

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

**Polimorfismo do gene *TP53* (códon 72) em  
indivíduos caucasóides portadores de glaucoma  
primário de ângulo aberto**

**MÁRCIA ABELIN VARGAS**

**RIBEIRÃO PRETO**

**2009**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**MÁRCIA ABELIN VARGAS**

**Polimorfismo do gene *TP53* (códon 72) em  
indivíduos caucasóides portadores de glaucoma  
primário de ângulo aberto**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina  
de Ribeirão Preto da Universidade de São  
Paulo para obtenção do Título de Doutor em  
Ciências Médicas.

**Área de Concentração:** Mecanismos  
Fisiopatológicos nos Sistemas Visual e  
Audio-Vestibular.

**Orientadora:** Profa. Dra. Maria de Lourdes Veronese Rodrigues

**RIBEIRÃO PRETO**

**2009**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

## FICHA CATALOGRÁFICA

Vargas, Márcia Abelin

Polimorfismo do gene *TP53* (códon 72) em indivíduos caucasóides portadores de glaucoma primário de ângulo aberto. Ribeirão Preto, 2009.

90p.: il.; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de Concentração: Mecanismos Fisiopatológicos nos Sistemas Visual e Audio-Vestibular.

Orientadora: Rodrigues, Maria de Lourdes Veronese

1. Gene p53; 2. Genética dos glaucomas; 3. Glaucoma primário de ângulo aberto; 4. Apoptose; 5. Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço.

## *DEDICATÓRIA*

*À minha amada e tão esperada filha Cássia,  
luz da minha vida.*

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

À Professora Doutora Maria de Lourdes Veronese Rodrigues, minha orientadora, minha estimuladora, minha amiga. É difícil colocar em palavras o carinho, respeito, a admiração e o amor que tenho por esta conterrânea, indescritivelmente carismática e prestativa, que com seu conhecimento e capacidade científica me propiciou, com paciência, a dar mais um passo no caminho da pesquisa, através deste trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Sérgio da Silva Fialho, meu “eterno namorado”, por tudo, especialmente por ser o maior incentivador dos meus projetos.

Aos meus pais, Leila Alves Abelin e Luiz Carlos Vargas, pelo amor incondicional.

À minha irmã, Patrícia Abelin Vargas, pela prestatividade, compreensão e presença constante nos momentos em que mais precisei.

Ao professor Doutor Eduardo Antônio Donadi, por ter “aberto as portas” do Laboratório de Imunologia Molecular do HCFMRP-USP, sem o qual este trabalho não seria realizado.

À biomédica Doutora Neifi Hassan Saloum Deghaide, pelo auxílio imensurável no meu aprendizado das técnicas laboratoriais realizadas no presente trabalho, demonstrando sempre disposição e simpatia. Nossa convivência foi mais que profissional, foi de amizade.

Ao biomédico Doutor Erick da Cruz Castelli, pela prestatividade, profissionalismo, competência e ética ao elaborar o método empregado e conferir os resultados das leituras “duvidosas” da PCR-RFLP.

À biomédica Doutora Renata Toscano Simões, pela paciência e auxílio nas primeiras PCR-RFLP.

À Elisete Maia Gonçalves Silva, técnica em campimetria visual, pelo auxílio na obtenção dos campos visuais dos pacientes.

Ao colega Marcelo Jordão Lopes da Silva, especialista em glaucoma, por ter atuado como “juiz” na avaliação dos campos visuais.

À Maria Cecília Onofre, por formatar e providenciar todo o necessário para a impressão e encadernação do trabalho, sempre prestativa, amiga e profissional competente.

À Amélia Baruffi, Rita Amâncio Diegues, ao Rogério Mazzucato Castania, e Edson Lúcio Beragua, secretárias, secretário e bibliotecário do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da FMRP-USP, pela amizade e apoio desde que cheguei em 2003 para iniciar o Mestrado;

A todos os que, direta ou indiretamente, me apoiaram e auxiliaram na concretização deste trabalho.

*Muito obrigada!*

Para a realização deste estudo a autora recebeu suporte financeiro do CNPq-Projeto 8991/2001.



## **LISTA DE ABREVIATURAS**

---

<b>Arg, Arg72-</b>	arginina
<b>CGR-</b>	células ganglionares retinianas
<b>CPH-</b>	Complexo Principal de Histocompatibilidade
<b>DNA-</b>	ácido desoxirribonucléico
<b>FMRP-USP-</b>	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-Universidade de São Paulo
<b>GPAA-</b>	glaucoma primário de ângulo aberto
<b>GPN-</b>	glaucoma de pressão normal
<b>HCFMRP-USP-</b>	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
<b>HLA-</b>	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
<b>kDa-</b>	KiloDalton
<b>MYOC-</b>	gene miocilina
<b>NO-</b>	nervo óptico
<b>OPTN-</b>	gene optineurina
<b>pb-</b>	pares de base
<b>PCR-</b>	Reação em cadeia catalisada pela polimerase
<b>PIO-</b>	pressão intra-ocular
<b>Pro, Pro72-</b>	prolina
<b>RFLP-</b>	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
<b><math>\chi^2</math>-</b>	Qui-Quadrado

## **LISTA DE FIGURAS**

---

- Figura 1:** Distribuição dos pacientes do Grupo I (GPAA), por faixa etária. Ribeirão Preto, SP. 2006-2008 .....38
- Figura 2:** Distribuição dos componentes do Grupo II (controles), por faixa etária. Ribeirão Preto, SP. 2006-2008.....39
- Figura 3:** PCR-RFLC para a detecção do polimorfismo Arg72Pro no éxon 4 do gene *TP53*, digeridos com a enzima de *BseDI*. Linha 1: homozigoto Pro/Pro. Linha 2: homozigoto Arg/Arg. Linha 3: heterozigoto Arg/Pro. M= marcador de peso molecular (100 pb). Gel de poliacrilamida 10% não desnaturante, corado com nitrato de prata..... 48

## **LISTA DE TABELAS**

---

<b>Tabela 1-</b> Distribuição dos genótipos Pro/Pro, Arg/Arg e Arg/Pro nos 51 pacientes com GPAA. Ribeirão Preto, SP. 2006-2008. ....	49
<b>Tabela 2-</b> Distribuição dos genótipos Pro/Pro, Arg/Arg e Arg/Pro nos 72 controles. Ribeirão Preto, SP. 2006-2008 .....	50
<b>Tabela 3-</b> Números absolutos (N) e números relativos (%), de acordo com o polimorfismo (Pro/Pro, Arg/Arg e Arg/Pro) do gene <i>TP53</i> (códon 72) nos casos e controles. Ribeirão Preto, SP. 2006-2008. ....	52
<b>Tabela 4-</b> Números absolutos (N) e números relativos (%), da distribuição alélica em pacientes com GPAA e controles Ribeirão Preto, SP. 2006-2008.....	53
<b>Tabela 5-</b> Cálculo dos valores de probabilidade ( <b>p</b> ) para o genótipo do polimorfismo do gene <i>TP53</i> (códon 72). Ribeirão Preto, SP. 2006-2008 .....	53
<b>Tabela 6-</b> Distribuição dos genótipos Pro/Pro, Arg/Arg e Arg/Pro em quatro pacientes com GPAA e de um dos haplótipos, de classe I, HLA A1-B8 ou HLA A2-B40 . Ribeirão Preto, SP. 2006-2008. ....	54
<b>Tabela 7-</b> Distribuição dos genótipos Pro/Pro, Arg/Arg e Arg/Pro em 23 pacientes com GPAA que não apresentam nenhuns dos haplótipos HLA de classe I, HLA A1-B8 ou HLA A2-B40. Ribeirão Preto, SP. 2006-2008.....	54
<b>Tabela 8-</b> Distribuição alélica (N e %) em pacientes com GPAA que apresentam haplótipos HLA de classe I associados a glaucoma e pacientes que não apresentam nenhuns dos haplótipos HLA, de classe I, HLA A1-B8 ou HLA A2-B40. Ribeirão Preto, SP. 2006-2008. ....	55
<b>Tabela 9-</b> Genótipo do polimorfismo do gene <i>TP53</i> (códon 72) em pacientes com glaucoma, com e sem haplótipos de classe I a eles relacionados. Ribeirão Preto, SP. 2006-2008.....	55
<b>Tabela 10-</b> Distribuição dos genótipos Pro/Pro, Arg/Arg e Arg/Pro em sete controles que apresentam um dos haplótipos, de classe I, HLA A1-B8 ou HLA A2-B40 . Ribeirão Preto, SP. 2006-2008. ....	56

