinas no GPAA. Além disso, os autores encontraram em 1,7% dos pacientes glaucomatosos de origem europeia, mutações neste gene, associando-o, portanto, à doença. Entretanto, estudos posteriores mostraram a ausência da associação do gene *NTF4* com o glaucoma em pacientes indianos e caucasianos (Rao et al., 2010; Liu et al., 2010).

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

Mais de 70 mutações no gene *MYOC* já foram relatadas, sendo a Q368X a mais comum em diversas populações estudadas (Fingert et al., 1999). Em pacientes indianos, a mutação Q48H se mostrou predominante em casos de GPAA adulto e juvenil e GCP. Algumas mutações também foram identificadas na região promotora do gene, sendo -1000 C>G relatada como a mais frequente com graus variáveis de associação com a doença (Polansky et al. 2003).

A correlação genótipo/fenótipo foi demonstrada para várias alterações no gene *MYOC*. Estudos mostraram que indivíduos portadores da mutação T377M manifestavam o glaucoma na quarta década de vida, enquanto que aqueles portadores das mutações P370L e Y437H (com médias de PIO máximas de 44 mmHg) eram diagnosticados com a doença na primeira ou segunda década de vida, mas indivíduos com a mutação Q368X (com médias de PIO máxima de 30 mmHg) mostram início da doença predominantemente entre a quinta e sexta décadas de vida (Wiggs et al., 1998; Shimizu et

al., 2000; Melki et al., 2003; Puska et al., 2005; Hewitt et al., 2007). Vasconcellos et al. (2003) constataram que portadores da mutação C433R, identificada na população brasileira, manifestaram a doença entre 17 e 58 anos de idade, sendo esta variante associada a valores elevados de PIO e alta relação escavação/disco.

O gene *CYP1B1*, inicialmente descrito como o primeiro gene associado ao GCP (*locus* GLC3A), em 1997 por Stoilov e colaboradores, também foi associado ao desenvolvimento do GPAA adulto e juvenil em diversas populações como a canadense, indiana, iraniana, francesa e espanhola, sendo encontradas mutações em heterozigose neste gene, com uma frequência entre 2,2% e 23,3% dos casos (Vincent et al., 2002; Melki et al., 2004; Acharya et al., 2006; López-Garrido et al., 2006; Chakrabarti et al., 2007; Kumar et al., 2007; Suri et al. 2008).

Vincent et al. (2002) descreveram uma família canadense com membros que apresentavam GPAA adulto e outros GPAA juvenil. Os autores relacionaram a presença destas doenças a mutações nos genes *MYOC* e *CYP1B1*. Todos os indivíduos glaucomatosos apresentavam a mutação G399V no gene *MYOC*. Entretanto, nos indivíduos que carregavam somente mutação neste gene, a idade média de desenvolvimento da doença era de 51 anos (entre 48 e 64 anos) e os portadores de mutações em ambos os genes, ou seja, a mutação G399V no gene *MYOC* e a mutação R368H no gene *CYP1B1*, manifestaram a doença, em média, aos 27 anos de idade (entre 23 e 38 anos). Indivíduos portadores somente da mutação no gene *CYP1B1* não manifestaram a doença. Deste modo, nesta família, o gene *CYP1B1* parece agir como modificador do gene *MYOC*, gerando, portanto, fenótipos distintos nestes indivíduos. A mutação R368H foi previamente reportada por Bejjani et al. (2000) em homozigose em

indivíduos sauditas com GCP, com penetrância incompleta, estando ausente em 100 cromossomos de indivíduos sauditas controle.

3. Gene *Myocilin* (*MYOC*)

3.1. Mapeamento, identificação e estrutura do gene *MYOC*

Por meio de estudos de ligação em famílias com glaucoma primário de ângulo aberto, diversos autores identificaram, de forma independente, o primeiro *locus* associado ao GPAA no braço longo do cromossomo 1, que foi posteriormente denominado *locus GLC1A* (Sheffield et al., 1993; Richards et al., 1994; Wiggs et al., 1994; Morissette et al., 1995; Johnson et al., 1996; Belmouden et al., 1997). O gene presente no *locus GLC1A*, associado ao GPAA, foi identificado em 1997, por Stone et al. e denominado *TIGR* (*trabecular meshwork-induced glucocorticoid response*). Neste mesmo ano, Kubota et al. isolaram um clone de cDNA humano que codificava uma proteína de 55 kDa, nomeando o gene que a codificava de *Myocilin* (*MYOC*), devido a sua homologia com a miosina e por estar localizada preferencialmente na raiz e no corpo basal dos cílios de conexão das células fotorreceptoras. Posteriormente, constatou-se que os genes *TIGR* e *MYOC* apresentavam a mesma sequência, passando, portanto, a ser denominado *TIGR/MYOC*. Contudo, atualmente, o gene é designado somente por *Myocilin* (*MYOC*).

Através do método de hibridização *in situ* fluorescente (do inglês, *fluorescent in situ hybridization, FISH*), Kubota et al. (1997) determinaram a localização do gene *MYOC* no cromossomo 1q23-q24. Utilizando também o método de *FISH* para identificar o gene *MYOC* em cromossomos artificiais de levedura, Michels-Rautenstrauss et al. (1998), foram capazes de refinar o mapeamento deste gene para a região 1q24.3-q25.2.

De acordo com os estudos de Nguyen et al., 1998 e Fingert et al., 1998, o gene *MYOC* está presente em uma região genômica de cerca de 20 kb e é composto por três exons cujos tamanhos são 606, 126 e 780 pb, respectivamente, interrompidos pelo íntron 1 de aproximadamente 10 kb e pelo íntron 2 de cerca de 1,5 kb. Os mesmos autores também descreveram que o gene possui 10 sítios putativos de fosforilação e quatro potenciais sítios de glicosilação, além de regiões 5' e 3' não traduzidas e sua região promotora de, aproximadamente, 5 kb. Na região 5' não traduzida encontra-se um TATA *box* e um CAT *box*, sequências repetidas MIR e Alu, além de múltiplos sítios de ligação a hormônios e elementos de resposta à sinalização celular, mas, não apresenta o sítio de ligação à SP1 (Nguyen et al., 1998). Já a região 3' não traduzida apresenta três sequências sinais de poliadenilação (Kong, 2001).

3.2. Expressão do gene *MYOC*

O gene *MYOC* pode ser induzido por glicocorticóides, como a dexametasona, como foi observado por Polansky et al. (1997) e Nguyen et al. (1998). É sabido que o uso de corticoesteróides tópicos e/ou sistêmicos pode levar ao aumento da PIO e posteriormente, ao glaucoma (Skuta & Morgan, 2006). Contudo, a associação entre o aumento da expressão do gene *MYOC* induzido pelos corticoesteróides e o aumento da PIO não está elucidada (Fingert et al., 2001).

Por meio de análises de *Northern blot* de diversos tecidos de humanos adultos, Fingert et al. (1998) observaram altos níveis de mRNA de 2,3 kb em diferentes tecidos, como coração, músculo esquelético, tireóide, traquéia, estômago, medula óssea, timo, próstata, intestino delgado e cólon. Níveis mais baixos do transcrito foram observados no

pulmão, pâncreas, testículos, ovário, medula espinhal, linfonodos e glândula adrenal. Os autores não detectaram o transcrito no cérebro, placenta, fígado, rins, baço ou leucócitos. Outros autores (Kubota et al., 1997; Tomarev et al., 2003; Karali et al., 2000; Swiderski et al., 2000; Rao et al., 2000; Russell et al., 2001) concluíram que a maior abundância do transcrito do gene *MYOC* e da proteína miocilina estava nos tecidos oculares, como íris, corpo ciliar, córnea, malha trabecular, além do humor aquoso.

3.3. Estrutura e função da proteína miocilina

A miocilina foi isolada pela primeira vez por Polansky et al. (1989), que observaram a produção desta três semanas após a exposição da cultura de células da malha trabecular a glicocorticóides. Kubota et al. (1998) sugeriram que a presença de repetições de dinucleotídeos à frente dos elementos de resposta a glicocorticóides no gene *MYOC*, poderiam influenciar a expressão deste gene de acordo com o número de repetições encontradas, como já foi especulado na região promotora do gene interleucina-10 (Eskdale & Gallagher, 1995). Esta suposição ajudaria a explicar a variação de sensibilidade das células da malha trabecular aos esteróides (Vasconcellos, 2001).

A miocilina, uma glicoproteína composta por 504 aminoácidos e expressa com 55 kDa, foi detectada em meios de cultura de diversas linhagens celulares com pesos moleculares de 55 kDa e 57 kDa (Aroca-Aguilar et al., 2005 e Gobeil et al., 2004). Esta diferença pode representar as formas glicosilada e não glicosilada da proteína (Polansky et al., 1997, Jacobson et al., 2001, Caballero et al., 2001, Shepard et al., 2003).

O domínio de *coiled-coil* da miosina-*like* próximo à região N-terminal e o domínio olfactomedina-*like* próximo à região C-terminal são os principais domínios da miocilina. A homologia da miosina com a região N-terminal da miocilina se mostrou

relativamente baixa e com cerca de 25–29% de aminoácidos idênticos à cadeia pesada da miosina de diferentes espécies (Kubota et al., 1997; Ortego et al., 1997). Contudo, a região C-terminal codificada pelo terceiro exon do gene *MYOC* é homóloga à olfactomedina, apresentando identidade quase completa com esta proteína. A olfactomedina foi primeiramente identificada como o componente principal da matriz extracelular do neuroepitélio olfativo de sapos e possui capacidade de polimerizar-se através de pontes dissulfeto entre resíduos de cisteína (Snyder et al., 1991; Yokoe and Anholt, 1993).

O domínio miosina-like, codificado pelo exon 1 do gene *MYOC*, possui uma sequência de peptídeo sinal e um zíper de leucina composto por repetições periódicas de resíduos de arginina e leucina organizados em α -hélice (Ortego et al., 1997). Experimentos de transcrição e tradução *in vitro* na presença e ausência de membranas microsomais indicaram que o peptídeo sinal seria responsável por encaminhar a miocilina para o retículo endoplasmático (Caballero et al., 2000). Já o zíper de leucina, uma estrutura anfipática, pode estar relacionado a interações moleculares (Coca-Prados et al., 1999). De fato, as interações miocilina-miocilina foram descritas ocorrendo principalmente entre os aminoácidos 117–166, região na qual está contido o zíper de leucina (Fautsch & Johnson, 2001). Na região central da proteína, codificada pelo exon 2, não foram descritos domínios estruturais ou funcionais até o momento. O domínio olfactomedina-like, codificado pelo exon 3, contém os resíduos de cisteína 245 e 433 que fazem ligação dissulfeto entre si (Nagy et al., 2003). É importante ressaltar que a grande maioria das mais de 80 mutações do tipo *missense* (quando a troca nucleotídica resulta em troca de aminoácidos) ou *nonsense* (quando a troca nucleotídica modifica o aminoácido para um códon de parada) já descritas nas mais diferentes populações, foi

encontrada no domínio mais conservado da proteína, o domínio olfactomedina-*like* (Hewitt et al., 2008).

Aroca-Aguilar et al. (2005) demonstraram que a miocilina humana selvagem pode sofrer clivagem proteolítica entre os resíduos arg226 e ile227, dando origem a um fragmento de 35 kDa, contendo o domínio olfactomedina-*like* (região C-terminal) e um fragmento de 20 kDa contendo o zíper de leucina (região N-terminal). O fragmento de 35 kDa seria co-secretado com a proteína íntegra e análises por meio de *Western blot* mostraram que o fragmento de 35 kDa estava presente no humor aquoso e em alguns tecidos oculares.

Estudando a relação entre dois genes envolvidos no desenvolvimento do glaucoma, os genes *MYOC* e *OPTN* (*optineurin*), Park et al. (2007) verificaram que a superexpressão do gene *MYOC* não apresentava efeito algum sobre a expressão do gene *OPTN*. Contudo, a superexpressão do gene *OPTN* acabava por induzir o gene *MYOC* em células da malha trabecular humana. Por meio de imunofluorescência, os autores identificaram que a proteína superexpressa (optineurina) localizava-se no citoplasma, prolongando o tempo de *turnover* do mRNA do gene *MYOC*, mas, tendo pequeno efeito sobre a atividade do promotor deste gene. Dessa forma, os autores concluíram que o gene *OPTN* pode atuar na estabilização do mRNA do gene *MYOC*.

Diversos estudos mostraram que a miocilina recombinante, assim como a miocilina encontrada no humor aquoso e no sobrenadante de culturas de células de malha trabecular, formavam agregados de alto peso molecular, provavelmente dímeros e multímeros, que variavam de 120 a 200 kDa ou até mais (Nguyen et al., 1998; Caballero et al., 2000; Russell et al., 2001; Jacobson et al., 2001; Fautsch & Johnson, 2001). Acredita-se que a oligomerização mediada por resíduos de cisteína seja uma

característica das proteínas relacionadas à olfactomedina (Karavanich & Anholt, 1998). Nguyen et al. (1998) sugeriram que o resíduo de cisteína conservado na posição 433, no domínio da olfactomedina-*like* contribuiria para a formação destes agregados de alto peso molecular. Fautsch & Johnson (2001) encontraram evidências de que a formação de ligações dissulfeto inter e/ou intramoleculares podem contribuir para a formação de complexos de miocilina. Neste estudo, foi levantada a hipótese de que dois resíduos de cisteína, nas posições 47 e 61, podem contribuir para a formação destas ligações. Além disso, os autores sugeriram que as interações miocilina-miocilina ocorrem principalmente na região N-terminal, tendo o zíper de leucina papel crítico, já que a substituição de oito resíduos de leucinas por resíduos de glicinas reduziram de forma substancial a capacidade da interação miocilina-miocilina. Os zíperes de leucina dimerizam através de interação eletrostática (hidrofóbica) das cadeias laterais dos resíduos de leucina (Alber, 1992).

Além da interação miocilina-miocilina, há também estudos que revelam a interação da miocilina com outras proteínas, como a flotilina-1 (Joe et al., 2005), a optimedina (Torrado et al., 2002), a hevina-1 (Li et al., 2006), γ -sinucleína (Surgucheva et al., 2005), fibronectina (Peters et al., 2005). Entretanto, o significado biológico e a relevância clínica destas interações com a etiologia do glaucoma permanecem obscuros.

Interações da miocilina com a mitocôndria (Ueda et al., 2000; Wentz-Hunter et al., 2002; Sakai et al., 2007), vesículas exossomais (Stamer et al., 2006; Hoffman et al., 2009) e componentes do citoesqueleto e da matriz extracelular (Ueda et al., 2002 e 2003; Filla et al., 2002; Wentz et al., 2002 e 2004; Tan et al., 2006; Park et al., 2006; Goldwich et al., 2009) já foram reportados, além de interações com moléculas associadas a sinalização celular e metabolismo (Fautsch et al. 2006; Torrado et al., 2002). Entretanto, até hoje, nenhuma função foi claramente estabelecida para a miocilina.

Wiggs & Vollrath (2001) examinando uma paciente com uma deleção de parte da cópia materna do cromossomo 1 que compreendia a região na qual o gene *MYOC* se localiza, observaram que nem ela e nem sua família apresentavam qualquer sintoma que indicasse a presença do glaucoma. Os autores, portanto, concluíram que a haploinsuficiência do gene não estava envolvida no desenvolvimento do GPAA. Contudo, diversas mutações *nonsense* e *missense* no gene *MYOC* já foram associadas ao GPAA adulto e juvenil.

Avaliando camundongos *knockout* em heterozigose e homozigose para o gene *MYOC* (*MYOC +/-* e *MYOC -/-*), Kim et al. (2001) constataram que estes animais eram viáveis, férteis e não apresentavam nenhum fenótipo discernível, além de apresentarem PIO e morfologia ocular normais. Assim, os autores também concluíram que o GPAA não estava relacionado com a haploinsuficiência do gene *MYOC*. Em vez disso, sugeriram que, possivelmente, mutações neste gene agem por ganho de função.

Um modelo de ganho de função da miocilina foi sugerido para o GPAA através de estudos bioquímicos e de biologia celular que mostraram que muitas isoformas mutantes desta proteína não eram secretadas, mas sim acumuladas no retículo endoplasmático de células da malha trabecular na forma de agregados insolúveis de proteínas mal enoveladas (Jacobson et al., 2001; O'Brien et al., 2000; Tamm, 2002; Yam et al., 2007; Zhou & Vollrath, 1999; Joe et al., 2003). Observou-se que este acúmulo de agregados protéicos resulta na morfologia anormal e diminuição da proliferação celular, além de causar estresse ao retículo endoplasmático (RE), que foi observado pela indução da *UPR* (*unfolded protein response*), uma via de estresse evolutivamente conservada que culmina na apoptose, neste caso, das células da malha trabecular (Joe et al., 2003; Carbone et al., 2009). A via de sinalização da *UPR* é ativada pelo estresse do RE, levando

à indução de genes envolvidos na redução da taxa de transcrição e aumento da degradação de proteínas mal enoveladas no RE, através da via da ubiquitina-proteassoma. Quando estas respostas adaptativas não são suficientes para atenuar o estresse do RE, é então induzida a apoptose (Kim et al., 2006). Patologicamente, a morte das células da malha trabecular pode ser um componente crítico para este modelo de ganho de função, já que estas células são essenciais para a regulação homeostática do fluxo do humor aquoso no olho e que a disfunção da malha trabecular pode levar ao aumento da PIO e, posteriormente, ao glaucoma (Liu & Vollrath, 2004).

4. Gene Citocromo P450, família 1, subfamília B, polipeptídeo 1 (*CYP1B1*)

4.1. Mapeamento, identificação e estrutura do gene *CYP1B1*

Sutter et al. (1991), a fim de elucidar os eventos que ocorrem em células humanas em resposta ao tratamento com um potente carcinogênico, o 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina ou somente dioxina (TCDD), utilizaram hibridação diferencial para isolar cinco clones responsivos a TCDD a partir de uma linhagem celular humana de queratinócitos. Os clones identificados foram: *CYP1A1*, inibidor do ativador do plasminogênio-2, um regulador da proteólise da matriz extracelular, interleucina-1p e os clones denominados 1 e 141. O clone 1, que apresentou níveis 50 vezes maiores de mRNA no tratamento com 10 nM de TCDD, foi alvo de estudo de outro trabalho do mesmo grupo de pesquisa. Neste trabalho, Sutter et al. (1994), por meio de mapeamento por *PCR* utilizando iniciadores para a região 3' não-traduzida do clone 1, conseguiram mapear o gene *CYP1B1* no cromossomo 2. Mais tarde, utilizando hibridização *in situ* fluorescente, Tang et al. (1996) foram capazes de refinar o mapeamento do gene para a região 2p22-p21.

Tang et al. (1996) determinaram que, em humanos, o gene *CYP1B1* difere de *CYP1A1* e *CYP1A2*, no número de exons (3 versus 7) e na localização cromossômica (cromossomo 2 versus cromossomo 15). Estes autores também identificaram somente um sítio de iniciação da transcrição e, baseados na análise de sequências nucleotídicas, encontraram, na região promotora, nove motivos responsivos a TCDD de ligação a *enhancer* a 2,5 kb à montante, mas não encontraram um TATA *box* nesta região. O gene *CYP1B1*, com extensão total de 8,6 kb, possui três exons e dois introns, mas sua região codificante compreende somente os exons 2 e 3, já que sua *ORF* (*open reading frame*) está localizada no segundo exon, estendendo-se por 1629 bp (Tang et al., 1996; Stoilov et al. (1997).

4.2. Expressão do gene *CYP1B1*

Sarfarazi (1997) detectou a presença da proteína CYP1B1 em 15 tecidos não-oculares, e também em tecidos oculares humanos, como córnea, corpo ciliar, íris e retina. Diversos estudos mostraram que concentrações do transcrito e da proteína CYP1B1 apresentam-se em maior abundância em olhos de fetos do que em olhos de adultos em seres humanos (Stoilov et al., 1998; Doshi et al., 2006; Tomarev et al., 2003). Esta observação leva à especulação de que a CYP1B1 pode agir no olho metabolizando um importante substrato que desempenha papel chave no desenvolvimento e maturação de tecidos oculares (Doshi et al., 2006).