- Tabela 11-** Distribuição dos genótipos Pro/Pro, Arg/Arg e Arg/Pro em 65 controles que não apresentam nenhuns dos haplótipos HLA, de classe I, HLA A1-B8 ou HLA A2-B40. Ribeirão Preto, SP. 2006-2008..... 56
- Tabela 12-** Distribuição alélica (N e %) em controles que apresentam haplótipos HLA de classe I associados a glaucoma e em controles que não apresentam nenhuns dos haplótipos HLA, de classe I, HLA A1-B8 ou HLA A2-B40. Ribeirão Preto, SP. 2006-2008..... 58
- Tabela 13-** Genótipo do polimorfismo do gene *TP53* (códon 72) em controles, com e sem haplótipos de classe I a eles relacionados. Ribeirão Preto, SP. 2006-2008..... 58
- Tabela 14-** Distribuição alélica (N e %) em pacientes que apresentam haplótipos HLA de classe I associados a glaucoma e em controles que apresentam um dos haplótipos HLA, de classe I, HLA A1-B8 ou HLA A2-B40. Ribeirão Preto, SP. 2006-2008..... 59
- Tabela 15-** Genótipo do polimorfismo do gene *TP53* (códon 72) em pacientes com glaucoma, com haplótipos de classe I a eles relacionados e em controles com haplótipos. Ribeirão Preto, SP. 2006-2008..... 59
- Tabela 16-** Distribuição alélica (N e %) em pacientes que não apresentam haplótipos HLA de classe I associados a glaucoma e em controles que não apresentam nenhuns dos haplótipos HLA, de classe I, HLA A1-B8 ou HLA A2-B40. Ribeirão Preto, SP. 2006-2008..... 60
- Tabela 17-** Genótipo do polimorfismo do gene *TP53* (códon 72) em pacientes com glaucoma, sem haplótipos de classe I a eles relacionados e em controles sem haplótipos. Ribeirão Preto, SP. 2006-2008..... 60
- Tabela 18-** Distribuição alélica (N e %) no total de pacientes com GPAA e controles que não apresentam nenhuns dos haplótipos HLA, de classe I, HLA A1-B8 ou HLA A2-B40. Ribeirão Preto, SP. 2006-2008..... 61
- Tabela 19-** Genótipo do polimorfismo do gene *TP53* (códon 72) em pacientes com glaucoma, com e sem haplótipos de classe I a eles relacionados e em controles sem haplótipos. Ribeirão Preto, SP. 2006-2008 ..... 61

**RESUMO**

---



Vargas, M.A. **Polimorfismo do gene TP53 (códon 72) em indivíduos caucasóides portadores de glaucoma primário de ângulo aberto.** Ribeirão Preto, 2009. 90f. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Partindo-se do pressuposto de que o gene *TP53* teria um papel importante na apoptose que ocorre na neuropatia óptica glaucomatosa, o polimorfismo do gene *TP53* (códon 72) foi estudado em diferentes populações, com resultados conflitantes. Como esse polimorfismo não foi estudado em pacientes brasileiros com glaucoma primário de ângulo aberto (GPAA), os objetivos do presente estudo foram: determinar a distribuição dos genótipos Pro/Pro, Arg/Arg e Arg/Pro e dos alelos Pro e Arg do gene *TP53* (códon 72) em uma amostra dessa população; e verificar a associação desses genótipos com o GPAA. Participaram do estudo cinquenta e um pacientes com GPAA e setenta e dois indivíduos sadios (grupo controle). O diagnóstico do GPAA foi baseado na gonioscopia, tonometria, oftalmoscopia e perimetria de Goldmann. O DNA foi amplificado através da reação em cadeia catalisada pela polimerase. A região do éxon 4 do gene *TP53* foi amplificada e digerida através da enzima de restrição *BseDI*. O genótipo Arg/Pro foi o mais frequente nos pacientes brasileiros com GPAA, mas não houve diferença estatística quando feita a comparação com os controles ( $p=0,47$ ). Os resultados não indicam associação de nenhum dos genótipos do polimorfismo do gene *TP53* (códon 72) com o GPAA.

**Palavras-chave:** gene *TP53*, glaucoma primário de ângulo aberto, genética do glaucoma, apoptose.

## **ABSTRACT**

---

Vargas, M.A. **Polymorphism of the *TP53* gene (codon 72) in caucasoid individuals with primary open-angle glaucoma.** 90f. Thesis (Doctoral) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Based on the assumption that gene *TP53* may play an important role in the apoptosis that occurs in glaucomatous optic neuropathy, gene *TP53* (codon 72) polymorphism has been studied in different populations, with conflicting results. Since polymorphism has not been studied in the Brazilian primary open-angle glaucoma (POAG) patients, the objectives of the present study were: to determine the distribution of the Pro/Pro, Arg/Arg and Arg/Pro genotypes and the distribution of the Pro and Arg alleles of gene *TP53* (codon 72) in a sample of this population; and to verify the association of these genotypes with POAG. The study was conducted on 51 patients with POAG and 72 healthy individuals (control group). POAG diagnosis was based in gonioscopy, tonometry, ophthalmoscopy and Goldmann perimetry. DNA was amplified by polymerase chain reaction. The exon 4 region of gene *TP53* was amplified and digested with the restriction enzyme *BseDI* (restriction fragment length polymorphism). The Arg/Pro genotype was the most frequent in Brazilian patients with POAG, but its frequency did not differ significantly from that observed in the controls ( $p=0,47$ ). The results indicate lack of association of any genotype of *TP53* (codon 72) polymorphism with POAG.

**Keywords:** *TP53* gene, primary open-angle glaucoma, genetics of glaucoma, apoptosis.

## SUMÁRIO

<b>1- INTRODUÇÃO .....</b>	<b>19</b>
1.1. O GLAUCOMA PRIMÁRIO DE ÂNGULO ABERTO .....	20
1.1.1. Aspectos gerais .....	20
1.1.2. Aspectos genéticos .....	23
1.2. O GENE <i>TP53</i> .....	25
1.2.1. Aspectos gerais .....	25
1.2.2. Polimorfismo .....	26
1.2.3. Associação com o glaucoma primário de ângulo aberto .....	27
1.3. O COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE (CPH) .....	29
1.3.1. Aspectos gerais .....	29
1.3.2. Associação entre HLA e as doenças .....	30
1.3.3. Associação com o glaucoma primário de ângulo aberto .....	31
<b>2- OBJETIVOS .....</b>	<b>33</b>
<b>3- MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
3.1. CASUÍSTICA .....	36
3.1.1. Grupo I: Pacientes portadores de glaucoma primário de ângulo aberto .....	36
3.1.2. Grupo II: Controle populacional.....	38
3.2. ASPECTOS ÉTICOS .....	39
3.3. MÉTODO .....	39
3.3.1. Coleta de sangue e extração do DNA.....	40
3.3.2. Amplificação do DNA e restrição enzimática.....	40
3.3.3. Tipificação dos antígenos e alelos de histocompatibilidade .....	45
3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	45
<b>4- RESULTADOS .....</b>	<b>47</b>
<b>5- DISCUSSÃO .....</b>	<b>62</b>
<b>6- CONCLUSÕES .....</b>	<b>70</b>
<b>7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>72</b>
<b>8- ANEXOS .....</b>	<b>86</b>

## ANEXO DE PUBLICAÇÃO

## **1- INTRODUÇÃO**

---

## **1.1. O GLAUCOMA PRIMÁRIO DE ÂNGULO ABERTO**

### **1.1.1. Aspectos gerais**

A Sociedade Brasileira de Glaucoma (SBG), em seu segundo consenso, conceituou glaucoma primário de ângulo aberto como: “Neuropatia óptica crônica, progressiva, caracterizada por alterações típicas da cabeça do nervo óptico (NO) e da camada de fibras nervosas da retina, com repercussões características no campo visual. É acompanhada, na maioria das vezes, por pressões intra-oculares (PIO) acima de níveis estatisticamente normais” (MELLO; MANDIA Jr., 2005). Atualmente, os glaucomas constituem a primeira causa não reversível de cegueira no mundo (RESNIKOFF et al., 2004; FOSTER; GILBERT; JOHNSON, 2008).

O glaucoma primário de ângulo aberto (GPAA) é o tipo mais comum de glaucoma, acometendo mais da metade do total de casos (ACHARYA et al., 2002). Avaliações recentes sobre o número de pessoas afetadas pelo glaucoma no mundo sugerem que por volta de 2010 haverá aproximadamente 60.5 milhões de pessoas com a doença, sendo 45 milhões com GPAA (QUIGLEY; BROMAN, 2006). No Brasil, a prevalência do glaucoma é desconhecida. Estudos sugerem que a doença é frequente, sendo a maioria dos casos de GPAA, o que representa um problema social importante (GHANEM, 1989; POVOA et al., 2001). Sakata et al. (2007) estudaram adultos com mais de 40 anos de idade, residentes no sul do Brasil, e encontraram uma taxa de 2,4% de casos de GPAA. Ao compararem com a incidência de GPAA na população Hispânica e Européia, as taxas dessa forma de glaucoma

foram similares, mas o glaucoma de ângulo fechado foi mais comum entre os brasileiros do sul do país (SAKATA et al., 2007).

A PIO elevada é o maior fator de risco para o GPAA, porque a maioria dos olhos com GPAA apresentam PIO acima dos valores de normalidade (CHEW; RITCH, 1997; YOLES; SCHWARTZ, 1998). Entretanto, a PIO elevada não é um fator diagnóstico (INFELD; O'SHEA, 1998; AAO, 2000), uma vez que mais de dois terços dos pacientes com PIO elevada (isto é, PIO maior que 21mmHg) não perdem campo visual ou desenvolvem escavação do NO (AAO, 2000; WESTON; ALIABADI; WHITE, 2000). Isso porque a tolerância a uma determinada PIO sofre variação individual e de outros fatores como: a) o aumento da resistência vascular periférica ocular, b) a redução do fluxo sanguíneo no NO, c) a ação de excitotoxinas e d) a depleção de neurotrofinas para as células ganglionares retinianas (CGR), que podem interferir aumentando a predisposição do indivíduo ao glaucoma, ou mesmo desencadeando-o (CHEW; RITCH, 1997; YOLES; SCHWARTZ, 1998).

Outros fatores de risco conhecidos para o desenvolvimento do GPAA são as injúrias oculares (incluindo trauma e uveítes), a terapia com corticoesteróides, a raça negra (o que aumenta a prevalência em quatro vezes), uma história familiar positiva em parentes de primeiro grau (o que aumenta a prevalência para sete vezes), os altos erros refrativos e alguns aspectos da função vascular (SOMMER et al., 1991; AAO, 2000; WESTON; ALIABADI; WHITE, 2000; RIORDAN; VAUGHAN, 2001; SPONSEL, 2001).

Independentemente de quais fatores estejam envolvidos, o GPAA é desencadeado ou agravado por duas sequências de eventos: a lesão neuronal primária e a lesão neuronal secundária. A lesão neuronal primária consiste na perda das CGR e de fibras nervosas do NO ocasionadas pela ação direta do estímulo agressor, como, por exemplo, o aumento da PIO, e ocorre através de três mecanismos: mecânico (compressão neuronal ao nível da lâmina crivosa), vascular (isquemia

no NO por alterações do fluxo sanguíneo neural) e axoplasmático (bloqueio ou retardamento do fluxo axoplasmático ao longo do neurônio) (CHEW; RITCH, 1997; NICKELLS, 1996; YOLES; SCHWARTZ, 1998). A lesão neuronal secundária ocorre porque as fibras nervosas do NO e as CGR lesionadas iniciam um processo de degeneração e morte celular, liberando mediadores químicos para o meio extracelular que agem sobre as células vizinhas, inicialmente poupadas da agressão primária, promovendo perda adicional de neurônios (CHEW; RITCH, 1997). Esses eventos ocorrem simultaneamente e a extensão da lesão neuronal secundária é proporcional à extensão da lesão neuronal primária (YOLES; SCHWARTZ, 1998). Independentemente de qual seja o mecanismo responsável pelo dano glaucomatoso, as CGR morrem, o que representa a via final comum da perda visual glaucomatosa (GARCIA-VALENZUELA et al., 1995; QUIGLEY et al., 1995).

Embora os mecanismos mediadores da morte das CGR no glaucoma não estejam completamente compreendidos, a PIO elevada e as diferenças na susceptibilidade à morte dessas células podem ser fatores de risco local (KERRIGAN et al., 1997).

Evidências experimentais demonstraram que a morte das CGR no glaucoma ocorre através da forma de morte celular conhecida como apoptose (GARCIA-VALENZUELA et al., 1995; QUIGLEY et al., 1995). Em seu estudo, Quigley et al. (1995) evidenciaram que o bloqueio do fluxo axoplasmático na lâmina crivosa, durante os períodos de PIO elevadas, pode impedir o impulso das neurotrofinas do axônio terminal para o corpo da célula e levar à morte celular por apoptose. Com base nessa hipótese, Kerrigan et al. (1997) estudaram olhos doados para o Banco de Olhos do Laboratório de Patologia Ocular de Wilmer, Baltimore, sendo 18 olhos de 17 pacientes com GPAA que foram comparados com 21 olhos de 21 controles, para determinar se a morte das CGR no GPAA ocorre por apoptose. Utilizaram secções da porção retrobulbar do NO e da retina, fixados em parafina, sendo o material



posteriormente analisado pelo TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate (UTP) - biotin nick endlabeling*), que é um método para detectar a fragmentação internucleossomal do DNA (ácido desoxirribonucléico) que é característica da apoptose (GAVRIELI; SHERMAN; BEN, 1992). O achado de CGR TUNEL-positivas nesse estudo corrobora com a hipótese de que a apoptose parece ser um mecanismo de morte celular em olhos humanos com GPAA (KERRIGAN et al., 1997).