4.3. Estrutura e função da proteína CYP1B1

As proteínas da superfamília dos citocromos P450 (CYP450) compartilham a presença de um grupo heme e apresentam máxima absorção em 450 nm após ligação com

o monóxido de carbono (CO), características únicas destas proteínas (Hasler et al., 1999). A proteína CYP1B1 humana (com 543 aminoácidos) possui três principais regiões: a N-terminal de ligação à membrana (53 aminoácidos), uma região rica em prolina (10 aminoácidos), denominada *hinge* (dobradiça), e o domínio globular citosólico de 480 aa (Tang et al., 1996; Achary et al., 2006). Algumas regiões estruturais conservadas são compartilhadas por todas as moléculas P450, preferencialmente localizadas na porção C-terminal das proteínas. Dentre elas encontra-se um complexo de quatro hélices (hélices D, I e L e a hélice anti-paralela E), hélices J e K, folhas beta pregueadas 1 e 2, região de ligação ao heme e a região denominada *meander* (volta), precedendo o domínio de ligação ao heme, as quais identificam a estrutura do *core* (núcleo) da proteína. Devido a estas características, Graham-Lorence et al. (1995) sugeriram que a porção C-terminal da molécula (evolutivamente mais conservada) esteja envolvida na ligação do grupamento heme e no dobramento apropriado da molécula.

Segundo Achary et al. (2006), a característica predominante das CYPs é o núcleo estrutural altamente conservado, dividido em domínios *α-rich* (com aproximadamente 14 *α*-hélices) e *β-rich* (com quatro a seis folhas-*β*). Em relação aos aspectos funcionais a estrutura das CYPs também pode ser dividida em: região de ligação ao heme (RLH), região de ligação ao substrato (RLS), canal de acesso ao substrato (CAS), resíduos envolvidos na troca de carga e região de superfície, que se liga à proteína CYP redutase no momento do recebimento de elétrons da mesma (Achary et al, 2006).

O citocromo P450 1B1 (*CYP1B1*) é o único membro da subfamília CYP1B e compartilha 40% de homologia com os dois membros da subfamília CYP1A (*CYP1A1* e *CYP1A2*) (Murray et al., 2001). Os citocromos P450 (CYP) constituem uma superfamília de enzimas heme-tiolases, presentes em muitas espécies, estando envolvidas no

metabolismo de um vasto número de compostos orgânicos, tanto endógenos como exógenos (Guengerich, 2002; Anzenbacher & Anzenbacherova, 2001; Lewis, 2001).

Em mamíferos, os citocromos pertencentes às famílias CYP1, CYP2 e CYP3 parecem ser responsáveis por catalisar a maioria das reações metabólicas de fase 1 de xenobióticos e, em humanos, pouco mais de 10% de todas as reações de oxidação de drogas mediadas por citocromos P450 parecem ser dependentes de proteínas da família CYP1 (Guengerich, 2002; Rendic & DiCarlo, 1997). Sutter et al. (1994) notaram que a CYP1B1 era responsável pela fase 1 do metabolismo de uma ampla gama de substratos estruturalmente diversos, através da inserção de um átomo de oxigênio na molécula substrato, criando, dessa forma, um novo grupamento funcional, como -OH, -NH₂ e -COOH.

A proteína CYP1B1 apresenta a mais alta atividade catalítica para diversos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, que são os mais potentes indutores dos cânceres de mama e pulmão (Shimada et al., 1996). Além dos compostos exógenos, a CYP1B1 também está envolvida no metabolismo de esteroides endógenos, como o 17 β estradiol, realizando a 4-hidroxilação desta molécula (Rendic & DiCarlo, 1997). Um aumento significativo na expressão do gene *CYP1B1*, com aumento da produção de 4-hidroxi estradiol, foi encontrado em vários tecidos tumorais, como mama, útero, próstata e pulmões (Kaur et al., 2011).

Com o intuito de investigar a relação do gene *CYP1B1* com o GCP, um camundongo *knockout* (*CYP1B1* *-/-*) foi desenvolvido através da disrupção do gene alvo em células-tronco embrionárias. Contudo, um exame macroscópico dos olhos deste camundongo não mostrou evidências de glaucoma ou qualquer anormalidade que sugerisse que o gene *CYP1B1* fosse necessário para o desenvolvimento de mamíferos

(Buters et al., 1999). Os camundongos *CYP1B1* *-/-* criados de forma similar por Libby e colaboradores (2003) também não mostraram nenhuma anormalidade ao exame macroscópico, além de apresentarem níveis de PIO indistinguíveis dos apresentados pelos camundongos selvagens. Contudo, análises histológicas e de microscopia eletrônica revelaram anormalidades nos olhos dos camundongos *CYP1B1* *-/-* como um pequeno ou inexistente canal de Schlemm, lâmina basal que se estende da córnea sobre a malha trabecular e anexos da íris até a malha trabecular e a córnea periférica. Estas observações indicam que, embora o camundongo *knockout* para o gene *CYP1B1* não apresentasse características clássicas do GCP, as anormalidades de ângulo da câmara anterior indicam o possível envolvimento do gene *CYP1B1* no desenvolvimento destas estruturas oculares (Libby et al., 2003).

5. Justificativa

O glaucoma é a maior causa de cegueira irreversível do mundo e para o ano de 2020, foi estimado que aproximadamente 80 milhões de pessoas serão afetadas pela doença (Quigley & Broman, 2006). O glaucoma primário de ângulo aberto é o tipo mais comum da doença e o GPAA-J uma forma grave de glaucoma, necessitando frequentemente de procedimento cirúrgico para seu controle. Recentemente foram identificados genes relacionados ao GPAA, como o *MYOC*, *WDR36* e *OPTN*. Estudos envolvendo famílias com GPAA e GPAA-J e mutações no gene *MYOC* mostraram fortes indicativos, em diversas populações, da associação do desenvolvimento da doença com mutações neste gene. Mutações no gene *CYP1B1*, apesar de serem comumente associadas ao glaucoma congênito primário, foram também descritas em pacientes com GPAA e GPAA-J. Alguns pacientes apresentam uma etiologia digênica da doença, sendo

portadores de mutação em ambos os genes: *CYP11B1* e *MYOC*. A combinação de mutações nestes genes parece estar relacionada a uma instalação mais precoce da doença. Porém as bases moleculares desta interação ainda permanecem desconhecidas.

O glaucoma é dificilmente detectado precocemente, por ser assintomático em sua fase inicial, durante a qual o tratamento previne perdas definitivas da função visual. Desta forma, a identificação de grupos de risco baseada em aspectos genéticos é importante para auxiliar no diagnóstico precoce e estabelecer um seguimento clínico mais adequado para este grupo de pacientes, além de melhorar a compreensão da fisiopatologia desta afecção ocular.

OBJETIVOS

Gerais

Analisar alterações nas sequências dos genes *MYOC* e *CYP1B1* e o fenótipo possivelmente relacionado a tais alterações, em portadores de GPAA e GPAA-J, para melhor compreender o papel destes genes no desenvolvimento destes tipos de glaucoma na população brasileira.

Específicos

1. Em famílias portadoras de GPAA ou GPAA-J e mutações no gene *MYOC* avaliar-se-á a correlação genótipo/fenótipo.

2. De acordo com as análises feitas para o gene *MYOC*, também será verificada a possível modulação do fenótipo da doença pelo gene *CYP1B1* nas famílias com GPAA ou GPAA-J.

3. Serão investigadas as sequências codificantes dos genes *CYP1B1* e *MYOC* em pacientes esporádicos portadores de GPAA-J, com o intuito de melhorar o conhecimento sobre o perfil de mutações no gene *MYOC* na população brasileira portadora deste tipo de glaucoma e determinar a ocorrência e os tipos de mutações no gene *CYP1B1* e sua relação com a etiologia da doença nesses pacientes.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

1. Casuística

O recrutamento de pacientes portadores de GPAA e GPAA-J foi realizado no Serviço de Glaucoma do Ambulatório de Oftalmologia do Hospital das Clínicas da UNICAMP. Para esta pesquisa, quatro famílias portadoras de GPAA ou de GPAA-J (figuras 3, 4, 5 e 6) foram selecionadas, perfazendo um total de 102 indivíduos. Estas famílias são provenientes dos estados de São Paulo e Paraná e foram incluídas no estudo após avaliação dos probandos e constatação da presença de mutação no gene *MYOC*.

Além das famílias, 51 pacientes não relacionados, com GPAA-J, foram avaliados oftalmologicamente, tiveram a amostra de sangue coletada e foram estudados em relação à presença de alterações nos genes *MYOC* e *CYP11B1*.

O protocolo de pesquisa segue os princípios enunciados na Declaração de Helsinque, assim como as determinações do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP. Os pacientes selecionados para o estudo foram informados sobre os objetivos e métodos da pesquisa, podendo ou não aceitar participar da mesma, sem constrangimento ou modificação de sua assistência médica. O projeto possui aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

1.1. Heredogramas

Os heredogramas das quatro famílias avaliadas neste estudo estão apresentados nas figuras 3 a 6. Somente os números correspondentes aos indivíduos incluídos no estudo estão apresentados nos heredogramas, tendo sido suprimidos os números correspondentes aos membros das famílias que não fizeram parte das análises.

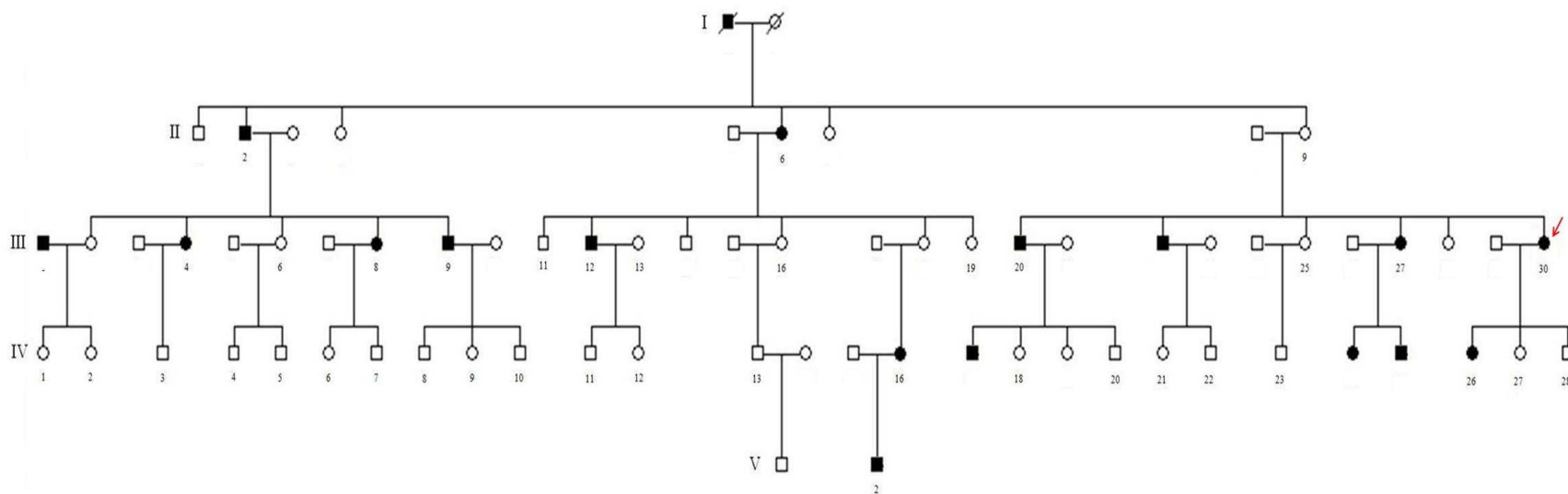


Figura 3. Heredograma da família I, com 39 indivíduos avaliados.

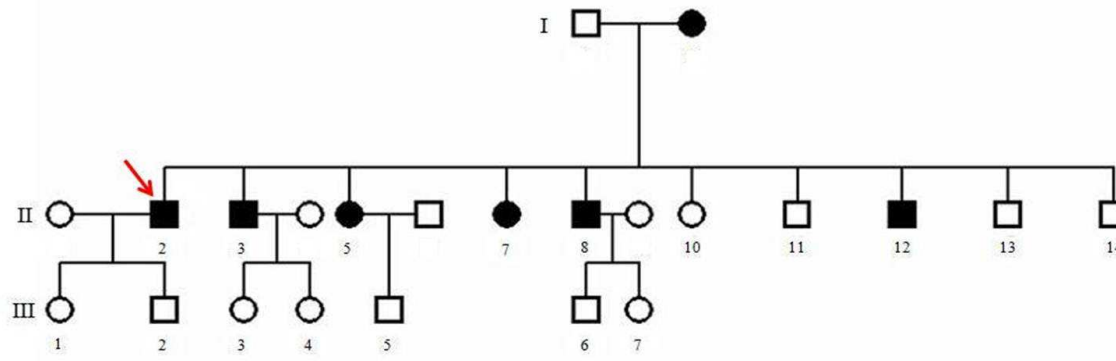


Figura 4. Heredograma da família II, da qual 17 indivíduos foram incluídos na pesquisa.

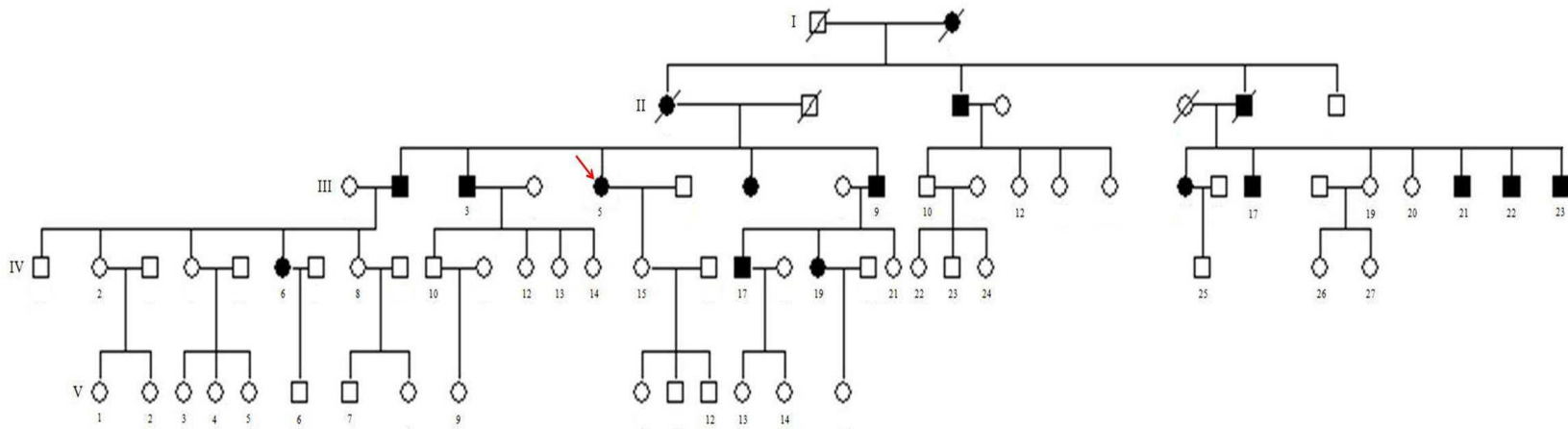


Figura 5. Heredograma da família III, com 39 indivíduos estudados.

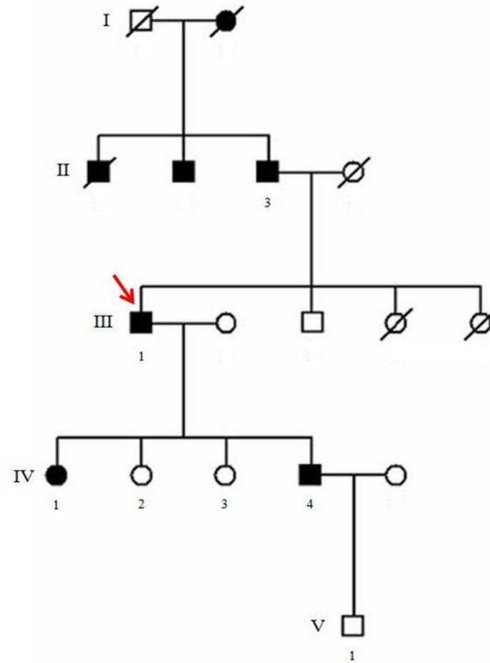


Figura 6. Heredograma da família IV, da qual sete indivíduos foram avaliados.

1.2. Critérios de inclusão

Foram incluídos os indivíduos com as seguintes características: 1. ângulo aberto à gonioscopia, 2. alteração glaucomatosa do disco óptico, incluindo: redução localizada da rima neural; aumento vertical da escavação; hemorragia e assimetria de escavação maior ou igual a 0,2 segundo avaliação oftalmológica sob visão binocular, 3. lesão glaucomatosa do disco óptico acompanhada por perda de campo visual correspondente na perimetria computadorizada acromática, 4. idade de diagnóstico inferior a 35 anos para GPAA-J e igual ou superior a 35 anos para GPAA.

1.3. Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo, pacientes que apresentaram alterações de segmento anterior compatíveis com glaucomas secundários (ou de desenvolvimento), trauma

ocular prévio, história de uso de corticoesteróide tópico e/ou sistêmico, além daqueles, no caso dos indivíduos com GPAA-J, que apresentaram parentesco com paciente já incluído no estudo.

1.4. Grupo controle

O grupo controle foi constituído por 60 indivíduos atendidos nos setores de oftalmologia do Hospital das Clínicas da UNICAMP que não apresentaram nenhuma forma de glaucoma, além de ausência de antecedente familiar com glaucoma ou cegueira ocular de causa desconhecida, PIOs menores do que 15 mmHg, escavações dos discos ópticos menores do que 0,4 e idade superior a 50 anos.

2. Métodos

2.1. Exames oftalmológicos

Todos os exames oftalmológicos foram realizados pelo médico oftalmologista Dr. José Paulo Cabral de Vasconcellos, no Ambulatório de Glaucoma do Hospital das Clínicas da UNICAMP.

2.1.1. Tonometria (medida da pressão intra-ocular) e paquimetria (medida da espessura da córnea)

A tonometria de aplanção de Goldmann (TAG) é o exame utilizado na prática clínica diária e nos ensaios clínicos. É baseada no princípio de Imbert-Fick que define a pressão no interior de uma esfera de paredes infinitamente finas como a força necessária para aplanar sua superfície dividida pela área de aplanção. A TAG é influenciada por variáveis do tecido corneal, como sua curvatura, espessura e astigmatismo. Em córneas com astigmatismo acima de 3 dioptrias as medidas com o tonômetro de Goldmann

podem ser imprecisas e a PIO torna-se hipoestimada em córneas relativamente finas, bem como falsamente superestimadas nas córneas mais espessas. Neste contexto, a paquimetria assume grande importância nos pacientes com hipertensão ocular para se avaliar o risco de desenvolvimento de glaucoma e evitar o tratamento desnecessário em pacientes com baixo risco. A determinação da espessura da córnea é importante também naqueles pacientes com tecidos mais finos e cuja medida da PIO pela TAG é subestimada. Pacientes que apresentam sinais de progressão da doença e PIO aparentemente normal ou controlada podem, na verdade, ser pacientes com córneas finas que tem valores de PIO subestimados pela TAG. Embora não exista um nomograma absolutamente preciso para se corrigir as medidas da PIO pela TAG em função do desvio da espessura da córnea do seu valor médio, a incorporação da paquimetria na semiologia do glaucoma auxilia o raciocínio clínico e ajuda a quantificar a diminuição relativa da PIO em casos específicos (Kasahara, 2009).

Os valores de PIO inferiores a 21 mmHg são considerados normais, sendo os pacientes hipertensos oculares (HO) aqueles que apresentam valores de PIO iguais ou superiores a este valor.

2.1.2. Gonioscopia: avaliação do ângulo

A gonioscopia é o exame que avalia a amplitude e as características do seio camerular, ou seja, o ângulo formado entre a face anterior da íris e o endotélio da córnea. Nesta região do olho encontram-se as estruturas que formam o sistema de drenagem do humor aquoso. O exame gonioscópico é fundamental para diferenciar os glaucomas de ângulo aberto dos glaucomas de ângulo estreito. Os tecidos observáveis à gonioscopia em um seio camerular aberto e normal são a linha de Schwalbe, o trabeculado

pigmentado, o esporão escleral, a sombra do músculo ciliar e a raiz da íris (Allingham et al., 2005).