Apoptose é um evento celular autônomo, que é controlado geneticamente pela célula agonizante e se caracteriza pela condensação e fragmentação da cromatina nuclear e do citoplasma celular que são fagocitadas por macrófagos ou outras células capazes de fagocitar, sem que haja processo inflamatório. A apoptose, em si, é um mecanismo de homeostase normalmente presente em organismos multicelulares, especialmente durante a embriogênese, porém em condições anormais, vários tipos de estímulos podem ativá-la, como: isquemia, radiação, fatores de crescimento, hormônios e infecções viróticas (NICKELLS, 1996; KERRIGAN et al., 1997; OKISAKA et al., 1997). Os genes e as vias moleculares envolvidas nesse processo são objetos de intenso estudo, mas uma grande variedade de genes está envolvida (NICKELLS, 1999).

### **1.1.2. Aspectos genéticos**

O GPAA pode ser herdado como uma herança autossômica dominante (HARRIS, 1965). O entendimento do mecanismo molecular do glaucoma ainda está sob investigação. Pelo menos 14 *loci* genéticos têm sido mapeados para o GPAA (HUMAN GENOME ORGANIZATION - HUGO, 2009) dos quais somente o *GLC1A* (miocilina, *MYOC*) (STONE et al., 1997), o *GLC1E* (optineurina, *OPTN*) (REZAIE et al., 2002) e o *GLC1G* (*WDR36*) (MONEMI et al., 2005) foram caracterizados.

O gene *MYOC* do GPAA codifica uma proteína de 57 kDa denominada miocilina, que tem um papel fundamental em manter a integridade estrutural da malha trabecular. A mutação nesse gene constitui um alto risco para o início do GPAA (ALWARD et al., 1998). Em estudos europeus e americanos, a mutação no *MYOC* ocorreu em aproximadamente 2%-4% dos casos de GPAA (WIGGS et al., 1998; FINGERT et al., 1999; GONG et al., 2004), enquanto em pacientes chineses ela ocorreu em 1,1%-1,8% (PANG et al., 2002; FAN et al., 2005). Pova et al. (2006) estudaram nos representantes de famílias brasileiras com GPAA, mutações no éxon 3 do gene *MYOC* e avaliaram a expressão fenotípica associada às mutações encontradas em seus respectivos núcleos familiares. Nesse estudo, a mutação no éxon 3 do gene *MYOC* associou-se com famílias brasileiras portadoras de GPAA de início precoce. O fenótipo dessa mutação foi caracterizado pela variável idade de diagnóstico, causando GPAA - juvenil e GPAA do adulto, PIO bastante elevada e de difícil controle, levando, frequentemente, a um grave comprometimento visual.

Mutações no gene *OPTN* podem ocorrer, predominantemente, em um subtipo de glaucoma de ângulo aberto em que a PIO é normal (glaucoma de pressão normal - GPN) e foram encontradas em 16,7% das famílias e em 12% de pacientes esporádicos (REZAIE et al., 2002). Entretanto, não foi encontrada associação da mutação do gene *OPTN* em pacientes com GPAA (TANG et al., 2003; WIGGS et al., 2003; LOPEZ-MARTINEZ et al., 2007).

O papel do gene *MYOC* e do gene *OPTN* na patogênese do glaucoma permanece incerta (ALLINGHAM; LIU; RHEE, 2009).

Em relação ao gene *WDR36*, quatro mutações foram encontradas em mais de 5% de todos os casos familiares e esporádicos de GPAA e GPN, indicando que o gene *WDR36* pode estar envolvido na etiologia desses tipos de glaucoma (MONEMI et al., 2005). Em seu estudo, Fan et al. (2009) sugerem que o gene *WDR36* pode estar associado com casos

esporádicos de GPAA, mas não com os casos de GPN ou glaucoma juvenil, mas também sugerem um diferente padrão de mutação do gene na população chinesa em relação a outras populações.

O gene *MYOC* e os outros genes associados ao GPAA foram, na sua maioria, identificados através de estudos familiares com traço de herança Mendeliana, onde a função alterada de um simples gene é suficiente para causar a doença. Entretanto, está cada vez mais claro que o GPAA, na maioria dos casos, é herdado de forma mais complexa, onde a doença resulta da interação de múltiplos genes e de fatores ambientais (SIEVING; COLLINS, 2007).

A identificação dos genes associados ao GPAA continua sendo objeto de estudo, pois mais de 90% da contribuição genética do GPAA ainda precisa ser determinada (FAN et al., 2006b).

## **1.2. O GENE *TP53***

### **1.2.1. Aspectos gerais**

Um dos principais genes envolvidos na apoptose é o *TP53* que expressa a proteína p53. Está localizado no braço curto do cromossomo 17p13.1, codificando uma fosfoproteína de 53 kDa e 393 aminoácidos, que tem a característica de ser expressa quando o DNA sofre algum tipo de dano, sendo sua principal função a manutenção da integridade do código genético em cada célula (LANE, 1992; PINHO, 2000).

A p53 é uma proteína supressora tumoral que pertence a uma pequena família de proteínas relacionadas que incluem dois outros membros - p63 e p73. A p53 parece estar envolvida na prevenção do desenvolvimento de tumores, sendo ativada em resposta a vários sinais de estresse associados à malignidade, resultando na inibição do crescimento das células tumorais. Várias respostas podem ser provocadas pela p53, incluindo a suspensão do ciclo celular,

envelhecimento celular, diferenciação celular e apoptose, dependendo de muitos fatores que são ambos intrínsecos e extrínsecos à célula, tais como o tipo celular, ambiente celular e outras alterações oncogênicas que são experimentadas pela célula (BÁLINT; VOUSDEN, 2001; VOUSDEN; LU, 2002). Em geral, esses sinais de estresse celular provocam uma estabilização da proteína p53, o que leva a um aumento nos níveis de p53 na célula. Em algumas circunstâncias, a p53 também contribui para reparar o dano genotóxico, mas na maioria dos casos a indução da p53 leva a uma inibição irreversível do crescimento celular, através da ativação da apoptose (BALINT; VOUSDEN, 2001; VOUSDEN; LU, 2002). Como a p53 seleciona uma dessas consequências celulares (reparação celular ou apoptose) ainda permanece obscuro e é uma área de intensa pesquisa. O acesso da p53 aos sítios nucleares é regulado, primariamente, pelo transporte citoplasmático-nuclear. Nas células normais, a p53 é mantida ativa em baixos níveis no citoplasma, através da degradação proteasoma-dependente. Em resposta aos estímulos, ela é transportada rapidamente para o núcleo, onde permanece até a tarefa de vigilância ter sido completada (SHAULSKY et al., 1990).

### **1.2.2. Polimorfismo**

Os polimorfismos genéticos são alterações naturais na sequência do DNA que ocorrem em uma frequência maior que 1% na população normal. A forma mais comum de polimorfismo é a que envolve a substituição de uma única base em uma sequência de nucleotídeos (SNP-*Single Nucleotide Polymorphism*) e é usualmente bialélica, isto é, há somente dois alelos, que são definidos pela presença de uma ou de outra base em uma determinada posição (BALASUBRAMANIAN et al., 2004). Algumas dessas alterações ocorrerão em sequências não codificadoras do gene e, na maioria dos casos, não terão efeito em suas funções; outras ocorrerão em sequências codificadoras, podendo levar à

produção de proteínas defeituosas. Desse modo, em alguns casos, o polimorfismo genético pode aumentar a suscetibilidade ao câncer (LODISH et al., 2002).