O exame deve ser realizado com lentes específicas para gonioscopia, pois os raios luminosos provenientes do ângulo da câmara anterior são refletidos internamente por excederem o ângulo crítico da interface corneal de 46° (Allingham et al., 2005). Neste estudo, a gonioscopia foi realizada com lente de Posner de 4 espelhos (Ocular Instruments, Bellevue, WA, EUA).

2.1.3. Fundoscopia: avaliação do disco óptico (relação escavação/disco)

Os axônios das células ganglionares da retina são as primeiras estruturas oculares a sofrer o dano glaucomatoso. Entretanto, muitos pacientes podem ser diagnosticados pela observação cuidadosa do disco óptico, sem a confirmação do correspondente dano funcional (glaucoma pré-perimétrico). Por isso, é importante o estudo detalhado do disco óptico, avaliando sua anatomia e variações não glaucomatosas que podem diferenciar do padrão normal.

A documentação das características do disco óptico ao longo do tempo é muito importante. Os sinais característicos observados na fundoscopia e já descritos na literatura incluem: assimetria de escavação entre ambos os olhos, atrofia setorial da camada de fibras nervosas da retina (sinal de Hoyt), defeito localizado da rima neural (*notch*), aumento concêntrico da escavação, aumento vertical da escavação, discrepância palidez-escavação (escavação pintada de rosa), escavação nasal, desnudamento de vaso circunlinear, vaso em passarela, vaso em baioneta e hemorragia do disco (Caprioli, 2003). Muitos destes sinais são, por si sós, suficientes para o diagnóstico da neuropatia óptica glaucomatosa.

Os valores da relação entre o tamanho da escavação e o tamanho total do disco óptico (relação escavação/disco) variam de 0 a 1. Em pacientes normais, em geral, este valor pode estar entre 0 e 0,8. Os valores iguais ou superiores a 0,7 são os mais frequentes no glaucoma, contudo valores superiores a 0,5 já devem ser investigados. Caso a assimetria da relação escavação/disco entre os olhos de um mesmo indivíduo seja superior a 0,2, esta também representa um indicativo da presença de glaucoma.

Neste estudo, a fundoscopia foi realizada com a lente de Volk de 78 dioptrias (Volk Incorporation, Mentor, OH, EUA).

2.2. Coleta de amostras de sangue periférico

Foram colhidos de 6 a 18 mL de sangue periférico em frasco estéril VACUETTE® de 6 mL, contendo 10,8 mg do anticoagulante etilenodiaminotetracetato dissódico.2H₂O (EDTA) 0,5M pH 8,0 (Greiner Bio-One Brasil, Americana, SP, Brasil), de todos os indivíduos incluídos no estudo para extração de DNA genômico.

2.3. Extração de DNA genômico

A extração de DNA genômico foi realizada a partir de sangue periférico utilizando a metodologia de fenol/clorofórmio (Sambrook et al., 1989), lise das células com proteinase K (Invitrogen, Calrsbad, CA, EUA) e precipitação do DNA em etanol absoluto.

Os tubos com as amostras de sangue foram centrifugados por 10 minutos a 2500 rpm para separação do plasma, leucócitos e hemácias. Os leucócitos (camada intermediária entre o plasma e as hemácias) foram removidos com pipeta Pasteur (de plástico descartável) e transferidos para um tubo de polipropileno de 15 mL. A este tubo

foi adicionado tampão RSB 1X (Tris-HCl 5 mM pH 7,6; KCl 15mM; MgCl 10 mM) até completar o volume final de 11 mL. Assim, foram adicionados 60 µL de NONIDET – P40 (Affymetrix/USB products, Cleveland, OH, EUA) e as amostras foram homogeneizadas por 10 minutos, seguido de centrifugação a 2500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o pellet foi ressuspenso em 0,5 mL de tampão RSB 1X. Para a lise dos eritrócitos, adicionou-se 3 mL de solução A seguida de homogeneização. Posteriormente, foram adicionados 80 µL de proteinase K (numa concentração final de 100 µL/mL), seguida de incubação por aproximadamente 18 horas à 37°C. Adicionaram-se 3,0 mL de fenol saturado e realizou-se homogeneização por 10 minutos, e posterior centrifugação a 2500 rpm por 10 minutos. A fase aquosa (porção superior da mistura) foi transferida para outro tubo falcon, com pipeta Pasteur descartável e a porção inferior foi descartada. Adicionou-se com solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1, v:v:v) seguindo de homogeneização por 10 minutos e posterior centrifugação a 2500 rpm por 10 minutos. A porção inferior do tubo foi removida e descartada com pipeta Pasteur descartável. Adicionou-se 3,0 mL de álcool isoamílico:clorofórmio (24:1, v:v), repetindo a homogeneização por 10 minutos e centrifugação a 2500 rpm por 10 minutos. A porção inferior do tubo foi removida por completo. Para precipitação do DNA, foram adicionados 6,0 mL de etanol absoluto gelado seguido de agitação leve. O DNA foi recuperado com haste de vidro esterilizada e ressuspenso em 200 a 250 µL de TE 1X (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0).

Solução A

[] final

RSB	1X
NaCl	0,4 M
SDS	0,5 %
EDTA	20 mM
H ₂ O q.s.p.	500,0 mL

2.4. Quantificação e verificação da integridade do DNA genômico

A quantificação do DNA extraído foi obtida por leitura de absorbância óptica a 260 nm em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA). Água destilada foi utilizada como amostra referência (branco) para calibrar o aparelho e 1 µL da amostra de DNA foi utilizado para análise.

A verificação da integridade do DNA genômico extraído foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose 1,0%, com 2,0% de brometo de etídio, em TBE 1X, preparado segundo protocolo descrito por Sambrook et al. (1989).

A amostra foi aplicada no gel juntamente com tampão de corrida (0,25% de azul de bromofenol; 50% glicose) na razão de 3:1. As condições de eletroforese variaram entre 90 e 110 V. O marcador de peso molecular utilizado foi o DNA ladder de 100 pb (Invitrogen Corporation, Calrsbad, CA, EUA), em concentração de 0,15 µg/µL. Após a eletroforese, o gel foi visualizado e fotografado em transluminador de luz ultravioleta com câmera integrada (Molecular Imaging, L-PIX, Loccus Biotecnologia, São Paulo, SP, Brasil).

2.5. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As regiões codificantes e regiões intron-exon dos genes *MYOC* e *CYP11B1* foram amplificadas através da reação em cadeia da polimerase. Para todas as regiões de ambos os genes, a PCR foi preparada com 40 a 100 ng de DNA genômico, 20 pmoles dos iniciadores direto e reverso, 200 pmoles de cada didesoxinucleotídeo (dNTP), tampão da enzima 1X (Tampão 10X: Tris-HCl 200 mM pH 8,4; KCl 500 mM), 0,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen TM Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), dimetilsulfóxido (DMSO) 10% (v:v) somente para as regiões 1 e 2 do gene *CYP11B1* e a água ultrapura para completar o volume final de 25 µL.

As amostras foram amplificadas em aparelhos termocicladores *MasterCycler EP Gradient S* (Eppendorf, Hamburg, Germany) e *Veriti 96-Well Thermal Cycler* (Applied Biosystem-Applera Corporation, Foster City, CA, EUA). As condições de amplificação foram as mesmas para todas as regiões gênicas, exceto para as temperaturas de anelamento, especificadas na tabelas II e III: desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos a 95 °C por 1 minuto, anelamento dos iniciadores em temperaturas específicas para cada região por 45 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto e 30 segundos, finalizando com extensão adicional a 72 °C por 7 minutos.

2.5.1. Amplificação dos fragmentos do gene *MYOC*

Os DNAs extraídos a partir de amostras de sangue periférico dos pacientes com diagnóstico de GPAA-J foram submetidos à reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se os iniciadores escolhidos com base na sequência do gene *MYOC* depositada no *GenBank* (ref. MIM *601652). As três regiões codificadoras do gene (exons 1, 2 e 3) foram amplificadas e os produtos da reação submetidos à eletroforese em gel de agarose

1,5%. Na tabela II estão descritas as sequências dos iniciadores e respectivas temperaturas de anelamento utilizadas na PCR.

Tabela II. Iniciadores direto (D) e reverso (R) do gene *MYOC* utilizados nas reações de PCR e sequenciamento direto e suas respectivas temperaturas de anelamento.

Exon	Sequência do iniciador (5' - 3')	Temperatura de Anelamento (°C)
1	1(D) – GGTGCATAAATTGGGATGTTC	61,5
1	1(R) – TTGTGCTAGCTGTGCAGTCTC	61,5
2	2(D) – AACATAGTCAATCCTTGGGCC	61,0
2	2(R) – GAGAGTTCTGTTCTCTCTCCTC	61,0
3	3a(D) – GATTTGTCTCCAGGGCTGTC	65,0
3	3a(R) – GCTTGGAGGCTTTTCACATC	65,0
3	3b(D) – TCTGTGGCACCTTGACACC	61,5
3	3b(R) – CCACCTTTAACATCCTGCAATC	61,5

2.5.2. Amplificação dos fragmentos do gene *CYP1B1*

Os DNAs extraídos dos membros das famílias com GPAA e GPAA-J foram submetidos à reação de PCR utilizando os iniciadores escolhidos baseados na sequência do gene *CYP1B1* depositada no *GenBank* (ref. MIM *601771) e os produtos da reação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5 %, sendo os alvos dos iniciadores as duas regiões codificadoras do gene (exons 2 e 3). Na tabela III estão descritas as sequências dos iniciadores e respectivas temperaturas de anelamento utilizadas na PCR.

Tabela III. Iniciadores direto (D) e reverso (R) do gene *CYP11B1* utilizados nas reações de PCR e sequenciamento direto e suas respectivas temperaturas de anelamento.

Exon	Sequência do iniciadores (5' - 3')	Temperatura de Anelamento (°C)
2	2a(D) – TCTCCAGAGAGTCAGCTCCG	61,0
2	2a(R) – GGGTCGTCGTGGCTGTAG	61,0
2	2b(D) – ATGGCTTTCGGCCACTACT	58,0
2	2b(R) – GATCTTGGTTTTGAGGGGTG	58,0
3	3(D) – TCCCAGAAATATTAATTTAGTCACTG	61,0
3	3(R) – TATGGAGCACACCTCACCTG	61,0

2.6. Reação de sequenciamento

Os produtos das PCRs de ambos os genes estudados foram purificados utilizando ExoSAP-IT[®] (Affymetrix, USB Products, EUA), de acordo com recomendações do fabricante. Após a purificação as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro para, então, serem sequenciadas.

As reações de sequenciamento foram realizadas com os mesmos iniciadores das PCRs, segundo o método de Sanger et al. (1975), utilizando o kit *ABI PRISM Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystem-Applera Corporation, Foster City, CA, EUA).

Reagentes para a reação de sequenciamento

Produto da PCR purificado	40 - 80 ηg
Tampão Big Dye 5x (fornecido pelo fabricante)	2 μl
Big Dye (fornecido pelo fabricante)	2 μl
Iniciador direto ou reverso (5 pmol/μl)	1 μl
H ₂ O ultra-pura	q.s.p. 10 μl

Ciclo geral da reação de sequenciamento

96 °C – 1 minuto
96 °C – 10 segundos
57 °C – 5 segundos
60°C – 4 minutos

} 30 ciclos

Após a reação de sequenciamento as amostras foram precipitadas com 80 µl de etanol 80% e centrifugadas a 4000 rpm por 45 minutos. O sobrenadante foi descartado, seguido da adição de 150 µl de etanol 70%. Uma nova centrifugação foi realizada com as amostras, desta vez por 10 minutos a 4000 rpm. Para finalizar, o sobrenadante foi descartado e as amostras foram secadas em termociclador por 3 minutos a 64 °C e armazenadas a -20 °C. O produto da reação de sequenciamento purificado foi ressuspenso em 10 µl de Formamida *Hi-Di* (Applied Biosystem-Applera Corporation, Foster City, CA, EUA), sendo em seguida vigorosamente agitado e posteriormente desnaturado a 94 °C por 5 minutos. As leituras das sequências de bases nitrogenadas dos fragmentos foram realizadas em sequenciador automático *ABI PRISM 3700* ou *ABI PRISM 3130 DNA Analyzers* (Applied Biosystem-Applera Corporation, Foster City, CA, EUA).

As sequências obtidas foram analisadas com o auxílio do programa FinchTV (Geospiza) e comparadas com as sequências normais dos genes (NM_000261.1 para o gene *MYOC* e NM_000104.3 para o gene *CYP11B1*) por meio do BLAST no servidor NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

2.7. Correlação genótipo/fenótipo – Gene *MYOC*

Nas famílias com GPAA e GPAA-J, foi associado o genótipo, quanto à existência ou não de mutação no gene *MYOC*, com o fenótipo clínico apresentado pelos pacientes. Há a possibilidade da ocorrência de duas situações. Na primeira, alguns pacientes podem apresentar uma correlação positiva entre genótipo e fenótipo, ou seja, uma penetrância completa, na qual todos os indivíduos que apresentam a mutação no gene *MYOC* desenvolvem a doença a partir de determinada idade e apresentam características clínicas semelhantes, e aqueles que não são portadores da mutação, não desenvolvem a doença. Em uma segunda situação, alguns indivíduos podem apresentar uma penetrância incompleta, situação na qual os pacientes portadores da mutação no gene *MYOC* não obrigatoriamente desenvolvem a doença ou a desenvolvem em faixas etárias distintas, podendo apresentar sintomas diferentes entre os indivíduos glaucomatosos de uma mesma família. Neste último caso, será avaliada a possível ação moduladora do gene *CYP1B1* sobre o gene *MYOC*, por meio da correlação genótipo/fenótipo do gene *CYP1B1* nos pacientes com glaucoma.

2.8. Correlação genótipo/fenótipo – Gene *CYP1B1*

Após sequenciamento do gene *CYP1B1*, os indivíduos foram submetidos à análise de correlação entre o genótipo, ou seja, presença ou não da mutação neste gene, com o fenótipo, sendo consideradas as características clínicas relacionadas ao glaucoma, conforme citado anteriormente para o gene *MYOC*. Assim, nas famílias cuja penetrância do gene *MYOC* se mostrou incompleta para a doença e foram observadas alterações no gene *CYP1B1*, foi verificado o possível envolvimento do gene *CYP1B1* na modulação do fenótipo da doença, por meio da correlação genótipo/fenótipo.

2.9. Estudo *in silico*

Para verificar quão conservada é a região protéica onde foi detectada uma mutação que consiste na inserção de dois aminoácidos, a sequência da miocilina humana normal foi comparada com proteínas correspondentes de alguns mamíferos (Bairoch et al., 2005), sendo: camundongo, rato, cachorro, boi, ovelha e porco, utilizando o programa de alinhamento múltiplo de sequências ClustalW (<http://align.genome.jp/>, acesso livre) (Thompson et al., 1994).

Para a avaliação estrutural da alteração, foi realizada modelagem molecular da miocilina humana normal e mutada a partir da estrutura 3D resolvida de DDAH (dimetilamino-hidrolase dimetilarginina) de *Pseudomonas aeruginosa* (PDB-ID 1H70) (Murray-Rust et al., 2001), através do software MODELLER 8v2® (<http://salilab.org/modeller/>, acesso livre) (Sali & Blundell, 1993). Foram construídos modelos, que foram avaliados pelos métodos computacionais Procheck® (Laskowski et al., 1993) e gráfico Ramachandran® (Branden & Tooze, 1999), onde cada modelo foi comparado com a estrutura de referência e o melhor modelo foi selecionado para a análise. A visualização e a análise de contatos internos das estruturas foram realizadas através da interface gráfica gerada pelo programa de acesso livre STING Millennium (suíte BlueStar STING, www.cnptia.embrapa.br) (Neshich et al., 2003).

2.10. Análise dos resultados

Foi avaliada a associação da presença da mutação com a presença da doença, através do teste exato de Fisher. Também foi avaliado o genótipo, tanto com relação a variantes no gene *MYOC* quanto no gene *CYP1B1*, em relação aos seguintes aspectos clínicos (correlação genótipo/fenótipo): realização ou não de cirurgias, pressão

intraocular máxima e relação escavação/disco. Para esta análise, utilizamos o teste T de Student não pareado. Foram considerados estatisticamente significantes valores de P inferiores a 0,05.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Análises de mutações no gene *MYOC*

Foram avaliadas quatro famílias com GPAA e GPAA-J, com fenótipo misto entre uma doença e outra, considerando-se a idade de instalação da doença dos membros das famílias; com exceção da família IV, na qual todos os afetados apresentam GPAA-J, pois a idade de instalação da doença é inferior a 35 anos de idade. Com a observação dos heredogramas destas famílias (figuras 3, 4, 5, 6), é possível notar que elas apresentam segregação autossômica dominante, apesar do GPAA ser reportado, em geral, como uma doença complexa.

Em três dessas famílias, houve recorrência da mutação C433R, já descrita na população brasileira, que leva à troca de bases T>C na posição 1297, acarretando na mudança do aminoácido cisteína para uma arginina (Vasconcellos et al., 2000). Esta mutação foi associada a PIOs elevadas e necessidade frequente de procedimento cirúrgico para controle da doença (Vasconcellos et al., 2003). Na quarta família pertencente ao estudo, uma nova mutação (Figura 7), segregando com a doença em quatro indivíduos (II-3, III-1, IV-1 e IV-4) de três gerações e ausente em 60 indivíduos controle analisados, foi observada no exon 3 do gene *MYOC*. Trata-se de uma inserção de seis pares de bases (CCCAGA) entre as bases 1187 e 1188 (c.1187_1188insCCCAGA).

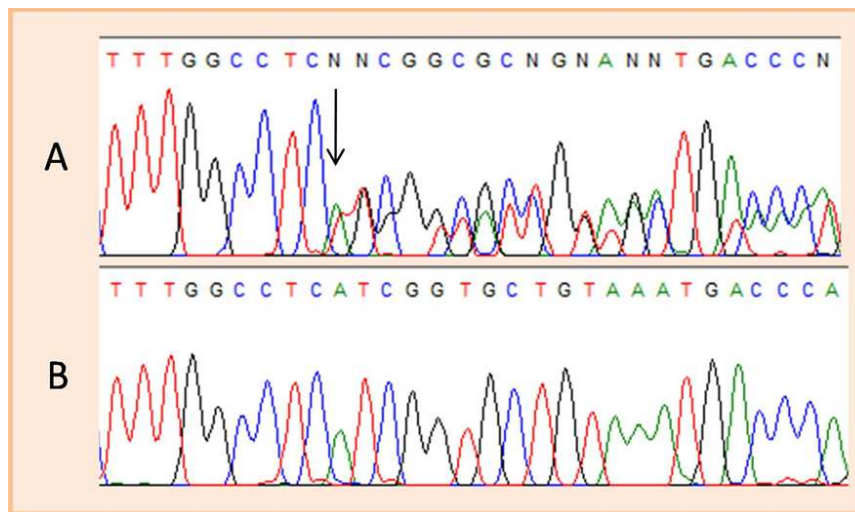


Figura 7. Eletroferograma do sequenciamento do terceiro exon do gene *MYOC* do paciente afetado (A), mostrando a mutação em heterozigose (c.1187_1188insCCCAGA), e do paciente não afetado (B). A seta indica a localização da inserção.

Esta inserção leva à inclusão de dois aminoácidos, um ácido aspártico e uma prolina, no domínio da olfactomedina da proteína codificada pelo gene *MYOC*, a miocilina. De acordo com análises *in silico* utilizando o programa de predição de estrutura secundária PSIPRED v2.6, embora esta inserção não tenha truncado a proteína, ela ocorre depois de uma folha beta e dentro de um sítio de fosforilação de caseína quinase II. No alinhamento múltiplo de sequências da miocilina humana com proteínas de outros mamíferos pelo ClustalW (<http://align.genome.jp/>), os resíduos D395 e E396 não apresentam-se altamente conservados, porém estão localizados em uma região bastante conservada (Figura 8).