O polimorfismo do gene supressor de tumor *TP53*, no códon 72, tem sido investigado extensamente para verificação de sua associação com vários cânceres em todo o mundo (KIETTHUBTHEW et al., 2003). O códon 72 codifica um aminoácido arginina (CGC; Arg72) ou um prolina (CCC; Pro72), correspondendo aos genótipos em homozigose arginina/arginina (Arg/Arg) ou prolina/prolina (Pro/Pro) e em heterozigose arginina/prolina (Arg/Pro) (ARA et al., 1990; TADA et al., 2001). O polimorfismo ocorre por simples substituição de uma base no códon, de guanina (G) para citosina (C), que resulta em alteração estrutural, bioquímica e biológica da proteína p53 (THOMAS et al., 1999).

A ocorrência de polimorfismos genéticos pode ser detectada pela técnica da reação em cadeia catalisada pela polimerase (PCR-*Polymerase Chain Reaction*) combinada com a técnica de restrição enzimática RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism* - polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição) (IZZOTTI, 2003). Essa técnica consiste na amplificação da sequência específica do DNA, pela técnica da PCR, seguida pela restrição enzimática na presença de um tampão e análise por eletroforese (IZZOTTI, 2003).

### **1.2.3. Associação com o glaucoma primário de ângulo aberto**

Geralmente, a célula recebe um estímulo para morrer. Para as CGR, no glaucoma, esse estímulo pode ser na forma de perda do suporte neurotrófico durante os períodos de PIO elevada (OPPENHEIM, 1991) e/ou exposição a um excesso de aminoácidos excitatórios (excitotoxinas), tais como o glutamato liberado quando ocorre a isquemia do NO e das CGR (LIPTON; ROSENBERG, 1994; NASKAR;

DREYER, 2001). O dano celular se inicia e é detectado por alguma forma de sensor protéico que ainda não está caracterizado, cuja função crítica parece ser ativar a proteína supressora tumoral p53. A ação da p53 aumenta a expressão do gene pró-apoptótico *bax* e diminui a expressão do gene anti-apoptótico *bcl-2* (e, possivelmente, o *bcl-x*), cujos produtos agem como antagonistas na célula (NICKELLS, 1999). Embora a exata função desses produtos não seja conhecida, evidências indicam que eles afetam a liberação do citocromo c da mitocôndria, resultando na ativação de uma família de cisteína-proteases, denominadas *caspases*, que digerem os componentes celulares. Os fragmentos celulares são acondicionados em pequenas vesículas (corpos apoptóticos) que são fagocitadas pelos macrófagos. Esse processo resulta na perda somente da célula ganglionar afetada e é frequentemente considerado um “suicídio celular” (NICKELLS, 1999).

Partindo-se do pressuposto de que o gene *TP53* teria papel importante na apoptose que ocorre na neuropatia óptica glaucomatosa, o polimorfismo da proteína p53, no códon 72, foi estudado em pacientes com GPAA e comparado com o polimorfismo em indivíduos normais, em populações de nacionalidades distintas. Lin et al. (2002) realizaram um estudo em pacientes chineses e encontraram predominância da forma Pro/Pro nos pacientes com GPAA, porém Acharya et al. (2002) não encontraram nenhuma associação do polimorfismo da p53 (códon 72) em pacientes asiáticos. A forma Pro/Pro, embora menos frequente nos pacientes americanos com GPAA e com GPN, apareceu em proporção maior nesses pacientes do que nos indivíduos controle, e foi associada com a presença de alterações no campo visual atribuíveis ao glaucoma (SENA, 2003). Rassinotis et al. (2004) estudaram esse mesmo polimorfismo, bem como uma duplicação de 16 pares de base (pb) no íntron 3 do gene *TP53*, em uma população britânica, e observaram diferença significativa na distribuição do haplótipo p53 que tinha a inserção de 16pb em conjunção com o polimorfismo do alelo Arg, no

códon 72, em pacientes com GPAA. Dimasi et al. (2005) também estudaram a ocorrência do polimorfismo da proteína p53 (códon 72) e da inserção de 16pb no íntron 3 do gene *TP53* em australianos com GPAA, comparando com um grupo controle e concluíram que o polimorfismo da proteína p53, na forma Arg/Pro, não está associado com a presença de GPAA.

Conhecendo-se os genes e as vias moleculares envolvidas no dano celular causado pelo GPAA, poderá, talvez, ser possível a manipulação da expressão desses genes, alterando-se a resposta das CGR frente à injúria causada pela PIO elevada, que é o principal fator de risco nessa patologia ocular.

### **1.3. O COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE (CPH)**

#### **1.3.1. Aspectos gerais**

No ser humano, a expressão do CPH é o sistema HLA (*Human Leukocyte Antigen*) que é reconhecido como uma das regiões gênicas relevantes para a resposta imune (GOODMAN, 1994).

Seus genes localizam-se no braço curto do cromossomo 6 e agrupam-se em três regiões, sendo denominados como classe I (HLA -A; B; C; E; F; G), classe II (HLA - DPA1; DPB1; DQA1; DQB1; DRA; DRB1; DRB3; DRB4; DRB5; DMA; DMB; DOA; DOB) e classe III (C2; C4; fator B; Fator de Necrose Tumoral), segundo a sua localização (MARSH et al., 2002; SHIINA; INOKO; KULSKI, 2004).

As moléculas clássicas de histocompatibilidade de classe I são codificadas pelos genes HLA-A, B e C, e as moléculas clássicas de histocompatibilidade de classe II, pelos genes HLA-DP, DQ e DR (DONADI, 2000; SHIINA; INOKO; KULSKI, 2004). Quase todas as células nucleadas do corpo expressam as moléculas de classe I, enquanto as moléculas de classe II têm uma distribuição mais limitada,

sendo expressas fundamentalmente nos linfócitos B, células dendríticas e células epiteliais do timo. Entretanto, muitas outras células, tais como macrófagos e células endoteliais, podem ser induzidas a expressar moléculas HLA de classe II pela ativação de fatores como o gama-interferon (BENJAMIN; COICO; SUNSHINE, 2000). As moléculas de classe III estão presentes apenas no soro, não se expressando nas superfícies celulares e, portanto, não sendo relevantes na apresentação de antígenos (GOODMAN, 1994; DONADI, 2001).

Entre outras funções, as moléculas de classe I e II são responsáveis pela apresentação de peptídeos antigênicos para as células T CD<sub>8</sub><sup>+</sup> e células CD<sub>4</sub><sup>+</sup>, respectivamente, iniciando uma resposta imune e removendo o material estranho (BENJAMIN; COICO; SUNSHINE, 2000; DONADI, 2000).

Como os genes do CPH compreendem o mais polimórfico conjunto de genes conhecido nos humanos, existindo perto de 1000 alelos de classe I e II (GOODMAN, 1994; BODMER et al., 1999), é altamente improvável que dois indivíduos sejam geneticamente idênticos (BENJAMIN; COICO; SUNSHINE, 2000).