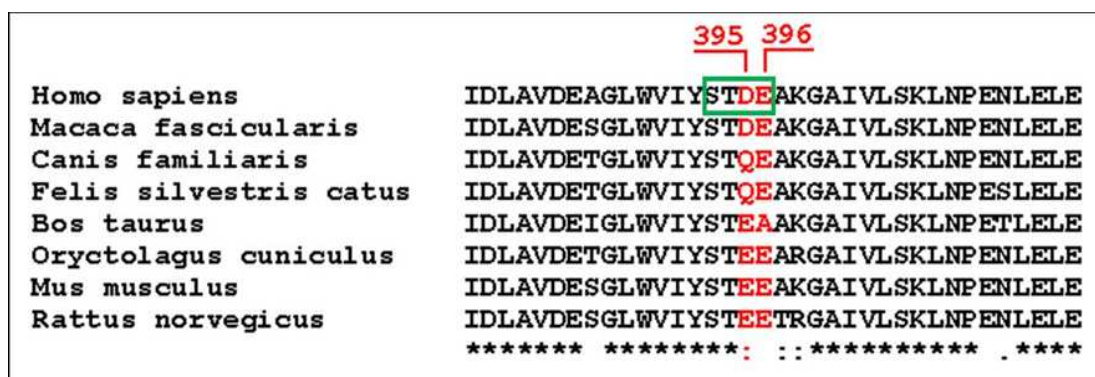


Figura 8. Alinhamento múltiplo de aminoácidos de proteínas da família das olfactomedinas, demonstrando que os resíduos D395 e E396 não são bem conservados entre as espécies. A caixa verde indica um dos sítios de fosforilação de caseína quinase II presentes na miocilina.

Contudo, na comparação de contatos internos, várias alterações podem ser observadas na presença da mutação (Figura 9). Os modelos da miocilina humana normal e mutante foram construídos utilizando a estrutura 3D resolvida da dimetilamino-hidrolase dimetilarginina (do inglês, *dimethylarginine dimethylaminohydrolase* – DDAH) de *Pseudomonas aeruginosa* (PDB-ID 1H70). Para a modelagem molecular foi utilizado o programa MODELLER® 9v2. Os métodos de avaliação Procheck® e Ramachandran® foram utilizados para comparar cada modelo com a estrutura de referência. As figuras dos modelos foram avaliadas e editadas pelo programa Millennium STING (CNPTIA-Embrapa, Brasil).

Estas análises indicam fortemente que a inserção c.1187_1188insCCCAGA, provavelmente, está envolvida na etiologia do GPAA-J nesta família. A sua localização, próxima a regiões conservadas do domínio *olfactomedina-like* preditas como folhas beta, pode comprometer a estrutura secundária e, portanto, o enovelamento adequado deste domínio, bem como alterar a afinidade da miocilina por seus ligantes extracelulares. Contudo, estudos funcionais seriam necessários para revelar a verdadeira ação da proteína alterada na fisiopatologia do glaucoma nesta família.

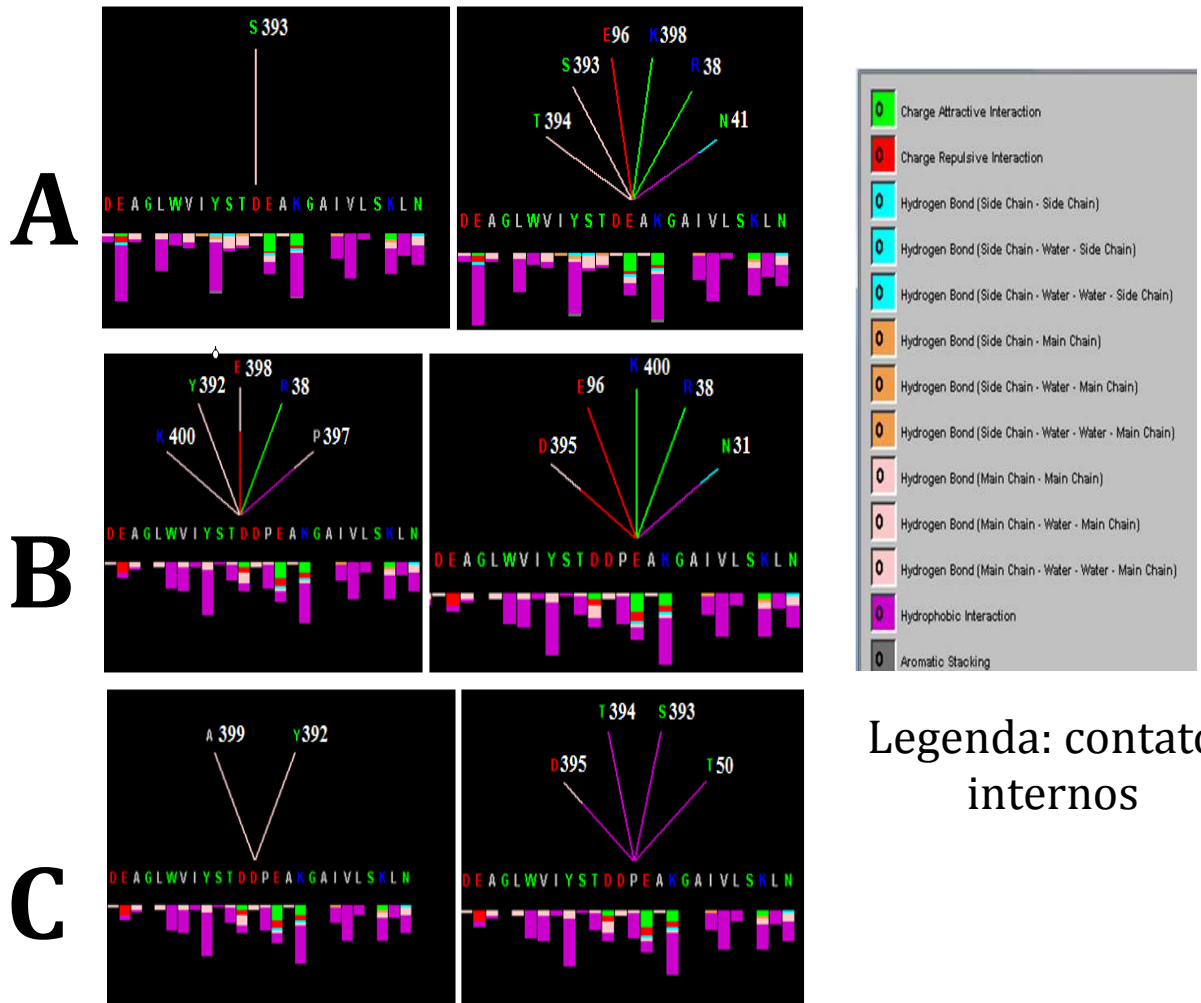


Figura 9. Gráfico de contatos internos da miocilina gerado pelo programa STING Millennium. **A. Sequência normal:** o resíduo D395 interage com o S393 por ligação de hidrogênio na cadeia principal. E396 interage com diferentes aminoácidos: T394 e S393 por ligação de hidrogênio na cadeia principal; E96 por interação repulsiva; K398 e R38 por interação atrativa; N41 por ligação de hidrogênio na cadeia lateral e ligação hidrofóbica. **B. Sequência mutante:** foram observadas alterações de contato relevantes em D395 e E398. A inserção de D396 e P397 permitiu que D395 e E398 criassem muitos contatos internos, sugerindo que estas mudanças podem também causar relevantes mudanças estruturais na proteína. **C. Resíduos inseridos:** a inserção dos resíduos D396 e P397 leva à criação de novos contatos internos na proteína em uma região bastante conservada. D396 estabelece duas fortes interações com A399 e Y392. O resíduo hidrofóbico P397 estabelece interações hidrofóbicas com T394, S393, T50 e D395.

Nos 51 casos de GPAA-J, foram encontrados polimorfismos e mutações já anteriormente descritos na literatura, e suas frequências alélicas estão apresentadas nas

tabelas IV e V. O polimorfismo P13P foi observado em heterozigose em um indivíduo. Este polimorfismo, já descrito anteriormente em outras populações, sendo encontrado em frequências similares entre casos e controles (Fingert et al., 1999), leva à troca de bases T>G na posição 39, não havendo mudança de aminoácido. Outro polimorfismo, uma troca nucleotídica na posição 227 (G>A), que leva à troca de uma arginina por uma lisina no resíduo 76 (R76K), foi observado em heterozigose em quatro indivíduos. Este polimorfismo, apesar de levar à troca de aminoácidos, foi reportado como neutro em diversas populações (Stoilova et al., 1998; Willoughby et al., 2004; Krawczynski et al., 2004; Weisschuh et al., 2005; Bayat et al., 2008). Em apenas um dos indivíduos foi detectado o polimorfismo neutro G122G, em heterozigose, resultante da troca de base C para T na posição 366 (Wiggs et al., 1998), já identificado em indivíduos glaucomatosos em outras populações também em baixa frequência (Alward et al., 1998; Kanagavalli et al., 2003). Além destes polimorfismos, cinco mutações relacionadas ao desenvolvimento do glaucoma foram encontradas nestes indivíduos, sendo três delas já descritas anteriormente e duas ainda não reportadas. Uma delas, a mutação C433R, descrita na população brasileira por Vasconcellos e colaboradores, em 2000, e associada a altas PIOs e necessidade frequente de intervenção cirúrgica para controle da doença, apresentou grande frequência nesta coorte, corroborando com a hipótese de ser a mutação mais frequente na população brasileira (Pova et al., 2003; Vasconcellos, 2001). A outra mutação, Q368X, associada a fenótipos menos graves da doença, com PIOs não muito elevadas (média aproximada de 30 mmHg) e idade de instalação da doença por volta da quinta e sexta décadas de vida (Wiggs et al., 1998; Shimizu et al, 2000) e considerada a mais frequente em muitas populações (Fingert et al., 1999), foi detectada em somente dois indivíduos. A terceira mutação identificada foi a P370L, já descrita anteriormente

(Stoilova et al., 1998) e associada a valores de PIO elevados (acima de 40 mmHg) e idade média de instalação da doença entre a primeira e segunda décadas de vida (Wiggs et al., 1998; Shimizu et al., 2000; Melki et al., 2003; Puska et al., 2005; Hewitt et al., 2007). As duas mutações ainda não reportadas, I345V (figura 10) e c.1187_1188insCCCAGA, foram encontradas em heterozigose no mesmo indivíduo. A mutação c.1187_1188insCCCAGA foi também encontrada na família IV deste estudo, segregando com o GPAA-J em quatro indivíduos de três gerações. Ambas as mutações não foram encontradas em 60 indivíduos controle.

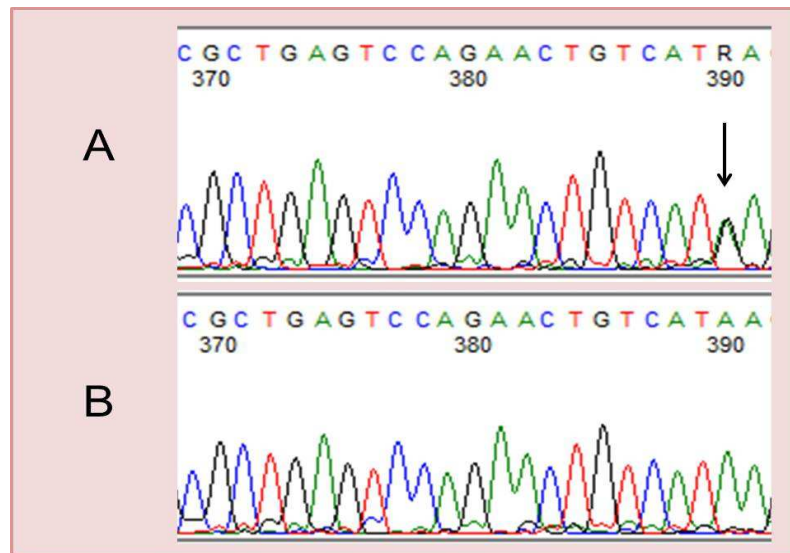


Figura 10. Eletroferograma do terceiro exon do gene *MYOC*, no qual é possível observar a mutação I345V identificada em heterozigose em indivíduo com GPAA-J. A seta indica o local da mutação, que leva à troca de bases A>G, acarretando na mudança do aminoácido isoleucina por uma valina (A). Indivíduo não portador da mutação I345V (B).

Tabela IV. Frequência alélica dos polimorfismos encontrados no gene *MYOC* nos casos não relacionados de GPAA-J.

Polimorfismo	Alelo	Frequência
P13P	T	98,04%
	G	1,96%
R76K	G	86,27%
	A	13,73%
G122G	C	98,04%
	T	1,96%

Tabela V. Frequência alélica das mutações encontradas no gene *MYOC* nos casos não relacionados de GPAA-J.

Mutação	Troca nucleotídica	Frequência
I345V	T>C	1 (1,96%)
c.1187_1188insCCCAGA	-	1 (1,96%)
Q368X	C>T	2 (3,92%)
P370L	C>T	1 (1,96%)
C433R	T>C	12 (23,53%)

2. Correlação genótipo/fenótipo – Gene *MYOC*

A tabela VI mostra a penetrância com relação à mutação no gene *MYOC* nos indivíduos das quatro famílias estudadas, dividida por faixa de idade. Nesta tabela é possível verificar a instalação precoce da doença na família I, ao observarmos a penetrância de 40% em menores de 20 anos (indivíduos com 18 e 19 anos). Esta penetrância aumenta para 80% na faixa entre 20 e 40 anos e diminui para 66,67% após os 40 anos de idade, visto que há dois indivíduos com idade avançada (58 e 73 anos), mas que ainda não manifestaram a doença.

De acordo com as análises mostradas na tabela VII, o p-valor de 0,002 (significativo), mostra a correlação positiva entre a presença da mutação C433R no gene *MYOC* e o desenvolvimento do glaucoma em membros da família I. Podemos observar que existem seis membros desta família com a mutação, mas que não apresentam a doença. Alguns destes indivíduos podem não ter manifestado a doença devido à idade, podendo manifestá-la futuramente, pois apresentam idades de 10, 11, 15 e 26 (indivíduos IV-18, IV-11, IV-20, IV-28, respectivamente). A idade de instalação da doença nesta família está entre 19 e 53 anos, com média de 36 anos de idade (tabela VIII). Assim, torna-se intrigante o fato de dois indivíduos desta família, com 58 e 73 anos (indivíduos III-19 e II-9, respectivamente) e portadores da mutação, ainda não terem desenvolvido a doença. Além disso, há três indivíduos com a doença, mas que não são portadores da mutação C433R (indivíduos III-8, III-9 e IV-25). Dois deles são irmãos. Por se tratar de uma família grande, com contribuições genéticas provenientes de diversas origens, há a possibilidade de haver outros genes, não investigados neste trabalho, envolvidos na etiologia da doença nesta família.

Na tabela IX está descrita a associação entre a presença ou ausência da mutação e os parâmetros clínicos de PIO e relação escavação/disco, analisados em ambos os olhos separadamente, pois, apesar do GPAA acometer, na grande maioria dos casos, os dois olhos, ele costuma manifestar-se assimetricamente, originando fenótipos de gravidade distintos em cada olho. Nesta tabela estão os resultados das análises da família I, na qual todas as associações se mostraram significantes. As médias de PIO máxima e relação escavação/disco de ambos os olhos mostraram-se discrepantes entre os grupos com e sem a mutação.

Tabela VI. Penetrância da mutação no gene *MYOC* (C433R nas famílias I, II e III e c.1187_1188insCCCAGA na família IV) nos indivíduos das quatro famílias com GPAA estudadas.

Família	Faixa etária (anos)	Mutação no gene <i>MYOC</i> /	
		Afetados	Não afetados
I	< 20	40% (2/5)	60% (3/5)
	20-40	80% (4/5)	20% (1/5)
	> 40	66,67% (4/6)	33,33% (2/6)
II	< 20	0% (0/2)	100% (2/2)
	20-40	62,5% (5/8)	37,5% (3/8)
	> 40	50% (1/2)	50% (1/2)
III	< 20	33,33% (1/3)	66,67% (2/3)
	20-40	100% (4/4)	0% (0/4)
	> 40	100% (4/4)	0% (0/4)
IV	< 20	0% (0/1)	100% (1/1)
	20-40	100% (4/4)	0% (0/4)
	> 40	-	-

Tabela VII. Associa o entre o desenvolvimento do GPAA com a presença da muta o C433R no gene *MYOC*, em membros da família I.

Muta�o	Diagnóstico		Total
	GPAA	Normal	
Presente	10 (26%)	6 (15%)	16 (41%)
Ausente	3 (8%)	20 (51%)	23 (59%)
Total	13 (34%)	26 (66%)	39 (100%)

p-valor = 0,002

Tabela VIII. Dados clínicos dos membros da família I de acordo com a presença/ausência da mutação C433R no gene *MYOC*.

ID	GPAA	C433R	Sexo	Idade	Idade Diag.	Trat. Cir./N°	Trat. Clín./N°	Máx. PIO OD	Máx. PIO OE	RED OD	RED OE
II-2	+	+	M	78	48	+2	+1	ND	10	1	0,8
II-6	+	+	F	61	38	+1	+1	22	22	1	1
II-9	-	+	F	73		-	-	19	20	0,2	0,2
III-4	+	+	F	38	38	-	-	26	22	0,1	0,1
III-6	-	-	F	48		-	-	12	12	0,1	0,1
III-8	+	-	F	37	37	-	-	19	22	0,1	0,1
III-9	+	-	M	41	41	-	-	24	26	0,2	0,2
III-11	-	-	M	61		-	-	20	20	0,2	0,2
III-12	+	+	M	54	53	-	+2	25	26	0,2	0,2
III-16	-	-	F	42		-	-	16	18	0,1	0,1
III-19	-	+	F	58		-	-	18	18	0,2	0,2
III-20	+	+	M	44	43	-	-	40	40	0,2	0,2
III-25	-	-	F	36		-	-	17	18	0,1	0,1
III-27	+	+	F	49	29	+2	+2	24	14	0,6	0,2
III-30	+	+	F	50	32	+3	+2	54	55	1	1
IV-1	-	-	F	26		-	-	16	17	0,3	0,2
IV-2	-	-	F	23		-	-	16	16	0,2	0,2
IV-3	-	-	M	12		-	-	14	15	0,1	0,1
IV-4	-	-	M	14		-	-	14	14	0,1	0,1
IV-5	-	-	M	20		-	-	16	16	0,1	0,1
IV-6	-	-	F	6		-	-	12	12	0,1	0,1
IV-7	-	-	M	12		-	-	14	12	0,1	0,1
IV-8	-	-	M	12		-	-	15	16	0,1	0,1
IV-9	-	-	F	6		-	-	18	18	0,1	0,1
IV-10	-	-	M	12		-	-	15	16	0,1	0,1
IV-11	-	+	M	11		-	-	17	17	0,1	0,1
IV-12	-	-	F	16		-	-	15	15	0,1	0,2
IV-13	-	-	F	36		-	-	11	12	0,2	0,2
IV-16	+	+	F	48	48	-	-	20	21	0,3	0,2
IV-18	-	+	F	10		-	-	20	19	0,2	0,2
IV-20	-	+	M	15		-	-	17	17	0,1	0,1
IV-21	-	-	F	23		-	-	16	16	0,1	0,1
IV-22	-	-	M	21		-	-	16	16	0,2	0,2
IV-23	-	-	M	11		-	-	18	17	0,1	0,1
IV-25	+	-	M	25	25	-	-	25	25	0,2	0,2
IV-26	+	+	F	28	22	-	+2	24	24	0,3	0,3
IV-27	-	-	F	21		-	-	17	18	0,1	0,2
IV-28	-	+	M	26		-	-	19	18	0,1	0,2
V-2	+	+	M	19	19	-	-	26	24	0,2	0,1

ID = Identificação do indivíduo (de acordo com o heredograma)

+ = Presente

- = Ausente

M = Masculino

F = Feminino

Idade Diag. = Idade de diagnóstico da doença

Trat. Cir./N° = Presença ou ausência de tratamento cirúrgico/número de tratamentos cirúrgicos

Trat. Clín./N° = Presença ou ausência de tratamento clínico/número de tratamentos clínicos

Máx. PIO OD/OE = Máxima pressão intra-ocular no olho direito (OD) e no olho esquerdo (OE)

RED OD/OE = Relação escavação/disco no olho direito (OD) e no olho esquerdo (OE)

ND = Não determinado

Tabela IX. Comparação entre os parâmetros clínicos de PIO máxima e fundoscopia (relação escavação/disco) em ambos os olhos de acordo com a presença ou ausência da mutação C433R no gene *MYOC*, em membros da família I.

	Mutação	N	Média	Erro Padrão da Média	p-valor
MáxPIOod	<i>Ausente</i>	23	16,348	0,702	0,0006
	<i>Presente</i>	15	24,733	2,561	
MáxPIOoe	<i>Ausente</i>	23	16,826	0,777	0,0157
	<i>Presente</i>	16	22,938	2,682	
RED OD	<i>Ausente</i>	23	0,135	0,012	0,0030
	<i>Presente</i>	16	0,363	0,085	
RED OE	<i>Ausente</i>	23	0,139	0,010	0,0098
	<i>Presente</i>	16	0,319	0,078	

MáxPIOod/oe = Máxima pressão intraocular do olho direito (od) e no olho esquerdo (oe)
 RED OD/OE = Relação escavação/disco do olho direito (OD) e do olho esquerdo (OE)

É possível observar na tabela VI, que membros da família II só começam a manifestar a doença na faixa etária entre 20 e 40 anos, com penetrância de 62,5%. A idade de diagnóstico destes pacientes é de 26, 32, 35, 38 e 40 anos (indivíduos II-12, II-11, II-8, II-7, II-5, respectivamente). Há somente dois membros da família com mais de 40 anos portadores da mutação (indivíduos II-3 e II-10). Contudo, um deles, com 41 anos de idade, ainda não manifestou a doença (indivíduo II-10).

Na tabela X, podemos ver que o p-valor maior que 0,05 indica a não associação da mutação com o desenvolvimento da doença na família II. Contudo, este resultado deve ser interpretado com cautela, pois há seis indivíduos com a mutação e com a doença e seis com a mutação e normais. Os indivíduos normais têm idades de 9, 16, dois com 26, 28 e 41 anos (indivíduos III-7, III-2, III-5, III-4, III-3 e II-10, respectivamente). Nesta família, a idade de diagnóstico varia entre 26 e 43 anos com média de 36 anos de idade (tabela XI). Deste modo, estas pessoas, (com menor probabilidade, o indivíduo com 41 anos) podem não ter desenvolvido a doença devido à idade, podendo apresentar fenótipo glaucomatoso daqui a alguns anos. Este fato também pode justificar a não correlação

entre a PIO máxima e a relação escavação/disco com a mutação C433R nesta família (tabela XII).

Tabela X. Associação entre o desenvolvimento do GPAA com a presença da mutação C433R no gene *MYOC*, em membros da família II.

Mutação	Diagnóstico		Total
	GPAA	Normal	
Presente	6 (35%)	6 (35%)	12 (70%)
Ausente	1 (6%)	4 (24%)	5 (30%)
Total	7 (41%)	10 (59%)	17 (100%)

p-valor = 0,3382

Tabela XI. Dados clínicos dos membros da família II de acordo com a presença/ausência da mutação C433R no gene *MYOC*.

ID	GPAA	C433R	Sexo	Idade	Idade Diag.	Trat. Cir./N°	Trat. Clín./N°	Máx. PIO OD	Máx. PIO OE	RED OD	RED OE
II-2	+	-	M	51	43	+2	+1	10	11	0,7	0,8
II-3	+	+	M	49	41	+2	+2	11	14	0,8	0,7
II-5	+	+	F	48	40	-	+3	14	15	0,7	0,65
II-7	+	+	F	46	38	-	+1	14	13	0,75	0,75
II-8	+	+	M	43	35	+2	+1	16	14	0,8	0,7
II-10	-	+	F	41		-	+1	18	16	0,6	0,4
II-11	+	+	M	39	32	-	+2	19	20	0,5	0,6
II-12	+	+	M	34	26	-	+3	28	27	0,55	0,55
II-13	-	-	M	38		-	+1	11	12	0,2	0,3
II-14	-	-	M	28		-	-	15	15	0,3	0,3
III-1	-	-	F	12		-	-	14	18	0,2	0,4
III-2	-	+	M	16		-	-	16	14	0,2	0,2
III-3	-	+	F	28		-	-	20	18	0,4	0,45
III-4	-	+	F	26		-	-	10	10	0,2	0,2
III-5	-	+	M	26		-	-	14	14	0,4	0,5
III-6	-	-	M	13		-	-	15	14	0,4	0,5
III-7	-	+	F	9		-	-	16	15	0,4	0,2

ID = Identificação do indivíduo (de acordo com o heredograma)

+ = Presente

- = Ausente

M = Masculino

F = Feminino

Idade Diag. = Idade de diagnóstico da doença

Trat. Cir./N° = Presença ou ausência de tratamento cirúrgico/número de tratamentos cirúrgicos

Trat. Clín./N° = Presença ou ausência de tratamento clínico/número de tratamentos clínicos

Máx. PIO OD/OE = Máxima pressão intra-ocular no olho direito (OD) e no olho esquerdo (OE)

RED OD/OE = Relação escavação/disco no olho direito (OD) e no olho esquerdo (OE)

Tabela XII. Comparação entre os parâmetros clínicos de PIO máxima e fundoscopia (relação escavação/disco) em ambos os olhos de acordo com a presença ou ausência da mutação C433R no gene *MYOC* em membros da família II.

	Mutação	N	Média	Erro Padrão da Média	p-valor
MáxPIOod	<i>Ausente</i>	5	13,000	1,049	0,1582
	<i>Presente</i>	12	16,333	1,361	
MáxPIOoe	<i>Ausente</i>	5	14,000	1,225	0,3966
	<i>Presente</i>	12	15,833	1,242	
RED OD	<i>Ausente</i>	5	0,360	0,093	0,1630
	<i>Presente</i>	12	0,525	0,061	
RED OE	<i>Ausente</i>	5	0,460	0,093	0,7758
	<i>Presente</i>	12	0,492	0,059	

MáxPIOod/oe = Máxima pressão intraocular do olho direito (od) e no olho esquerdo (oe)
 RED OD/OE = Relação escavação/disco do olho direito (OD) e do olho esquerdo (OE)

De acordo com a tabela VI, podemos verificar que apenas um membro da família III foi diagnosticado com GPAA-J antes dos 20 anos. Este diagnóstico foi feito aos 12 anos de idade neste indivíduo. Entre os 20 e 40 anos e após os 40 anos, todos os indivíduos portadores da mutação apresentam glaucoma, com menor idade de instalação da doença de 25 anos. Assim, nesta família a penetrância se mostrou completa após os 25 anos de idade.

A alta associação entre a mutação e o desenvolvimento do GPAA (p-valor <0,0001) na família III está apresentada na tabela XIII. Nesta família, dentre os 12 indivíduos portadores da mutação, apenas dois não apresentam a doença, cujas idades são de 8 e 17 anos (indivíduos V-13 e V-7, respectivamente. A idade de diagnóstico nesta família está entre os 12 e 52 anos, com média de 35 anos de idade (tabela XIV). Entretanto, apenas um dos membros desta família, foi diagnosticado com menos de vinte anos (indivíduo III-5), como já dito anteriormente. Assim, estes indivíduos normais e portadores da mutação no gene *MYOC*, podem não ter atingido idade suficiente para manifestação da doença.

A tabela XV mostra a associação significativa entre a mutação e os parâmetros clínicos na família III. Podemos observar a grande diferença nos valores de PIO máxima e relação escavação/disco entre os grupos com e sem a mutação, resultando em p-valores bem baixos.

Tabela XIII. Associação entre o desenvolvimento do GPAA com a presença da mutação C433R no gene *MYOC*, em membros da família III.

Mutação	Diagnóstico		Total
	GPAA	Normal	
Presente	10 (26%)	2 (5%)	12 (31%)
Ausente	0 (0%)	27 (69%)	27 (69%)
Total	10 (26%)	29 (74%)	39 (100%)

p-valor = <0,0001

Tabela XIV. Dados clínicos dos membros da família III de acordo com a presença/ausência da mutação C433R no gene *MYOC*.

ID	GPAA	C433R	Sexo	Idade	Idade Diag.	Trat. Cir./N°	Trat. Clín./N°	Máx. PIO OD	Máx. PIO OE	RED OD	RED OE
III-3	+	+	M	62	52	-	+3	24	24	0,7	0,7
III-5	+	+	F	60	12	+5	+3	45	42	1	1
III-9	+	+	M	54	38	-	+2	32	34	1	1
III-10	-	-	M	58		-	-	14	14	0,2	0,2
III-12	-	-	F	50		-	-	13	13	0,1	0,1
III-17	+	+	M	49	49	+1	-	57	57	1	1
III-19	-	-	F	52		-	-	13	13	0,1	0,1
III-20	+	+	F	48		-	+1	21	22	0,2	0,3
III-21	-	-	M	59		-	-	20	20	0,2	0,2
III-22	+	+	M	41	41	-	+1	24	22	0,7	0,7
III-23	-	-	M	61		-	-	14	14	0,3	0,2
IV-2	-	-	F	31		-	-	14	15	0,1	0,1
IV-6	+	+	F	38	38	-	+1	15	25	1	1
IV-8	+	+	F	41		-	-	18	18	0,4	0,5
IV-10	-	-	M	33		-	-	16	16	0,1	0,1
IV-12	-	-	F	28		-	-	15	13	0,5	0,5
IV-13	-	-	F	35		-	-	15	16	0,2	0,2
IV-14	-	-	F	27		-	-	15	16	0,2	0,1
IV-15	-	-	F	40		-	-	12	12	0,4	0,4
IV-17	+	+	M	30	25	+2	-	35	38	0,8	1
IV-19	+	+	F	28	28	-	+1	15	14	0,3	0,3
IV-21	-	-	F	18		-	-	17	15	0,3	0,3
IV-22	-	-	F	8		-	-	12	12	0,2	0,2
IV-23	-	-	M	4		-	-	14	14	0,1	0,1
IV-24	-	-	F	25		-	-	18	18	0,1	0,1
IV-25	-	-	M	30		-	-	14	16	0,4	0,4
IV-26	-	-	F	26		-	-	16	15	0,1	0,1
IV-27	-	-	M	19		-	-	14	14	0,2	0,2
V-1	-	-	F	9		-	-	14	14	0,1	0,1
V-2	-	-	F	15		-	-	16	16	0,1	0,1
V-3	-	-	F	10		-	-	20	20	0,2	0,2
V-4	-	-	F	19		-	-	15	15	0,2	0,2
V-5	-	-	F	16		-	-	16	17	0,1	0,1
V-6	-	-	M	12		-	-	16	16	0,3	0,3
V-7	-	+	M	17		-	-	15	15	0,2	0,4
V-9	-	-	F	9		-	-	15	15	0,2	0,2
V-12	-	-	M	20		-	-	14	13	0,3	0,3
V-13	-	+	F	8		-	-	16	16	0,1	0,2
V-14	-	-	F	6		-	-	12	13	0,1	0,1

ID = Identificação do indivíduo (de acordo com o heredograma)

+ = Presente

- = Ausente

M = Masculino

F = Feminino

Idade Diag. = Idade de diagnóstico da doença

Trat. Cir./N° = Presença ou ausência de tratamento cirúrgico/número de tratamentos cirúrgicos

Trat. Clín./N° = Presença ou ausência de tratamento clínico/número de tratamentos clínicos

Máx. PIO OD/OE = Máxima pressão intra-ocular no olho direito (OD) e no olho esquerdo (OE)

RED OD/OE = Relação escavação/disco no olho direito (OD) e no olho esquerdo (OE)

Tabela XV. Comparação entre os parâmetros clínicos de PIO máxima e fundoscopia (relação escavação/disco) em ambos os olhos de acordo com a presença ou ausência da mutação C433R no gene *MYOC* em membros da família III.

	Mutação	N	Média	Erro Padrão da Média	p-valor
MáxPIOod	<i>Ausente</i>	27	14,963	0,398	<0,0001
	<i>Presente</i>	12	26,417	3,889	
MáxPIOoe	<i>Ausente</i>	27	15,000	0,399	<0,0001
	<i>Presente</i>	12	27,250	3,766	
RED OD	<i>Ausente</i>	27	0,200	0,021	<0,0001
	<i>Presente</i>	12	0,617	0,103	
RED OE	<i>Ausente</i>	27	0,193	0,021	<0,0001
	<i>Presente</i>	12	0,675	0,093	

MáxPIOod/oe = Máxima pressão intraocular do olho direito (od) e no olho esquerdo (oe)
RED OD/OE = Relação escavação/disco do olho direito (OD) e do olho esquerdo (OE)

Nestas três famílias, podemos observar fenótipos bastante variados, sendo que nas famílias I e II, há indivíduos mostrando instalação precoce da doença, mas penetrância incompleta mesmo após os 40 anos de idade. Além disso, a idade de instalação da doença nas três famílias é bastante variável. Estas observações sugerem a participação de outros genes e a modulação do ambiente na instalação do glaucoma, reforçando a avaliação do gene *CYP1B1* como modulador do fenótipo do glaucoma.

Na família IV, a mutação c.1187_1188insCCCAGA segrega com a doença em quatro indivíduos de três gerações (indivíduos II-3, III-3, IV-1 e IV-4), estando presente também no indivíduo da quinta geração da família que, muito provavelmente devido à idade (6 anos), não apresenta glaucoma. Assim, nesta família, foi constatada penetrância completa a partir dos 20 anos de idade (tabela VI).

Na tabela XVI, podemos verificar a não associação da mutação c.1187_1188insCCCAGA com a doença (p-valor = 0,1429). Entretanto, este dado pode não significar realmente a não associação desta mutação com o desenvolvimento do glaucoma na família IV, já que o teste estatístico pode ter sido prejudicado pelo baixo

número de indivíduos analisados (somente sete). Nesta tabela podemos ver que todos os indivíduos que apresentam a mutação, apresentam a doença, exceto por um indivíduo que, muito provavelmente, devido à sua idade (6 anos), não possui fenótipo glaucomatoso. Além disso, nesta família não há indivíduos glaucomatosos que não sejam portadores da mutação no gene *MYOC* e os dois indivíduos que não apresentam a mutação não apresentam a doença.

Na associação entre a mutação e os dados clínicos PIO máxima e relação escavação/disco, somente a primeira apresentou associação significativa (tabela XVIII). Apesar da associação não significativa da mutação com a relação escavação/disco, dentre os cinco indivíduos com a mutação, dois são cegos, ou seja, apresentam relação escavação/disco igual a 1 e outro apresenta escavação de 0,9 no olho direito e 0,7 no olho esquerdo e, portanto, comprometimento grave da função visual. Já os indivíduos sem a mutação apresentam escavação de 0,2 em ambos os olhos (tabela XVII).

Tabela XVI. Associação entre o desenvolvimento do GPAA com a presença da mutação c.1187_1188insCCCAGA no gene *MYOC*, em membros da família IV.

Mutação	Diagnóstico		Total
	GPAA	Normal	
Presente	4 (57%)	1(14%)	5 (81%)
Ausente	0 (0%)	2 (19%)	2 (19%)
Total	4 (57%)	3 (33%)	7 (100%)

p-valor = 0,1429

Tabela XVII. Dados clínicos dos membros da família IV de acordo com a presença/ausência da mutação c.1187_1188insCCCAGA no gene *MYOC*.

ID	GPAA	c.1187_1188insCCCAGA	Sexo	Idade	Idade Diag.	Trat. Cir./N°	Trat. Clín./N°	Máx. PIO OD	Máx. PIO OE	RED OD	RED OE
II-3	+	+	M	77	30	+/2	+/1	34	34	1	1
III-1	+	+	M	48	29	+/3	+/2	35	35	1	1
IV-1	+	+	F	23	20	-	+/3	34	32	0,9	0,7
IV-2	-	-	F	21		-	-	14	14	0,2	0,2
IV-3	-	-	F	12		-	-	16	15	0,2	0,2
IV-4	+	+	M	27	22	-	+/2	26	25	0,2	0,2
V-1	-	+	M	6		-	-	ND	ND	0,3	0,3

ID = Identificação do indivíduo (de acordo com o heredograma)

+ = Presente

- = Ausente

M = Masculino

F = Feminino

Idade Diag. = Idade de diagnóstico da doença

Trat. Cir./N° = Presença ou ausência de tratamento cirúrgico/número de tratamentos cirúrgicos

Trat. Clín./N° = Presença ou ausência de tratamento clínico/número de tratamentos clínicos

Máx. PIO OD/OE = Máxima pressão intra-ocular no olho direito (OD) e no olho esquerdo (OE)

RED OD/OE = Relação escavação/disco no olho direito (OD) e no olho esquerdo (OE)

ND = Não determinado

Tabela XVIII. Comparação entre os parâmetros clínicos de PIO máxima e fundoscopia (relação escavação/disco) em ambos os olhos de acordo com a presença ou ausência da mutação c.1187_1188insCCCAGA no gene *MYOC* em membros da família IV.

	Mutação	N	Média	Erro Padrão da Média	p-valor
MáxPIOod	<i>Ausente</i>	2	15,000	1,000	0,0058
	<i>Presente</i>	4	32,250	2,097	
MáxPIOoe	<i>Ausente</i>	2	14,500	0,500	0,0075
	<i>Presente</i>	4	31,500	2,255	
RED OD	<i>Ausente</i>	2	0,200	0,000	0,1665
	<i>Presente</i>	5	0,680	0,177	
RED OE	<i>Ausente</i>	2	0,200	0,000	0,1808
	<i>Presente</i>	5	0,640	0,169	

MáxPIOod/oe = Máxima pressão intraocular do olho direito (od) e no olho esquerdo (oe)

RED OD/OE = Relação escavação/disco do olho direito (OD) e do olho esquerdo (OE)

Nos casos não relacionados de GPAA-J, doze indivíduos são portadores da mutação C433R e apresentam PIO elevada (acima de 24 mmHg e PIO máxima média de 43mmHg) e todos onze deles já tiveram que passar por intervenção cirúrgica para controle do glaucoma. Em um dos pacientes foi detectada a mutação P370L, já descrita

anteriormente (Stoilova et al., 1998) e associada à instalação precoce da doença, características clínicas severas, altas PIOs não responsivas a tratamento, e necessidade de intervenção cirúrgica na grande maioria dos casos (Zhuo et al., 2008). Apesar de este paciente apresentar PIOs não tão altas, de 20 mmHg em ambos os olhos, aos 22 anos, ele já passou por duas intervenções cirúrgicas para controle da doença. Outros dois indivíduos apresentaram a mutação Q368X, já identificada em pacientes com GPAA e não relacionada à instalação precoce do glaucoma, mas com presença de PIOs elevadas (Alward et al., 1998). Corroborando com a literatura, estes pacientes não apresentaram instalação precoce da doença (31 e 32 anos de idade), contudo mostraram PIOs não muito elevadas (PIO máxima média de 22mmHg). Estes indivíduos também já foram submetidos a cirurgias. O indivíduo com as mutações I345V e c.1187_1188insCCCAGA foi diagnosticado com glaucoma aos 19 anos e apresentou PIO máxima de 30mmHg em ambos os olhos. Atualmente, aos 25 anos de idade, apresenta relação escavação/disco de 0,6 no olho direito e 0,5 no olho esquerdo, além de já ter passado por cirurgia em ambos os olhos. Neste caso, a avaliação da influência da mutação I345V no fenótipo da doença fica dificultada pela presença da mutação c.1187_1188insCCCAGA, já associada ao GPAA-J neste estudo, mas identificada em somente quatro indivíduos que já manifestaram a doença. Os dados clínicos dos casos não relacionados de GPAA-J estão apresentados nas tabelas XIX e XX.

Tabela XIX. Dados clínicos dos casos não relacionados de GPAA-J que apresentam mutação no gene *MYOC*.

ID	Idade Diag.	Sexo	Máx. PIO OD	Máx. PIO OE	RED OD	RED OE	Nº Trat. Clín.	Nº Trat. Cir. OD	Nº Trat. Cir. OE	Mutação no gene <i>MYOC</i>
AFS	29	M	60	60	ND	ND	0	0	1	C433R
CVS	22	M	20	20	ND	ND	0	1	1	P370L
DPB	32	M	38	40	ND	ND	0	1	0	C433R
IS	35	F	38	38	ND	ND	0	1	1	C433R
NGSJ	25	M	54	49	ND	ND	0	1	1	C433R
OOL	29	M	44	56	ND	ND	0	1	1	C433R
SAF	24	F	41	52	ND	ND	0	1	1	C433R
VDN	27	F	24	24	ND	ND	0	1	1	C433R
MJN	20	M	32	28	ND	ND	0	1	1	C433R
JAR	32	M	14	12	ND	ND	0	1	2	Q368X
FASO	21	F	36	47	0,3	0,7	0	1	2	C433R
JAA	19	F	30	30	0,6	0,5	0	1	1	I345V e c.1187_1188insCCCAGA
AZ	32	M	28	28	0,4	0,4	4	0	0	C433R
VBS	39	M	48	62	1	1	3	1	1	C433R
JACJ	31	M	32	29	0,8	0,4	3	1	0	Q368X
MASP	37	F	50	52	0,9	0,8	3	1	1	C433R

ID = Identificação do indivíduo

M = Masculino

F = Feminino

Idade Diag. = Idade de diagnóstico da doença

Máx. PIO OD/OE = Máxima pressão intra-ocular no olho direito (OD) e no olho esquerdo (OE)

RED OD/OE = Relação escavação/disco no olho direito (OD) e no olho esquerdo (OE)

Nº Trat. Clín. = Número de tratamentos clínicos

Nº Trat. Cir. OD/OE = Número de tratamentos cirúrgicos no olho direito (OD) e no olho esquerdo (OE)

ND = Não determinado

Tabela XX. Dados clínicos dos casos não relacionados de GPAA-J que não apresentam mutação no gene *MYOC*.