### **1.3.2. Associação entre HLA e as doenças**

A associação da leucemia linfóide aguda com determinados subtipos de HLA foi descrita em 1970 por Walford et al., e alguns anos mais tarde, a associação do HLA B27 com a espondilite anquilosante (SCHLOSSTEIN et al., 1973). A partir daí, vários estudos populacionais ou familiares foram realizados para se verificar a associação entre HLA e doenças, alguns dos quais em nosso meio (MORAES et al., 1981; SOUZA, 1982; YOSHINARI et al., 1984; EIZIRIK et al., 1987; MEIRA et al., 1987; TORRES et al., 1989; CABELLO et al., 1991; GOLDANI et al., 1991; MACIEL et al., 1997; DEGHAIDE; DANTAS; DONADI, 1998; DONADI et al., 1998; RODRIGUES et al., 1998; CASTALDELLI, 2000;



RODRIGUES, 2000; FERNANDES et al., 2003; RODRIGUES et al., 2003).

### **1.3.3. Associação com o glaucoma primário de ângulo aberto**

Apesar de diversos trabalhos na literatura tentarem correlacionar os antígenos do complexo HLA e o GPAA, até o momento não existem dados perfeitamente concordantes e inúmeros antígenos foram aventados como seus possíveis marcadores genéticos. Foram encontradas associações com HLA B12 (WALTMAN et al., 1975; ROSENTHAL; PAYNE, 1979); com HLA B12 e HLA B7 (SHIN; BECKER, 1976); com o HLA B35 como fator de risco de susceptibilidade para GPAA (AVINER et al., 1976); e os mais recentes identificaram antígenos HLA de classe II como o HLA DR3 em uma família de mexicanos (GIL-CARRASCO et al., 1994) e os antígenos HLA DQ1 e HLA DR11 em outro grupo populacional (FERRERI et al., 1998).

No Estado de São Paulo, três pesquisas foram realizadas (TORRES et al., 1989; CASTALDELLI, 2000; ZENHA, 2008), onde os resultados sugerem que alguns dos genes de susceptibilidade do GPAA podem ser os do sistema HLA. O estudo de Torres et al. (1989) mostrou não haver associação do GPAA com nenhum antígeno HLA A ou B isoladamente, porém sugeriu a associação com os haplótipos HLA A9-B12, A2-B40 e A1-B8. Castaldelli (2000) avaliou 50 pacientes no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), portadores de GPAA ou com hipertensão ocular, e encontrou diferenças estatisticamente significativas entre as frequências de diversos antígenos de classe I destacando-se os subtipos HLA A66 e HLA A68, sendo que essas especificidades contribuíram com 8% e 12% para o aparecimento da doença, respectivamente. Também o alelo HLA DRB1\*01 apareceu mais frequentemente em pacientes com glaucoma e hipertensão ocular.

Considerando que sete dos pacientes estudados por Castaldelli (2000) apresentaram haplótipos descritos por Torres et al. (1989) como relacionados ao GPAA, Zenha (2008) julgou pertinente observar a progressão do dano glaucomatoso, ocorrida em uma década, em pacientes com e sem esses haplótipos (de classe I), associados com predisposição para GPAA. Apesar de não terem sido encontradas diferenças significantes na progressão do dano fisiológico entre os dois grupos, houve progressão maior das alterações anatômicas da cabeça do nervo óptico, atribuíveis a glaucoma em pacientes com haplótipos HLA associados com predisposição para GPAA.

Devido aos resultados controversos entre os trabalhos sobre o polimorfismo do gene *TP53* (códon 72) no GPAA, e tendo em vista que esse polimorfismo não foi estudado na população brasileira, decidiu-se realizar esta pesquisa. E, como os resultados de Zenha (2008) corroboraram a associação entre HLA e GPAA, decidiu-se verificar, também, uma eventual associação entre haplótipos de classe I associados ao GPAA e o polimorfismo do gene *TP53*.

## **2. OBJETIVOS**

---

O presente estudo objetiva:

- 1) Determinar as distribuições alélicas e genotípicas do polimorfismo do gene *TP53* (códon 72) em pacientes caucasóides brasileiros com GPAA e em controles sadios.
- 2) Verificar a associação dos genótipos Pro/Pro, Arg/Arg e Arg/Pro do gene *TP53* (códon 72) com GPAA.
- 3) Verificar eventual associação entre a presença de subtipos HLA componentes de haplótipos de classe I associados a GPAA e o polimorfismo do gene *TP53*.

### **3. CASUÍSTICA E MÉTODO**

---

### **3.1. CASUÍSTICA**

Foi realizado estudo observacional, tipo caso-controle, de cento e vinte e três indivíduos caucasóides, divididos em dois grupos:

#### **3.1.1. Grupo I: Pacientes portadores de glaucoma primário de ângulo aberto**

O grupo de estudo foi composto por cinquenta e um pacientes caucasóides, portadores de GPAA, recrutados no Ambulatório de Glaucoma do Setor de Oftalmologia do HCFMRP-USP. Desses, 32 haviam participado de estudo anterior (CASTALDELLI, 2000) e seus materiais genéticos (DNA) estavam armazenados no Banco de Amostras de DNA do Laboratório de Imunologia Molecular do HCFMRP-USP, no Hemocentro da FMRP-USP (Anexo 1). Os demais 19 pacientes foram recrutados de acordo com os critérios de inclusão utilizados por Castaldelli (2000) que classificou como portadores de GPAA os pacientes que tivessem o ângulo da câmara anterior ocular aberto (verificado em gonioscopia realizada com lente de Goldmann - 3 espelhos), níveis de PIO iguais ou superiores a 21mmHg, sendo as medidas realizadas com tonômetro de aplanção tipo Goldmann acoplado à Lâmpada de Fenda TOPCON® (Modelo SL-D2, New Jersey, EUA), acompanhados de alterações sugestivas de glaucoma na cabeça do NO (observáveis na oftalmoscopia direta) e no campo visual (realizado com o perímetro computadorizado de Humphrey®, Marca Zeiss®).

A alteração do NO foi caracterizada pela presença de, pelo menos, dois dos seguintes critérios: escavação do nervo óptico maior ou igual a 0,6, perda de rima neural localizada, hemorragia de disco ou assimetria da escavação do NO maior que 0,2.

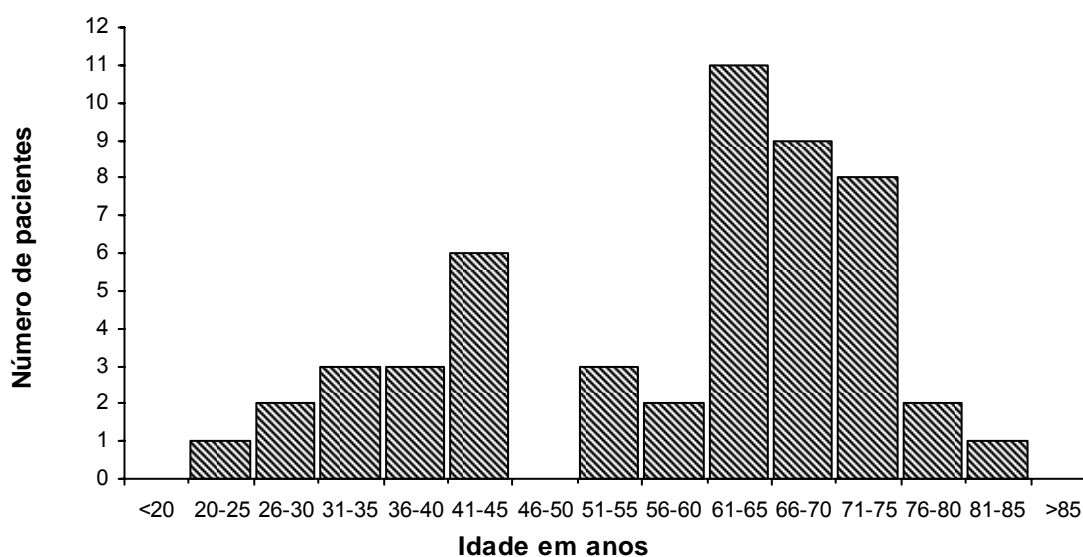
Definiu-se defeito de campo visual compatível com glaucoma de acordo com um dos seguintes critérios: GHT anormal, PSD menor que 5%, escotoma paracentral, defeito arqueado típico (Bjerrum), degrau nasal, defeito em cunha temporal, defeito difuso, escotoma denso e ilha de visão. Todos os campos visuais foram avaliados por um glaucomatólogo experiente em campimetria visual e os resultados dessa avaliação foram aceitos por outro glaucomatólogo e pela autora.