ID	Idade Diag.	Sexo	Máx. PIO OD	Máx. PIO OE	RED OD	RED OE	Nº Trat. Clín.	Nº Trat. Cir. OD	Nº Trat. Cir. OE
AAS	39	M	37	42	ND	ND	0	2	1
CBF	31	M	36	32	ND	ND	0	2	2
CSS	15	F	32	32	ND	ND	0	1	0
DAJ	10	M	24	24	ND	ND	0	0	0
EMI	25	M	30	26	ND	ND	0	1	1
EAS	25	F	34	34	ND	ND	0	0	1
HGF	30	F	21	23	ND	ND	0	0	0
JLU	30	M	12	12	ND	ND	0	1	1
JMNF	31	M	22	20	ND	ND	0	1	0
JGK	33	F	28	18	ND	ND	0	1	1
JRL	24	F	20	24	ND	ND	0	1	1
JCS	11	M	20	18	ND	ND	0	0	0
LAB	36	F	24	25	ND	ND	0	3	0
LGS	16	F	54	60	ND	ND	0	0	1
MAN	25	M	22	22	ND	ND	0	0	0
SCP	19	F	34	30	ND	ND	0	0	0
SCASS	18	F	30	38	1	1	3	1	1
TME	34	F	28	28	ND	ND	0	1	1
ECS	13	M	31	31	0,8	0,6	2	0	0
FPS	24	M	25	40	0,4	1	4	0	2
PFOF	27	M	23	22	0,8	0,9	4	0	0
LM	25	M	38	38	0,8	0,9	2	1	2
IQ	20	M	24	24	0,8	0,8	1	3	2
WC	10	M	25	39	1	0,8	0	2	1
CPN	38	M	20	20	0,8	0,8	2	0	0
MAS	23	M	48	46	0,9	0,9	2	1	1
AGO	16	F	22	21	0,9	0,9	3	2	1
RNE	34	F	23	24	0,9	1	2	1	1
EFLT	12	F	20	19	0,7	0,5	1	0	0
EBS	16	M	62	44	1	0,9	3	0	3
DB	18	M	18	19	0,8	0,7	1	0	0
MRS	35	M	20	22	0,7	0,7	1	0	0
AMM	32	M	32	36	0,9	0,9	3	1	1
LVC	32	F	48	42	0,9	0,9	3	1	1
RCS	9	M	29	28	0,7	0,7	2	0	0

ID = Identificação do indivíduo

M = Masculino

F = Feminino

Idade Diag. = Idade de diagnóstico da doença

Máx. PIO OD/OE = Máxima pressão intra-ocular no olho direito (OD) e no olho esquerdo (OE)

RED OD/OE = Relação escavação/disco no olho direito (OD) e no olho esquerdo (OE)

N° Trat. Clín. = Número de tratamentos clínicos
 N° Trat. Cir. OD/OE = Número de tratamentos cirúrgicos no olho direito (OD) e no olho esquerdo (OE)
 ND = Não determinado

Também foi realizada análise da associação da presença de mutação no gene *MYOC* e os dados clínicos de PIO máxima em ambos os olhos e número de cirurgias em ambos os olhos, por serem os únicos dados clínicos disponíveis para todos os casos estudados. Foi encontrada associação entre a presença de mutação no gene *MYOC* e os valores máximos de PIO, porém, o mesmo não ocorreu com o número de cirurgias realizadas por pacientes com e sem mutação neste gene (tabela XXI).

Tabela XXI. Avaliação da associação da presença de mutação no gene *MYOC* com os dados clínicos de pressão intra-ocular máxima e número de cirurgias realizadas, nos casos não relacionados de GPAA-J.

	Média ± EPM		p-valor
	<i>MYOC mut</i>	<i>MYOC WT</i>	
MáxPIOod	36,81±3,124	29,03±1,813	0,0268
MáxPIOoe	39,19±3,819	29,23±1,729	0,0083
N°CirOD	0,88±0,085	0,77±0,148	0,6514
N°CirOE	0,94±0,143	0,74±0,218	0,2966

EPM = erro padrão da média
 MáxPIOod/oe = Máxima pressão intraocular do olho direito (od) e no olho esquerdo (oe)
 N°CirOD/OE = Número de cirurgias no olho direito (OD) e no olho esquerdo (OE)

3. Análise de mutações no gene *CYP1B1*

Os polimorfismos de base única R48G, A119S, V432L, D449D e N453S, já identificados na população brasileira em estudo de caso-controle para o glaucoma congênito primário (Stoilov et al., 2003), foram avaliados no gene *CYP1B1* nas famílias estudadas (tabelas XXII, XXIII, XXIV, XXV). Além destes polimorfismos, foi

encontrada a mutação R368H em dois membros da família I normais, sem mutação no gene *MYOC*. Esta mutação, uma troca de G para A, na base 1449, que leva à mudança de uma arginina para uma histidina, no aminoácido 368, foi primeiramente identificada em pacientes indianos com glaucoma congênito primário (Reddy et al., 2003). Esta variante já foi detectada previamente em homozigose em pacientes com GPAA-J por Bayat et al. (2008). Estes autores encontraram diversas mutações no gene *CYP1B1* em indivíduos com GPAA-J estando todas em homozigose, levando-os a crer no modo de herança autossômica recessiva para estes pacientes. Nestes indivíduos da família I, a variante R368H foi encontrada em heterozigose.

Tabela XXII. Frequência alélica dos polimorfismos encontrados no gene *CYP1B1* na família I.

Polimorfismo	Alelo	Frequência
R48G	C	61,36%
	G	38,64%
A119S	G	61,36%
	T	38,64%
V432L	G	9,09%
	C	90,91%
D449D	T	9,09%
	C	90,91%
N453S	A	29,55%
	G	70,45%

Tabela XXIII. Frequência alélica dos polimorfismos encontrados no gene *CYP1B1* na família II.

Polimorfismo	Alelo	Frequência
R48G	C	64,71%
	G	35,29%
A119S	G	64,71%
	T	35,29%
V432L	G	0%
	C	100%
D449D	T	0%
	C	100%
N453S	A	17,65%
	G	82,35%

Tabela XXIV. Frequência alélica dos polimorfismos encontrados no gene *CYP1B1* na família III.

Polimorfismo	Alelo	Frequência
R48G	C	17,50%
	G	82,50%
A119S	G	17,50%
	T	82,50%
V432L	G	7,50%
	C	92,50%
D449D	T	7,50%
	C	92,50%
N453S	A	72,50%
	G	27,50%

Tabela XXV. Frequência alélica dos polimorfismos encontrados no gene *CYP1B1* na família IV.

Polimorfismo	Alelo	Frequência
R48G	C	28,57%
	G	71,43%
A119S	G	28,57%
	T	71,43%
V432L	G	14,29%
	C	85,71%
D449D	T	14,29%
	C	85,71%
N453S	A	100%
	G	0%

Na família IV, foi encontrada a variante Y81N em heterozigose, no indivíduo que possui mutação no gene *MYOC*, mas que está com 6 anos de idade. Portanto, não há como relacionar a possível modulação do fenótipo por esta variante. Em casos de GCP, esta variante também foi encontrada em homozigose e heterozigose (Campos-Mollo et al., 2009). Neste caso, somente os indivíduos homozigotos para a mutação apresentaram a doença.

Nos casos não relacionados de GPAA-J, os mesmos polimorfismos no gene *CYP1B1* foram avaliados (R48G, A119S, V432L, D449D e N453S) e as frequências alélicas estão apresentadas na tabela XXVI.

Também foram encontradas cinco mutações no gene *CYP1B1* nos casos não relacionados de GPAA-J (G61E, P52L, E229K, A443G e 8037_8046dupTCATGCCACC), todas já reportadas anteriormente na literatura e relacionadas ao GPAA ou GPAA-J (tabela XXVII).

Tabela XXVI. Frequência alélica dos polimorfismos encontrados no gene *CYP1B1* nos casos não relacionados de GPAA-J.

Polimorfismo	Alelo	Frequência
R48G	C	47,06%
	G	52,94%
A119S	G	45,10%
	T	54,90%
V432L	G	39,22%
	C	60,78%
D449D	T	37,25%
	C	62,75%
N453S	A	82,35%
	G	17,65%

Tabela XXVII. Frequência alélica das mutações encontradas no gene *CYP1B1* nos casos não relacionados de GPAA-J.

Mutação	Troca nucleotídica	Frequência
G61E	G>A	1 (1,96%)
P52L	C>T	1 (1,96%)
E229K	G>A	2 (3,92%)
A443G	C>G	2 (3,92%)
8037_8046dupTCATGCCACC	-	1 (1,96%)

4. Correlação genótipo/fenótipo – Gene *CYP1B1*

Vincent et al. (2002) reportaram que membros de uma família com GPAA portadores de mutações nos genes *MYOC* e *CYP1B1* apresentavam instalação precoce do glaucoma em comparação aos indivíduos portadores de mutação somente no gene *MYOC*.

Entretanto, nenhuma mutação no gene *CYP1B1* foi encontrada nas famílias avaliadas no presente estudo. Apesar disso, foram encontrados diversos polimorfismos neste gene. Bhattacharjee et al. (2008), em estudo com 264 indivíduos glaucomatosos e 95 indivíduos controle, concluíram que o alelo 1666C do polimorfismo V432L era um alelo de susceptibilidade para o GPAA. Assim, realizamos as análises para avaliar a possível relação deste alelo com a modulação do fenótipo da doença nos membros afetados pela doença das famílias I, II e III. Contudo, não foram encontradas relações significativas entre este alelo e a idade de instalação da doença, os valores de PIO e a relação escavação/disco.

Chakrabarti et al. (2006), analisando os diferentes haplótipos formados pelos polimorfismos R48G, A119S, V432L, D449D e N453S, verificaram a significativa prevalência do haplótipo CGGTA em casos de GCP. Para verificar se este haplótipo de

risco também estava relacionado ao GPAA, analisamos a relação deste haplótipo com a segregação da doença e os dados clínicos nos membros das famílias I, II e III. Nenhuma relação significativa foi encontrada.

Nos casos não relacionados, todas as mutações encontradas (G61E, P52L, E229K, A443G e 8037_8046dupTCATGCCACC) já foram encontradas, em heterozigose, em casos de GPAA ou GPAA-J. Assim, pode-se considerar a possibilidade destas mutações estarem envolvidas com o desenvolvimento do GPAA-J nestes indivíduos estudados.

CONCLUSÕES

- Alterações no gene *MYOC* parecem contribuir para o desenvolvimento do GPAA em famílias brasileiras, seguindo um padrão de herança autossômico dominante.
- Uma nova mutação no gene *MYOC* (c.1187_1188insCCCAGA) foi encontrada, segregando com a doença em 3 gerações da família IV, estando, provavelmente, envolvida na etiologia do GPAA-J nesta família;
- Esta nova mutação leva a uma possível alteração de estrutura secundária e de contatos internos da miocilina.
- O fenótipo variável encontrado nas famílias I, II e III, sugere o envolvimento de outros genes que contribuem para o desenvolvimento da doença, modulando seu fenótipo. Contudo, nenhum dos polimorfismos ou mutações encontrados no gene *CYP1B1* foram associados à diferença de fenótipo observado nos pacientes das famílias analisadas, podendo ser atribuída a outros genes não avaliados neste estudo (e.g. *WDR36*, *OPTN*).
- Nos casos não relacionados de GPAA-J foram encontradas cinco diferentes mutações encontradas no gene *MYOC*, sendo a C433R a mais frequente.
- Os indivíduos com mutação no gene *MYOC* parecem apresentar fenótipo mais grave, com PIO mais elevadas.
- Nos casos não relacionados de GPAA-J foram encontradas cinco diferentes mutações encontradas no gene *CYP1B1*, todas em heterozigose, podendo estar relacionadas com o desenvolvimento da doença nestes indivíduos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHARY MS, REDDY ABM, CHAKRABARTI S, PANICKER SHIRLY, MANDAL AK, AHMED N, BALASUBRAMANIAN D, HASNAIN SE, NAGARAJARAM HA. Disease-causing mutations in proteins: structural analysis of the CYP1B1 mutations causing primary congenital glaucoma in humans. *Biophys J*. 2006; 91:4329-39.
- ACHARYA M, MOOKHERJEE S, BHATTACHARJEE A, BANDYOPADHYAY AK, DAULAT THAKUR SK, BHADURI G, SEN A, RAY K. Primary role of CYP1B1 in Indian juvenile-onset POAG patients. *Mol Vis*. 2006; 12:399-404.
- ALLINGHAM RR, DAMJI KF, FREEDMAN S, MOROI SE, SHAFRANOV G, SHIELDS MB. *Shield's Textbook of Glaucoma*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
- ALLINGHAM RR, WIGGS JL, HAUSER ER, LAROCQUE-ABRAMSON KR, SANTIAGO-TURLA C, BROOMER B, DEL BONO EA, GRAHAM FL, HAINES JL, PERICAK-VANCE MA, HAUSER MA. Early adult-onset POAG linked to 15q11-13 using ordered subset analysis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005; 46(6):2002-5.
- ALWARD WL, FINGERT JH, COOTE MA, JOHNSON AT, LERNER SF, JUNQUA D, DURCAN FJ, MCCARTNEY PJ, MACKAY DA, SHEFFIELD VC, STONE EM. Clinical features associated with mutations in the chromosome 1 open-angle glaucoma gene (GLC1A). *N Engl J Med*. 1998; 9;338(15):1022-1027.
- ANDERSEN JS, PARRISH R, GREENFIELD D, DELBONO EA, HAINES JL, WIGGS JL. A second locus for the pigment dispersion syndrome and pigmentary glaucoma maps to 18q11-q21. *Am J Hum Genet Suppl*. 1998; 63:279, A279.
- ANDERSEN JS, PRALEA AM, DELBONO EA, HAINES JL, GORIN MB, SCHUMAN JS, MATTOX CG, WIGGS JL. A gene responsible for the pigment dispersion syndrome maps to chromosome 7q35-q36. *Arch Ophthalmol*. 1997; 115:384-388.
- ANZENBACHER P, ANZENBACHEROVA E. Cytochrome P450 and metabolism of xenobiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58 (2001), pp. 737–747.

- ARMALY MF, KRUEGER DE, MAUNDER L, BECKER B, HETHERINGTON J, KOLKER AE, LEVENE RZ, MAUMENEE AE, POLLACK IP, SHAFFER RN. Biostatistical analysis of the collaborative glaucoma study. *Arch. Ophthalmol.* 1980; 98 :2163-2171.
- AROCA-AGUILAR JD, SÁNCHEZ-SÁNCHEZ F, GHOSH S, COCA-PRADOS M, ESCRIBANO J. Myocilin mutations causing glaucoma inhibit the intracellular endoproteolytic cleavage of myocilin between amino acids Arg226 and Ile227. *J Biol Chem.* 2000; 280(22):21043-51.
- AUNG T, REZAIIE T, OKADA K, VISWANATHAN AC, CHILD AH, et al. Clinical features and course of patients with glaucoma with the E50K mutation in the optineurin gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005; 46: 2816–2822.
- BAIRD PN, FOOTE SJ, MACKEY DA, CRAIG J, SPEED TP, BUREAU A. Evidence for a novel glaucoma locus at chromosome 3p21-22. *Hum Genet.* 2005;117(2-3):249-57.
- BAIROCH A, APWEILER R, WU CH, BARKER WC, BOECKMANN B, FERRO S, et al. The Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res.* 2005; 33:D154-159.
- BAYAT B, YAZDANI S, ALAVI A, CHIANI M, CHITSAZIAN F, TUSI B K, SURI F, NAROOIE-NEJHAD M, SANATI MH, ELAHI E. Contributions of MYOC and CYP1B1 mutations to JOAG. *Mol Vis.* 2008; 14:508-517.
- BEJJANI BA, STOCKTON DW, LEWIS RA, TOMEY KF, DUEKER DK, JABAK M, ASTLE WF, LUPSKI JR. Multiple CYP1B1 mutations and incomplete penetrance in an inbred population segregating primary congenital glaucoma suggest frequent de novo events and a dominant modifier locus. *Hum Mol Genet.* 2000; 9(3):367-74.
- BELMOUDEN A, ADAM MF, DINECHIN SD, BRÉZIN AP, RIGAUULT P, CHUMAKOV I, BACH JF, GARCHON HJ. Recombinational, and physical mapping of the locus for primary open-angle glaucoma (GLC1A) on chromosome 1q23-q25. *Genomics.* 1997; 39:348-358.
- BHATTACHARJEE A, BANERJEE D, MOOKHERJEE S, ACHARYA M, BANERJEE A, RAY A, SEN A; INDIAN GENOME VARIATION CONSORTIUM, RAY K. Leu432Val polymorphism in CYP1B1 as a susceptible factor towards predisposition to primaryopen-angle glaucoma. *Mol Vis.* 2008;14:841-50.

- BRANDEN C-U, TOOZE J. Introduction to protein structure. In: Garland Science, ed. New York: Garland Science, 1999. 2nd edition, p 410.
- BUTERS JT, SAKAI S, RICHTER T, PINEAU T, ALEXANDER DL, SAVAS U, et al. Cytochrome P450 CYP1B1 determines susceptibility to 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene-induced lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96:1977–82.
- CABALLERO M, BORRAS T. Inefficient processing of an olfactomedin-deficient myocilin mutant: potential physiological relevance to glaucoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 282:662 – 670.
- CABALLERO M, ROWLETTE LL, BORRÁS T. Altered secretion of a TIGR/MYOC mutant lacking the olfactomedin domain. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1502, 447–460.
- CAMPOS-MOLLO E, LÓPEZ-GARRIDO MP, BLANCO-MARCHITE C, GARCIA-FEIJOO J, PERALTA J, BELMONTE-MARTÍNEZ J, AYUSO C, ESCRIBANO J. CYP1B1 mutations in Spanish patients with primary congenital glaucoma: phenotypic and functional variability. *Mol Vis*. 2009;15:417-31.
- CAPRIOLI J. Evaluation of optic disc and nerve fiber layer in glaucoma. In: Nussdorf JD. *Glaucoma in the Millennium*. The Hague: Kugler Publications. 2003; 107-14.
- CARBONE MA, AYROLES JF, YAMAMOTO A, MOROZOVA TV, WEST SA, MAGWIRE MM, MACKAY TFC, ANHOLT RRH. Overexpression of Myocilin in the Drosophila Eye Activates the Unfolded Protein Response: Implications for Glaucoma. *PLoS One*. 2009; 4(1):e4216.
- CHAKRABARTI S, DEVI KR, KOMATIREDDY S, KAUR K, PARIKH RS, MANDAL AK, CHANDRASEKHAR G, THOMAS R. Glaucoma-associated CYP1B1 mutations share similar haplotype backgrounds in POAG and PACG phenotypes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007; 48(12):5439-44.
- CHAKRABARTI S, KAUR K, KAUR I, MANDAL AK, PARIKH RS, THOMAS R, MAJUMDER PP. Globally, CYP1B1 mutations in primary congenital glaucoma are strongly structured by geographic and haplotype backgrounds. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006; 47(1):43-7.

- CHOUDHARY D, JANSSON I, REZAUL K, HAN DK, SARFARAZI M, SCHENKMAN JB. CYP1B1 protein in the mouse eye during development: An immunohistochemical study. *Drug Metab Dispos.* 2007; 35:987–94.
- COCA-PRADOS M, ESCRIBANO J, ORTEGO J. *Prog Retin Eye Res.* 1999; 18, 403– 429.
- DELUISE VP, ANDERSON DR. Primary infantile glaucoma (congenital glaucoma). *Surv Ophthalmol.* 1983; 28:1-19.
- DOSHI M, MARCUS C, BEJJANI BA, EDWARD DP. Immunolocalization of CYP1B1 in normal, human, fetal and adult eyes. *Exp Eye Res.* 2006; 82:24–32.
- FAN BJ, WANG DY, LAM DSC, PANG CP. Gene mapping for primary open angle glaucoma. *Clin Biochem.* 2006; 39:249-58.
- FAUTSCH MP, JOHNSON DH. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 2001; 42, 2324 –2331.
- FAUTSCH MP, VRABEL AM, JOHNSON DH. The identification of myocilin-associated proteins in the human trabecular meshwork. *Exp Eye Res.* 2006; 82:1046-1052.
- FILLA MS, LIU X, NGUYEN TD, et al. In vitro localization of TIGR/MYOC in trabecular meshwork extracellular matrix and binding to fibronectin. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002; 43:151-161.
- FINGERT JH, CLARK AF, CRAIG JE, ALWARD WL, SNIBSON GR, MCLAUGHLIN M, TUTTLE L, MACKEY DA, SHEFFIELD VC, STONE EM. Evaluation of the myocilin (MYOC) glaucoma gene in monkey and human steroid-induced ocular hypertension. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001; 42, 145-152.
- FINGERT JH, HÉON E, LIEBMANN JM, YAMAMOTO T, CRAIG JE, RAIT J, KAWASE K, HOH ST, BUYS YM, DICKINSON J, HOCKEY RR, WILLIAMS-LYN D, TROPE G, KITAZAWA Y, RITCH R, MACKEY DA, ALWARD WL, SHEFFIELD VC, STONE EM. Analysis of myocilin mutations in 1703 glaucoma patients from five different populations. *Hum Mol Genet.* 1999; 8(5):899-905.
- FINGERT JH, ROBIN AL, STONE JL, ROOS BR, DAVIS LK, SCHEETZ TE, BENNETT SR, WASSINK TH, KWON YH, ALWARD WL, MULLINS RF, SHEFFIELD VC, STONE EM. Copy number variations on chromosome 12q14 in patients with normal tension glaucoma. *Hum Mol Genet.* 2011; 15;20(12):2482-94.

- FINGERT, J. H., YING, L., SWIDERSKI, R. E., NYSTUEN, A. M., ARBOUR, N. C., ALWARD, W. L. M., SHEFFIELD, V. C., STONE, E. M. Characterization and comparison of the human and mouse GLC1A glaucoma genes. *Genome Res.* 1998; 8:377-384.
- FOSTER PJ, BUHRMANN R, QUIGLEY HA, JOHNSON GJ. The definition and classification of glaucoma in prevalence surveys. *Br J Ophthalmol.* 2002; 86: 238–42.
- GOBEIL S, RODRIGUE MA, MOISAN S, NGUYEN TD, POLANSKY JR, MORISSETTE J, RAYMOND V. Intracellular sequestration of hetero-oligomers formed by wild-type and glaucoma-causing myocilin mutants. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004; 45(10):3560-7.
- GOLDWICH A, SCHOLZ M, TAMM ER. Myocilin promotes substrate adhesion, spreading and formation of focal contacts in podocytes and mesangial cells. *Histochem Cell Biol.* 2009; 131:167-180.
- GONG G, KOSOKO-LASAKI O, HAYNATZKI GR, WILSON MR. Genetic dissection of myocilin glaucoma. *Hum Mol Genet.* 2004;13 Spec No 1:R91-102.
- GRAHAM-LORENCE S, PETERSON JA. P450s: structural similarities and functional differences. *FASEB J.* 1996; 10(2):206-14.
- GUENGERICH FP. Cytochrome P450. C. Ioannides (Ed.), *Enzyme Systems that Metabolize Drugs and Other Xenobiotics*, Wiley, New York (2002), pp. 33–65 Chapter 2.
- GULLO MR, COSTA VP, BERNARDI L, KARA-JOSE N. Condições visuais de pacientes glaucomatosos em um hospital universitário. *Arq Bras Oftalmol.* 1996; 59:147-150.
- HASLER JA, ESTABROOK R, MURRAY M, PIKULEVA I. Pharmacogenetics of cytochromes P450. *Mole Aspects Med.* 1999; 20:25–137.
- HAUSER MA, ALLINGHAM RR, LINKROUM K, WANG J, LAROCQUE-ABRAMSON K, et al. Distribution of WDR36 DNA sequence variants in patients with primary open-angle glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006; 47(6):2542-6.
- HEWITT AW, CRAIG JE, MACKEY DA. Complex genetics of complex traits: the case of primary open-angle glaucoma. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2006; 34:472–484.
- HEWITT AW, MACKEY DA, CRAIG JE. Myocilin Allele-Specific Glaucoma Phenotype Database. *Hum Mutat.* 2008; 29:207-211.

- HEWITT AW, SAMPLES JR, ALLINGHAM RR, JÄRVELÄ I, KITSOS G, KRISHNADAS SR, RICHARDS JE, LICHTER PR, PETERSEN MB, SUNDARESAN P, WIGGS JL, MACKEY DA, WIRTZ MK. Investigation of founder effects for the Thr377Met Myocilin mutation in glaucoma families from differing ethnic backgrounds. *Mol Vis.* 2007;13:487-92.
- HOFFMAN EA, PERKUMAS KM, HIGHSTROM LM, STAMER WD. Regulation of myocilin-associated exosome release from human trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50:1313-1318.
- HOVDING G, AESVED H. Prognostic factors in the development of manifest open angle glaucoma: A long-term follow-up study of hypertensive and normotensive eyes. *Acta Ophthalmol.* 1986; 64:601-608.
- <http://www.indiaglaucoma.com/aboutGlaucoma.html> (fevereiro de 2011).
- <http://www.medrounds.org/glaucoma-guide/2006/06/section-4-d-angle-closure-glaucoma.html>
- IP NY, IBÁÑEZ CF, NYE SH, MCCLAIN J, JONES PF, GIES DR, BELLUSCIO L, LE BEAU MM, ESPINOSA R 3rd, SQUINTO SP, et al. Mammalian neurotrophin-4: structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptorspecificity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992; 89(7):3060-4.
- JACOBSON N, ANDREWS M, SHEPARD AR, NISHIMURA D, SEARBY C, FINGERT JH, HAGEMAN G, MULLINS R, DAVIDSON BL, KWON YH, ALWARD WL, STONE EM, CLARK AF, SHEFFIELD VC. *Hum Mol Genet.* 2001; 10, 117–125.
- JAVITT JC. Preventing blindness in Americans: the need for eye health education. *Surv Ophthalmol.* 1995; 40:41-44.
- JOE MK, SOHN S, CHOI YR, PARK H, KEE C. Identification of flotillin-1 as a protein interacting with myocilin: Implications for the pathogenesis of primary open-angle glaucoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005, 336, 1201-1206.
- JOE MK, SOHN S, HUR W, MOON Y, CHOI YR, et al. Accumulation of mutant myocilins in ER leads to ER stress and potential cytotoxicity in human trabecular meshwork cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 312: 592–600.

- JOHNSON AT, RICHARDS JE, BOEHNKE M, STRINGHAM HM, HERMAN SB, WONG DJ, LICHTER PR. Clinical phenotype of juvenile-onset primary open-angle glaucoma linked to chromosome 1q. *Ophthalmology*. 1996; 103: 808–814.
- KANAGAVALLI J, KRISHNADAS SR, PANDARANAYAKA E, KRISHNASWAMY S, SUNDARESAN P. Evaluation and understanding of myocilin mutations in Indian primary open angle glaucoma patients. *Mol Vis*. 2003; 9: 606-14.
- KARALI A, RUSSELL P, STEFANI FH, TAMM ER. Localization of myocilin/trabecular meshwork-inducible glucocorticoid response protein in the human eye. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2000; 41, 729-740.
- KARAVANICH CA, ANHOLT RR. Molecular evolution of olfactomedin. *Mol Biol Evol*. 1998; 15, 718–726.
- KASAHARA, N. Rastreamento do polimorfismo TIGR/MYOC mt.1 (-1000C>G) em pacientes brasileiros com glaucoma primário de ângulo aberto e correlação com o risco e a gravidade da doença. In: Dissertação (Doutorado) Santa Casa de São Paulo. Faculdade de Ciências Médicas, 2009.
- KAUR K, MANDAL AK, CHAKRABARTI S. Primary Congenital Glaucoma and the Involvement of CYP1B1. *Middle East Afr J Ophthalmol*. 2011; 18(1):7-16.
- KIM R, EMI M, TANABE K, MURAKAMI S. Role of the unfolded protein response in cell death. *Apoptosis*. 2006; 11: 5–13.
- KIM BS, SAVINOVA OV, REEDY MV, MARTIN J, LUN Y, GAN L, SMITH RS, TOMAREV SI, JOHN SWM, JOHNSON RL. Targeted disruption of the myocilin gene (*Myoc*) suggests that human glaucoma-causing mutations are gain of function. *Molec Cell Biol*. 2001; 21: 7707-7713.
- KIMURA R, HONDA M. Effect of orally administered hydrocortisone on the rate of aqueous flow in man. *Acta Ophthalmol*. 1982, 60:584-589.
- KONG TH. Post-transcriptional modification of the gene genetically linked to juvenile open-angle glaucoma: novel transcripts in human ocular tissues. *Gene*. 2001; 280: 115-122.
- KRAWCZYŃSKI MR, CZARNY-RATAJCZAK M, PECOLD K, LATOS-BIELEŃSKA A. Only neutral polymorphisms found in the TIGR/myocilin gene of 45 Polish patients with primary open-angle glaucoma. *J Appl Genet*. 2004; 45(2):275-9.

- KUBOTA R, KUDOH J, MASHIMA Y, ASAKAWA S, MINOSHIMA S, HEJMANCIK JF, OGUCHI Y, SHIMIZU N. Genomic organization of the human myocilin gene (MYOC) responsible for primary open angle glaucoma (GLC1A). *Biochem Biophys Res Comm.* 1998; 242:396-400.
- KUBOTA R, NODA S, WANG Y, MINOSHIMA S, ASAKAWA S, KUDOH J, MASHIMA Y, OGUCHI Y, SHIMIZU N. A novel myosin-like protein (myocilin) expressed in the connecting cilium of the photoreceptor: molecular cloning, tissue expression, and chromosomal mapping. *Genomics.* 1997; 41:360-369.
- KUMAR A, BASAVARAJ MG, GUPTA SK, QAMAR I, ALI AM, BAJAJ V, RAMESH TK, PRAKASH DR, SHETTY JS, DORAIRAJ SK. Role of CYP1B1, MYOC, OPTN, and OPTC genes in adult-onset primary open-angle glaucoma: predominance of CYP1B1 mutations in Indian patients. *Mol Vis.* 2007; 13:667-76.
- LASKOWSKI RA, MACARTHUR MW, MOSS DS, THORNTON JM. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Crystallography.* 1993; 26:283.
- LESKE MC, CONNELL AMS, WU SY, HYMAN LG, SCHACHAT AP. Risk factors for open-angle glaucoma: the Barbados eye study. *Arch. Ophthalmol.* 1995; 113:918-924.
- LESKE MC, CONNELL AMS, SCHACHAT AP, HYMAN L. The Barbados eye study. *Arch.Ophthalmol.* 1994; 112 :821-829.
- LESKE MC. The epidemiology of open-angle glaucoma: a review. *Am J Epidemiol.* 1983; 118:166-191.
- LEWIS DFV. *Guide to Cytochromes P450 Structure and Function* Taylor & Francis, London (2001).
- LI Y, AROCA-AGUILAR JD, GHOSH S, SÁNCHEZ-SÁNCHEZ F, ESCRIBANO J, COCA-PRADOS M. Interaction of myocilin with the C-terminal region of hevin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 339, 797-804.
- LIBBY RT, GOULD DB, ANDERSON MG, JOHN SW. Complex genetics of glaucoma susceptibility. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2005; 6:15-44.

- LIBBY RT, SMITH RS, SAVINOVA OV, ZABALETA A, MARTIN JE, GONZALEZ FJ, et al. Modification of ocular defects in mouse developmental glaucoma models by tyrosinase. *Science*. 2003; 299:1578–81.
- LIN Y, LIU T, LI J, YANG J, DU Q, WANG J, et al. A genome-wide maps a novel autosomal dominant juvenile-onset open-angle glaucoma locus to 2p15-16. *Mol Vis*. 2008;14:739-44.
- LIU Y, VOLLRATH D. Reversal of mutant myocilin non-secretion and cell killing: implications for glaucoma. *Hum Mol Genet* 2004; 13:1193-204.
- 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(3):498-9.
- LÓPEZ-GARRIDO MP, SÁNCHEZ-SÁNCHEZ F, LÓPEZ-MARTÍNEZ F, AROCA-AGUILAR JD, BLANCO-MARCHITE C, COCA-PRADOS M, ESCRIBANO J. Heterozygous CYP1B1 gene mutations in Spanish patients with primary open-angle glaucoma. *Mol Vis*. 2006; 12:748-55.
- MELKI R, COLOMB E, LEFORT N, BRÉZIN AP, GARCHON HJ. CYP1B1 mutations in French patients with early-onset primary open-angle glaucoma. *J Med Genet*. 2004; 41(9):647-51.
- MELKI R, IDHAJJI A, DRIOUICHE S, HASSANI M, BOUKABBOUCHA A, AKHAYAT O, GARCHON H, BELMOUDEN A. Mutational analysis of the Myocilin gene in patients with primary open-angle glaucoma in Morocco. *Ophthalmic Genet*. 2003; 24(3):153-60.
- MICHELS-RAUTENSTRAUSS KG, MARDIN CY, BUDDE WM, LIEHR T, POLANSKY J, NGUYEN T, TIMMERMAN V, VAN BROECKHOVEN C, NAUMANN GOH, PFEIFFER RA, RAUTENSTRAUSS BW. Juvenile open angle glaucoma: fine mapping of the TIGR gene to 1q24.3-q25.2 and mutation analysis. *Hum Genet*. 1998; 102: 103-106.
- MITCHELL P, HOURIHAN F, SANDBACH J, WANH JJ. The relationship between glaucoma and myopia. *Ophthalmology*. 1999; 106:2010-2015.
- MONEMI S, SPAETH G, DASILVA A, POPINCHALK S, ILITCHEV E, LIEBMANN J, RITCH R, HEON E, CRICK RP, CHILD A. et al. Identification of a novel adult-onset primary open-angle glaucoma (POAG) gene on 5q22.1. *Hum Mol Genet*. 2005; 14, 725 – 733.

- MORISSETE J, CÔTÉ G, ANCTIL JL, PLANTE M, AMYOT M, HÉON E, TROPE GE, WEISSENBACH J, RAYMOND V. A common gene for juvenile and adult-onset primary open-angle glaucoma confined on chromosome 1q. *Am J Genet.* 1995; 56:1431-1442.
- MURRAY GI, MELVIN WT, GREENLEE WF, BURKE MD. Regulation, function, and tissue-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001; 41:297–316.
- MURRAY-RUST J, LEIPER J, MCALISTER M, PHELAN J, TILLEY S, SANTA MARIA J, VALLANCE P, MCDONALD N. Structural insights into the hydrolysis of cellular nitric oxide synthase inhibitors by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Nat Struct Biol.* 2001; 8(8):679-83. Erratum in: *Nat Struct Biol.* 2001; 8(9):818.
- NAGY I, TREXLER M, AND PATTHY L. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 302,554 –561.
- NAUMANN GOH, SCHLÖTZER-SCHREHARDT U, KÜCHLE M. Pseudoexfoliation syndrome for the comprehensive ophthalmologist. *Ophthalmology.* 1998; 105: 951-968.
- NESHICH G, TOGAWA RC, MANCINI AL, KUSER PR, YAMAGISHI ME, PAPPAS G JR, et al. STING Millennium: A web-based suite of programs for comprehensive and simultaneous analysis of protein structure and sequence. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31:3386-3392.
- NESHICH G, TOGAWA RC, MANCINI AL, KUSER PR, YAMAGISHI ME, PAPPAS G JR, et al. STING Millennium: A web-based suite of programs for comprehensive and simultaneous analysis of protein structure and sequence. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31:3386-3392.
- NGUYEN TD, CHEN P, HUANG WD, CHEN H, JOHNSON D, POLANSKY JR. Gene structure and properties of TIGR, an olfactomedin-related glycoprotein cloned from glucocorticoid-induced trabecular meshwork cells. *J Biol Chem.* 1998; 273:6341-6350.
- ORTEGO J, ESCRIBANO J, COCA-PRADOS M. Cloning and characterization of subtracted cDNAs from human ciliary body library encoding TIGR, a protein involved in juvenile open angle glaucoma with homology to myosin and olfactomedin. *FEBS Lett.* 1997; 413, 349–353.
- PANG CP, FAN BJ, CANLAS O, WANG DY, DUBOIS S, TAM PO, LAM DS, RAYMOND V, RITCH R. A genome-wide scan maps a novel juvenile-onset primary open angle glaucoma locus to chromosome 5q. *Mol Vis.* 2006; 12:85-92.

- PARK BC, SHEN X, FAUTSCH MP, TI BUDAN M, JOHNSON DH, YUE BY. Optimized bacterial expression of myocilin proteins and functional comparison of bacterial and eukaryotic myocilins. *Mol Vis.* 2006; 12:832-840.
- PARK BC, TIBUDAN M, SAMARAWEEERA M, SHEN X, YUE BYJT. Interaction between two glaucoma genes, optineurin and myocilin. *Genes Cells.* 2007; 12: 969-979.
- PASUTTO F, CHAVARRIA-SOLEY G, MARDIN CY, MICHELS-RAUTENSTRAUSS K, INGELMAN-SUNDBERG M, FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ L, WEBER BH, RAUTENSTRAUSS B, REIS A. Heterozygous loss-of-function variants in CYP1B1 predispose to primary open-angle glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010; 51(1):249-54.
- PASUTTO F, KELLER KE, WEISSCHUH N, STICHT H, SAMPLES JR, YANG YF, ZENKEL M, SCHLÖTZER-SCHREHARDT U, MARDIN CY, FREZZOTTI P, EDMUNDS B, KRAMER PL, GRAMER E, REIS A, ACOTT TS, WIRTZ MK. Variants in ASB10 are associated with open-angle glaucoma. *Hum Mol Genet.* 2011 Dec 20.
- PASUTTO F, MARDIN CY, MICHELS-RAUTENSTRAUSS K, WEBER BH, STICHT H, CHAVARRIA-SOLEY G, RAUTENSTRAUSS B, KRUSE F, REIS A. Profiling of WDR36 missense variants in German patients with glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008; 49(1):270-4.
- PASUTTO F, MATSUMOTO T, MARDIN CY, STICHT H, BRANDSTÄTTER JH, MICHELS-RAUTENSTRAUSS K, WEISSCHUH N, GRAMER E, RAMDAS WD, VAN KOOLWIJK LM, KLAVER CC, VINGERLING JR, WEBER BH, KRUSE FE, RAUTENSTRAUSS B, BARDE YA, REIS A. Heterozygous NTF4 mutations impairing neurotrophin-4 signaling in patients with primary open-angle glaucoma. *Am J Hum Genet.* 2009; 85(4):447-56.
- PEASE ME, MCKINNON SJ, QUIGLEY HA, KERRIGAN-BAUMRIND LA, ZACK DJ. Obstructed axonal transport of BDNF and its receptor TrkB in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000; 41(3):764-74.
- PETERS DM, HERBERT K, BIDDICK B, PETERSON JA. Myocilin binding to Hep II domain of fibronectin inhibits cell spreading and incorporation of paxillin into focal adhesions. *Exp Cell Res.* 2005; 303, 218-228.