Foram incluídos no estudo os pacientes portadores de GPAA que não tivessem história de hipertensão arterial sistêmica, diabetes melito e/ou doença de Chagas, na ocasião da coleta do sangue para extração do DNA.

Utilizando-se os prontuários dos pacientes, foram colhidos os dados relativos ao exame físico (biomicroscopia, fundoscopia direta, gonioscopia e tonometria), dados de identificação (nome, registro, idade e sexo), bem como registro das alterações campimétricas, antecedentes pessoais, medicações em uso e antecedentes familiares (parentes com GPAA).

O grupo de pacientes foi composto por 34 indivíduos do sexo masculino e 17 do sexo feminino. A idade dos pacientes variou de 24 a 84 anos de idade (mediana 64).

A Figura 1 mostra a distribuição desses pacientes, por faixa etária.



**Figura 1-** Distribuição dos pacientes do Grupo I (GPAA), por faixa etária. Ribeirão Preto, SP. 2006-2008.

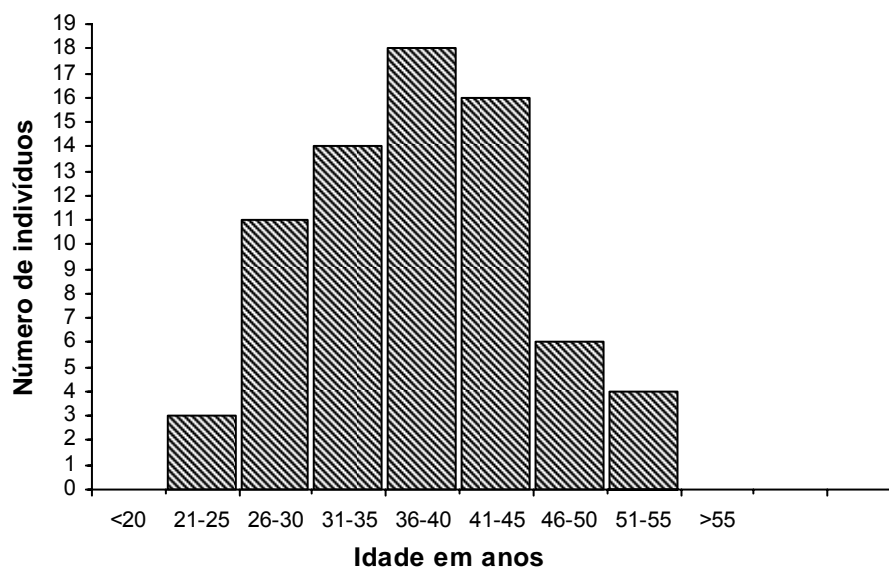
De todos os 51 pacientes, 10 (19,6%) relataram antecedentes familiares positivos para o glaucoma.

### 3.1.2. Grupo II: Controle populacional

Foram utilizados como controles, setenta e dois indivíduos caucasóides que não apresentavam qualquer doença sistêmica ou ocular, doadores de medula óssea do Hemocentro da USP de Ribeirão Preto, sendo 54 indivíduos do sexo masculino e 18 do sexo feminino. A idade dos controles variou de 22 a 52 anos de idade (mediana 38).

A Figura 2 mostra a distribuição desses indivíduos, por faixa etária.





**Figura 2-** Distribuição dos componentes do Grupo II (controles), por faixa etária. Ribeirão Preto, SP. 2006-2008.

### 3.2. ASPECTOS ÉTICOS

O projeto desta pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética do HCFMRP-USP, tendo constituído os processos números 8991/2001 e 9346/2007 e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa- CONEP parecer 476/2002 (Anexo 1).

Os pacientes foram informados dos objetivos e métodos do estudo e, concordando em participar, assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2).

### 3.3. MÉTODO

A análise das amostras foi realizada no Laboratório de Imunologia Molecular do HCFMRP-USP com as etapas abaixo relacionadas:

### **3.3.1. Coleta de sangue e extração do DNA**

O DNA de ambos os grupos foi extraído após a colheita, em veia periférica, de 10ml de sangue total em tubos de vidro (Vácuo II-Labnew) estéreis contendo EDTA a 15% - 54 microlitros/tubo. Em seguida, o sangue foi transferido para um tubo de 50ml, sendo adicionados 40ml de tampão de lise de hemácias gelado (sacarose 0,3M, Tris-HCl 10mM - pH 7,5; MgCl<sub>2</sub> 5mM e Triton X -100 1%). Após a homogeneização e a centrifugação a 2400 x g à 4°C por 10 minutos, o sobrenadante foi retirado e o precipitado novamente suspenso em 4,5ml de tampão de lise de leucócitos (NaCl 0,075M e Na<sub>2</sub>EDTA 0,024M), adicionando-se 125 microlitros de SDS 10% e 1,1ml de perclorato de sódio 5M, agitando-se por 10 segundos na temperatura ambiente. Para extração das proteínas foram acrescentados 2ml de NaCl saturado (6M), seguido de agitação por 15 segundos e centrifugação a 2400 x g na temperatura ambiente durante 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um tubo de 50ml adicionando-se 7ml de isopropanol absoluto. Após a inversão manual lenta do tubo, ocorreu a precipitação do DNA, que em seguida foi retirado com o uso da pipeta de Pasteur selada e colocado em tubo tipo Eppendorf, estéril, de 1,7ml. Realizada a lavagem por uma vez em 1,5ml de etanol 70% gelado, o DNA foi re-dissolvido em 250 microlitros de água autoclavada. O DNA foi homogeneizado e a sua concentração determinada por espectrofotometria, com leituras feitas em 260 e 280nm (CASTALDELLI, 2000; MILLER, DYKES; POLESKY, 1988), sendo, posteriormente, estocado em freezer à -20°C.

### **3.3.2. Amplificação do DNA e restrição enzimática**

As amostras de DNA obtidas de ambos os grupos foram amplificadas por PCR utilizando-se uma combinação de oligonucleotídeos previamente preparados. Após, o produto obtido foi

submetido à RFLP com uma enzima de restrição específica, para que os principais grupos alélicos fossem distinguidos de acordo com o tamanho dos fragmentos gerados.

Para amplificar a região do éxon 4 do gene *TP53*, que contém o DNA polimórfico, foram utilizados dois iniciadores distintos, um para prolina e outro para arginina, descritos em estudo semelhante (SENA, 2003), cujas sequências foram:

Senso 5'3':

- Pro - (5' CGT GCA AGT CAC AGA CTT -3', com 94 pb) para o polimorfismo do gene *TP53* (códon 72) na forma de prolina (XXIDT<sup>119</sup>).

Anti-senso 5'3':

- Arg + (5' TCC CCC TTG CCG TCC CAA -3', com 138 pb) para o polimorfismo do gene *TP53* (códon 72) na forma de arginina (XXIDT<sup>119</sup>).

Foi padronizada a condição da PCR para cada amostra de DNA conforme segue:

- 21,92 microlitros de água estéril;
- 3,0 microlitros de tampão 10x Taq (Invitrogen);
- 1,2 microlitros de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>) (Invitrogen);
- 0,38 microlitro de desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs) (Invitrogen);
- 0,9 microlitros de cada oligonucleotídeo iniciador (senso e anti-senso) (Invitrogen);
- 0,2 microlitro de enzima Taq DNA polimerase (5U/microlitro) (Invitrogen);
- 1,5 microlitros de DNA purificado.

Todos os reagentes estavam estocados à -20°C.

Procedimento:

- 1- Todos os reagentes foram reunidos formando uma mistura com volume de 28,5 microlitros, ao qual foram adicionados 1,5 microlitros de DNA purificado, totalizando um volume de 30 microlitros. A enzima Taq polimerase foi adicionada imediatamente antes de se colocar a preparação no termociclador. Como controle negativo foram utilizados todos os reagentes acima citados, exceto o DNA, com o intuito de assegurar que não houve contaminação das amostras. Cada amostra foi aliquoteada em um microtubo de 500 microlitros devidamente numerado.
- 2- A amplificação da região do éxon 4 do gene *TP53* foi realizada através de um programa de ciclo térmico no termociclador (Biocycler MJ96G-Biosystems), com duração aproximada de 2 horas e 15 minutos e consistiu de três etapas:
  - 1 ciclo à 94°C durante 5 minutos, aquecendo a amostra para que houvesse a desnaturação do DNA, ou seja, a separação das fitas complementares (dupla hélice);
  - 35 ciclos: 94°C por 45 segundos, 60°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos. Nessa etapa, os iniciadores de oligonucleotídeos, complementares à região a ser amplificada, hibridizam-se às respectivas extremidades das fitas despareadas de DNA;
  - 1 ciclo final à 72°C durante 4 minutos, que é quando a Taq polimerase acrescenta nucleotídeos em sequência aos iniciadores, formando a fita complementar.

Assim, duas novas fitas são sintetizadas nos moldes das duas originais, completando o ciclo da PCR. Para cada ciclo da PCR, o número de cópias da sequência do DNA nos locais do iniciador é duplicado e acumulado exponencialmente.

- 3- Cinco microlitros do produto final da PCR, corados com 5 microlitros de Azul de Bromofenol 0,025%, foram analisados através da eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, não desnaturante, corado com nitrato de prata 2%, verificando-se se houve a correta amplificação (produto final com 279pb).

Foi padronizada a condição da RFLP para cada amostra de DNA conforme segue:

- 1,5 microlitros de água estéril;
- 1,0 microlitro de tampão 10x Tango TN com BSA (Fermentas, U.S.A);
- 0,5 microlitro da enzima de restrição *BseDI* (10U/microlitro) (Fermentas, U.S.A);
- 7,0 microlitros de DNA amplificado;
- Banho-Maria (BM-100, FANEM® - São Paulo-Brasil).

Procedimento:

- 1- Sete microlitros do produto da PCR foram submetidos à RFLP em uma solução de 3,0 microlitros (total da mistura dos reagentes), totalizando 10 microlitros. Cada amostra foi aliquoteada em um microtubo de 500 microlitros devidamente numerado;
- 2- A amostra foi colocada no banho-maria durante 12 horas à 55°C;
- 3- Os fragmentos de DNA resultantes dessa restrição enzimática (5 microlitros da amostra corados com 5 microlitros de Azul de Bromofenol 0,025%) foram analisados em gel de poliacrilamida 10%, corado com nitrato de prata 2%, analisando-se o padrão de bandamento do DNA para distinguirem-se os principais grupos alélicos de acordo com o tamanho dos fragmentos gerados.

A presença do fragmento com 138pb representa o alelo Arg, e do fragmento com 94pb, o alelo Pro. O genótipo da amostra poderia ser homozigoto Arg/Arg ou homozigoto Pro/Pro ou heterozigoto Arg/Pro.

Material utilizado para a preparação do gel de poliacrilamida 10% e eletroforese:

- 2 placas de vidro de tamanho médio, espaçadores e pente;
- 20ml de “Mix” gel não desnaturante a 10%;
- 20 microlitros TEMED ( $C_6H_{16}N_2$ );
- 350 microlitros de persulfato de potássio ( $K_2O_8S_2$ );
- marcador de DNA de peso molecular de 100pb (Promega-Madison, U.S.A);
- amostras de DNA coradas com Azul de Bromofenol 0,025%;
- TBE 1x (*Tris Boric Acid*) - condutor;
- cuba de eletroforese;
- fonte de eletroforese fixada em 200V;
- 100ml de solução fixadora alcoólica 10% com ácido acético;
- 1ml de nitrato de prata 2%;
- 100ml de solução reveladora com 1ml formaldeído;
- 100ml de solução fixadora;

Após a preparação, o gel foi imediatamente aplicado a um cassete de tamanho determinado, previamente montado. Esse cassete é composto por duas placas de vidro colocadas sobre um suporte, separadas por espaçadores de teflon e presas com grampos de aço. Logo em seguida da aplicação do gel entre as placas, colocou-se um pente de teflon na borda superior, esse tem por função formar os sulcos onde, posteriormente, serão aplicadas as amostras. O tempo de polimerização foi de aproximadamente 15 minutos. Com o gel polimerizado, o pente foi retirado e esse montado em uma cuba de eletroforese vertical contendo tampão TBE em ambos os pólos.

As amostras, misturadas ao corante, foram aplicadas no gel, assim como o marcador de migração, e o equipamento ligado a uma fonte de alta voltagem e submetido à voltagem constante, pelo tempo aproximado de 1 hora e 30 minutos. Retirado da placa, o gel foi colocado na solução fixadora por 5 minutos e após adicionou-se à solução fixadora 1ml de solução de nitrato de prata. O gel foi agitado por 5 minutos nessa solução. Depois de descartada a solução fixadora com prata, o gel foi lavado uma vez em água. Desprezada a água, foi colocada a solução reveladora com formaldeído sobre o gel que foi agitado até o aparecimento das bandas.

Realizada a leitura dos géis, esses foram secos para serem arquivados. A secagem foi feita colocando-se o mesmo entre duas folhas de papel celofane embebidas em água, sobre uma placa de vidro, à temperatura ambiente por dois ou três dias.

### **3.3.3. Tipificação dos antígenos e alelos de histocompatibilidade**

Vinte e sete casos e todos os controles tinham seu perfil HLA disponível no Banco de Dados do Laboratório de Imunologia Molecular do HCFMRP-USP. As tipificações haviam sido realizadas anteriormente, por métodos clássicos de biologia molecular.

### **3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

A frequência do polimorfismo do gene *TP53* foi calculada para a amostra total de 50 pacientes e para os 72 indivíduos controle. A análise estatística foi realizada pelo teste do Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ), com correção de Yates, ou pelo teste exato de Fisher Bicaudal, quando necessário. O mesmo foi aplicado para verificar a significância estatística das associações quando comparadas com as frequências de cada genótipo, alelos e antígenos estudados na amostra total de

pacientes e controles. Os valores iguais ou inferiores a 0,05 (Intervalo de Confiança=95%) foram considerados significantes. (HENNEKENS; BURING, 1987a e b).