- POLANSKY JR, FAUSS DJ, CHEN P, CHEN H, LUTJEN-DRECOLL E, JOHNSON D, KURTZ RM, MA ZD, BLOOM E, NGUYEN TD. *Ophthalmologica*. 1997; 211,126 –139.
- POLANSKY JR, KURTZ RM, ALVARADO JA, WEINREB RN, MITCHELL MD. Eicosanoid production and glucocorticoid regulatory mechanisms in cultured human trabecular meshwork cells. *Prod Clin Biol Res*. 1989; 312:113-138.
- POLANSKY JR, JUSTER RP, SPAETH GL. Association of the myocilin mt.1 promoter variant with the worsening of glaucomatous disease over time. *Clin Genet*. 2003; 64(1):18-27.
- Porter LF, Urquhart JE, O'Donoghue E, Spencer AF, Wade EM, Manson FD, Black GC. Identification of a novel locus for autosomal dominant primary open angle glaucoma on 4q35.1-q35.2. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011; 52(11):7859-65.
- POVOA C, MALTA RF, REZENDE MM, GIANNELLA-NETO D. Correlation between Genotype and Phenotype in Open Angle Glaucoma Brazilians' Families with Mutations in the Exon-3 of TIGR/MYOC Gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44: E-Abstract 1105.
- PUSKA P, LEMMELÄ S, KRISTO P, SANKILA EM, JÄRVELÄ I. Penetrance and phenotype of the Thr377Met Myocilin mutation in a large Finnish family with juvenile- and adult-onset primary open-angle glaucoma. *Ophthalmic Genet*. 2005; 26(1):17-23.
- QUIGLEY HA, BROMAN AT. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br J Ophthalmol*. 2006; 90:262–267.
- QUIGLEY HA. Glaucoma. *Lancet*. 2011; 16;377(9774):1367-77.
- QUILEY HA. Neuronal death in glaucoma. *Prog Retin Eye Res* 1999; 18:39-57.
- RAO KN, KAUR I, PARIKH RS, MANDAL AK, CHANDRASEKHAR G, THOMAS R, CHAKRABARTI S. Variations in NTF4, VAV2, and VAV3 genes are not involved with primary open-angle and primary angle-closure glaucomas in an indian population. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010; 51(10):4937-41.
- RAO PV, ALLINGHAM RR, EPSTEIN DL. TIGR/myocilin in human aqueous humor. *Exp Eye Res*. 2000; 71, 637-641.
- RAY K, MUKHOPADHYAY A, ACHARYA M. Recent advances in molecular genetics of glaucoma. *Mol Cell Biochem*. 2003; 253:223-31.
- RAYMOND V. Molecular genetics of the glaucomas: mapping of the first five “GLC” loci. *Am J Hum Genet*. 1997; 60:296-304.

- REDDY AB, PANICKERS G, MANDALA K, HASNAINS E, BALASUBRAMANIAN D. Identification of R368H as a predominant CYP1B1 allele causing primary congenital glaucoma in Indian patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003; 44(10):4200-4203.
- RENDIC S, DICARLO FJ. Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers and inhibitors. *Drug Metabolism Reviews*, 29 (1997), pp. 413–580.
- REZAIIE T, CHILD A, HITCHINGS R, BRICE G, MILLER L, COCA-PRADOS M, HEON E, KRUPIN T, RITCH R, KREUTZER D. et al. Adult-onset primary open-angle glaucoma caused by mutations in optineurin. *Science.* 2002; 295, 1077 – 1079.
- RICHARDS JE, LICHTER PR, BOEHNKE M, URO JLA, TORREZ D, WONG D, JOHNSON T. Mapping of a gene for autosomal dominant juvenile-onset open angle glaucoma to chromosome 1q. *Am J Genet.* 1994; 56:62-70.
- RICHTER CU, RICHADSON TM, GRANT WM. Pigmentary dispersion syndrome and pigmentar glaucoma. *Arch Ophthalmol.* 1986; 104:211-215.
- RITCH R., LOWE RF. Angle-closure glaucoma: clinical types. In: RITCH R, SHIELDS MB, KRUPIN T. *The Glaucomas* . 2 ed. Saint Louis. Mosby-Year Book, 1996. v.2 p.821-840.
- RUSSELL P, TAMM ER, GREHN FJ, PICHT G, JOHNSON M. The presence and properties of myocilin in the aqueous humor. *Invest. Ophthalmol Vis Sci.* 2001; 42, 983–986.
- SAKAI H, SHEN X, KOGA T, et al. Mitochondrial association of myocilin, product of a glaucoma gene, in human trabecular meshwork cells. *J Cell Physiol.* 2007;213:775-784.
- SALI A, BLUNDELL TL. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol.* 1993; 234:779-815.
- SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T. *Molecular cloning: a laboratory manual.* 2nd ed. Cold Spring Harbor (NY). Cold Spring Harbor Press. 1989;17-19.
- SANGER F, COULSON AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol.* 1975; 94(3):441-448.
- SARFARAZI M, AKARSU AN, HOSSAIN A, TURACLI ME, AKTAN SG, BARSOUM-HOMSY M, et al. Assignment of a locus (GLC3A) for primary congenital glaucoma (Buphthalmos) to 2p21 and evidence for genetic heterogeneity. *Genomics.* 1995; 30:171–7.

- SARFARAZI M, CHILD A, SOILOVA D, BRICE G, DESAI T, TRIFAN OC, et al. Localization of the fourth locus (GLC1E) for adult-onset primary open-angle glaucoma to the 10p15-p14 region. *Am J Hum Genet.* 1998; 62:641-52.
- SARFARAZI M. Recent advances in molecular genetics of glaucomas. *Hum Mol Genet.* 1997; 6:1667-77.
- SHEFFIELD VC, STONE EM, ALWARD WLM, DRACK AV, JOHNSON AT, STREB LM, NICHOLS BE. Genetic linkage of familial open angle glaucoma to chromosome 1q21-q31. *Nat Genet.* 1993; 4:47-50.
- SHEPARD AR, JACOBSON N, SUI R, et al. Characterization of rabbit myocilin: Implications for human myocilin glycosylation and signal peptide usage. *BMC Genet.* 2003;4:5.
- SHIELDS MB, RITCH R, KRUPING T. Classification of glaucomas. In: RITCH R, SHIELDS MB, KRUPIN T. *The Glaucomas.* 2 ed. Saint Louis. Mosby-Year Book, 1996. v.2 p.717-725.
- SHIMADA T, HAYES CL, YAMAZAKI H, AMIN S, HECHT SS, GUENGERICH FP, et al. Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P-4501B1. *Cancer Res.* 1996; 56:2979–84.
- SHIMIZU S, LICHTER PR, JOHNSON AT, ZHOU Z, HIGASHI M, GOTTFREDSOTTIR M, OTHMAN M, MOROI SE, ROZSA FW, SCHERTZER RM, CLARKE MS, SCHWARTZ AL, DOWNS CA, VOLLRATH D, RICHARDS JE. Age-dependent prevalence of mutations at the GLC1A locus in primary open-angle glaucoma. *Am J Ophthalmol.* 2000; 130(2):165-77.
- SHIOSE Y, KITAZAWA Y, TSUKAHARA S, AKAMATSU T, MIZOKAMI K, FUTA R, KATSUSHIMA H, KOSAKI H. Epidemiology of glaucoma in japan: a nationwide glaucoma survey. *Jpn J Ophthalmol.* 1991; 133-155.
- SKUTA GL, MORGAN RK. Corticosteroid-induced glaucoma. In: RITCH R, SHIELDS MB, KRUPIN T. *The Glaucomas.* 2 ed. Saint Louis. Mosby-Year Book, 1996. v.2 p.1177-1188.
- SMITH AF, SMITH JG. The economic burden of global blindness: a price too high! *Br J Ophthalmol.* 1996; 80:276-277.
- SNYDER DA, RIVERS AM, YOKOE H, MENCO BP, ANHOLT RR. Olfactomedin: purification, characterization, and localization of a novel olfactory glycoprotein. *Biochemistry.* 1991; 30, 9143–9153.

- STAMER WD, PERKUMAS KM, HOFFMAN EA, ROBERTS BC, EPSTEIN DL, MCKAY BS. Coiled-coil targeting of myocilin to intracellular membranes. *Exp Eye Res.* 2006; 83:1386-1395.
- STOILOV I, AKARSU AN, SARFARAZI M. Identification of three different truncating mutations in cytochrome P450 1B1 (CYP1B1) as the principal cause of primary congenital glaucoma (buphthalmos) in families linked to the GLC3A locus on chromosome 2p21. *Hum Mol Genet.* 1997; 6:641-7.
- STOILOV I, AKARSU AN, ALOZIE I, CHILD A, BARSOUM-HOMSY M, TURACLI ME, OR M, LEWIS RA, OZDEMIR N, BRICE G, AKTAN SG, CHEVRETTE L, COCA-PRADOS M, SARFARAZI M. Sequence analysis and homology modeling suggest that primary congenital glaucoma on 2p21 results from mutations disrupting either the hinge region or the conserved core structures of cytochrome P4501B1. *Am J Hum Genet.* 1998; 62(3):573-84.
- STOILOV IR, COSTA VP, VASCONCELLOS JP, MELO MB, BETINJANE AJ, CARANI JC, OLTROGGE EV, SARFARAZI M. Molecular genetics of primary congenital glaucoma in Brazil. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002; 43(6):1820-1827.
- 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.* 1996; 36:142-150.
- STOILOVA D, CHILD A, BRICE G, DESAI T, BARSOUM-HOMSY M, OZDEMIR N, CHEVRETTE L, ADAM MF, GARCHON HJ, PITTS CRICK R, SARFARAZI M. Novel TIGR/MYOC mutations in families with juvenile onset primary open angle glaucoma. *J Med Genet.* 1998; 35(12):989-992.
- STONE EM, FINGERT JH, ALWARD WLM, NGUYEN TD, POLANSKY JR, SUNDEN SLF, NISHIMURA D, CLARK AF, NYSTUEN A, NICHOLS BE, MACKEY DA, RITCH R, KALENAK JW, CRAVEN ER, SHEFFIELD VC. Identification of a gene that causes primary open angle glaucoma. *Science.* 1997; 275:668-670.
- SURGUCHEVA I, PARK BC, YUE BY, TOMAREV S, SURGUCHOV A. Interaction of myocilin with gamma-synuclein affects its secretion and aggregation. *Cell. Mol. Neurobiol.* 2005; 25, 1009-1033.

- SURI F, KALHOR R, ZARGAR SJ, NILFOROOSHAN N, YAZDANI S, NEZARI H, PAYLAKHI SH, NAROOIE-NEJHAD M, BAYAT B, SEDAGHATI T, AHMADIAN A, ELAHI E. Screening of common CYP1B1 mutations in Iranian POAG patients using a microarray-based PrASE protocol. *Mol Vis.* 2008;14:2349-56.
- SURIYAPPERUMA SP, 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(1):86-92.
- SUTTER T R, GUZMAN K, DOLD KM, GREENLEE WF. *Science.* 1991; 254, 415-418.
- SUTTER TR, TANG YM, HAYES CL, WO YP, JABS EW, LI X, YIN H, CODY CW, GREENLEE WF. Complete cDNA Sequence of a human dioxin-inducible mRNA identifies a new gene subfamily of cytochrome P450 that maps to chromosome 2. *J Biol Chem.* 1994; 269(18):13092-9.
- SWIDERSKI RE, ROSS JL, FINGERT JH, CLARK AF, ALWARD WL, STONE EM, SHEFFIELD VC. Localization of MYOC transcripts in human eye and optic nerve by in situ hybridization. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2000; 41, 3420-3428.
- TAN JC, PETERS DM, KAUFMAN PL. Recent developments in understanding the pathophysiology of elevated intraocular pressure. *Curr Opin Ophthalmol.* 2006;17:168-174.
- TANG YM, WO YYP, STEWART J, HAWKINS AL, GRIFFIN CA, SUTTER TR, GREENLEE WF. Isolation and characterization of the human cytochrome P450 CYP1B1 gene. *J Biol Chem.* 1996; 271: 28324-28330.
- THOMPSON JD, HIGGINS DG, GIBSON TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994; 22:4673- 4680.
- TIELSCH JM, SOMMER A, KATZ J, ROYALL RM, QUIGLEY HA, JAVITT J. Racial variations in the prevalence of primary open-angle glaucoma: the Baltimore eye survey. *J Am Med Assoc.* 1991; 266:369-374.
- TOMAREV SI, WISTOW G, RAYMOND V, DUBOIS S, MALYUKOVA I. Gene expression profile of the human trabecular meshwork: NEIBank sequence tag analysis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003; 44(6):2588-96.

- TORRADO M, TRIVEDI R, ZINOVIEVA R, KARAVANOVA I, TOMAREV SI. Optimedlin: A novel olfactomedin-related protein that interacts with myocilin. *Hum. Mol. Genet.* 2002; 11, 1291-301.
- TRIFAN OC, TRABOULSI EI, STOILOVA D, ALOZIE I, NGUYEN R, RAJA S, SARFARAZI M. A third locus (GLC1D) for adult-onset primary open-angle glaucoma maps to the 8q23 region. *Am J Ophthalmol.* 1998; 126(1):17-28.
- UEDA J, WENTZ-HUNTER K, YUE BY. Distribution of myocilin and extracellular matrix components in the juxtacanalicular tissue of human eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43:1068-1076.
- UEDA J, WENTZ-HUNTER KK, CHENG EL, FUKUCHI T, ABE H, YUE BY. Ultrastructural localization of myocilin in human trabecular meshwork cells and tissues. *J Histochem Cytochem* 2000; 48:1321-1330.
- UEDA J, YUE BY. Distribution of myocilin and extracellular matrix components in the corneoscleral meshwork of human eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003; 44:4772-4779.
- VASCONCELLOS JPC, MELO MB, COSTA VP, TSUKUMO DML, BASSÈRES DS, BORDIN S, SAAD STO, COSTA FF. Novel mutation in the MYOC gene in primary open angle glaucoma patients. *Journal of Medical Genetics.* 2000; 37: 301-303.
- VASCONCELLOS JPC, MELO MB, SHIMITI RB, COSTA FF, COSTA VP. Penetrance and phenotype of the Cys433Arg myocilin mutation in a family pedigree with primary open-angle glaucoma. *J Glaucoma.* 2003; 12(2):104-107.
- VASCONCELLOS JPC. Avaliação da frequência e do tipo de mutações no gene TIGR/MYOC em uma população Brasileira com glaucoma primário de ângulo aberto do tipo juvenil. In: *Dissertação (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas,* 2001.
- VASILIOU V, GONZALEZ FJ. Role of CYP1B1 in glaucoma. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2008; 48:333-58.
- VINCENT AL, BILLINGSLEY G, BUYS Y, LEVIN AV, PRISTON M, TROPE G, WILLIAMS-LYN D, HÉON E. Digenic inheritance of early-onset glaucoma: CYP1B1, a potential modifier gene. *Am J Hum Genet.* 2002; 70(2):448-60.

- 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(12):5315-21.
- WEISSCHUH N, NEUMANN D, WOLF C, WISSINGER B, GRAMER E. Prevalence of myocilin and optineurin sequence variants in German normal tension glaucoma patients. *Mol Vis.* 2005; 11:284-7.
- WEISSCHUH N, WOLF C, WISSINGER B, GRAMER E. Variations in the WDR36 gene in German patients with normal tension glaucoma. *Mol Vis.* 2007; 16:13:724-9.
- WENTZ-HUNTER K, KUBOTA R, SHEN X, YUE BY. Extracellular myocilin affects activity of human trabecular meshwork cells. *J Cell Physiol.* 2004; 200:45-52.
- WENTZ-HUNTER K, UEDA J, SHIMIZU N, YUE BY. Myocilin is associated with mitochondria in human trabecular meshwork cells. *J Cell Physiol.* 2002; 190:46-53.
- WENTZ-HUNTER K, UEDA J, YUE BY. Protein interactions with myocilin. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002; 43:176-182.
- WIGGS JL, DEL BONO EA, SCHUMAN JS, HUTCHINSON T, WALTON DS. Clinical features of five pedigrees genetically linked to the juvenile glaucoma locus on chromosome 1q21-a31. *Ophthalmology.* 1995; 102:1782-1789.
- WIGGS JL, HAINES JL, PAGLINAUAN C, FINE A, SPORN C, LOU D. Genetic linkage of autosomal dominant juvenile glaucoma to 1q21-q31 in three affected pedigrees. *Genomics.* 1994; 21:299-303.
- WIGGS JL, VOLLRATH D. Molecular and clinical evaluation of a patient hemizygous for TIGR/MYOC. *Arch Ophthalmol.* 2001; 119: 1674-1678.
- WIGGS JL, ALLINGHAM RR, VOLLRATH D, JONES KH, DE LA PAZ M, KERN J, PATTERSON K, BABB VL, DEL BONO EA, BROOMER BW, PERICAK-VANCE MA, HAINES JL. Prevalence of mutations in TIGR/Myocilin in patients with adult and juvenile primary open-angle glaucoma. *Am J Hum Genet.* 1998; 63(5):1549-52.
- 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.

- WILLOUGHBY CE, CHAN LL, HERD S, BILLINGSLEY G, NOORDEH N, LEVIN AV, BUYS Y, TROPE G, SARFARAZI M, HÉON E. Defining the pathogenicity of optineurin in juvenile open-angle glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004; 45(9):3122-30.
- WIRTZ MK, SAMPLES JR, RUST K, LIC J, NORDLING L, SCHILLING K, ACOTT TS, KRAMER PL. GLC1F, a new primary open-angle glaucoma locus, maps to 7q35-q36. *Arch. Ophthalmol.* 1999; 117:237-241.
- WIRTZ MK, SAMPLES JR, KRAMER PL, RUST K, TOPINKA JR, YOUNT J, KOLER RD, ACOTT TS. Mapping a gene for adult-onset primary open-angle glaucoma to chromosome 3q. *Am J Hum Genet.* 1997; 60(2):296-304.
- WORDINGER RJ, CLARK AF. Effects of glucocorticoids on the trabecular meshwork: towards a better understanding of glaucoma. *Prog Ret Eye Res.* 1999; 18:629-667.
- WORMALD RP, BASAURI E, WRIGHT, LA, EVANS JR. The African Caribbean eye survey: risk factors for glaucoma in a sample of African Caribbean people living in London. *Eye.* 1994; 8:315-320.
- WU SY, NEMESURE B, LESKE MC. Glaucoma and myopia, *Ophthalmology*, 2000; 106:2010-2015.
- YOKOE H, ANHOLT RR. Molecular cloning of olfactomedin, an extracellular matrix protein specific to olfactory neuroepithelium. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 15, 4655–4659.
- ZHUO YH, WEI YT, BAI YJ, DUAN S, LIN MK, SARAGOVIC HU, GE J. Pro370Leu MYOC gene mutation in a large Chinese family with juvenile-onset open angle glaucoma: correlation between genotype and phenotype. *Mol Vis.* 2008; 22(14):1533-15

ANEXO

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas.



CEP, 19/01/10
(Grupo III)

PARECER CEP: Nº 1224/2009 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0945.0.146.000-09

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “AVALIAÇÃO DE ALELOS MUTANTES DOS GENES MYOC E CYP1B1 EM PACIENTES PORTADORES DE GLAUCOMA PRIMÁRIO DE ÂNGULO ABERTO”

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Carolina Ayumi Braghini

INSTITUIÇÃO: Hospital das Clínicas/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 11/12/2009

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 19/01/11 (O formulário encontra-se no *site* acima)

II - OBJETIVOS

O objetivo da pesquisa é analisar o fenótipo e o genótipo em relação aos genes myoc e cyp1b1, para melhor compreender o papel destes genes no desenvolvimento do glaucoma primário de ângulo aberto na população brasileira

III - SUMÁRIO

Os pacientes serão recrutados no serviço de glaucoma do ambulatório de oftalmologia do HC da Unicamp, onde 4 famílias portadoras dos genes descrito já foram captadas, perfazendo um total de 130 indivíduos, estas famílias são provenientes dos estados de São Paulo e Paraná e foram captadas durante o período de um projeto de pesquisa de iniciação científica da mesma aluna. Além destas famílias, 40 pacientes serão recrutados do ambulatório de oftalmologia e portadores do genes mutantes. Serão coletadas até 20 ml de sangue periférico e encaminhados ao laboratório para estudos genéticos (estão bem detalhados no projeto)

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O estudo busca compreender o papel de alguns genes no desenvolvimento do glaucoma primário de ângulo aberto na população brasileira, auxiliando o diagnóstico precoce permitindo estabelecer tratamento mais precoce. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido está adequado, a pesquisa será busca financiamento da FAPESP. Os sujeitos não estão expostos à riscos.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13083-887 Campinas - SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br



restrições o Protocolo de Pesquisa, o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, bem como todos os anexos incluídos na pesquisa supracitada.

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

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

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

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

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

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

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

VII – DATA DA REUNIÃO

Homologado na I Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 19 de janeiro de 2010.

Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP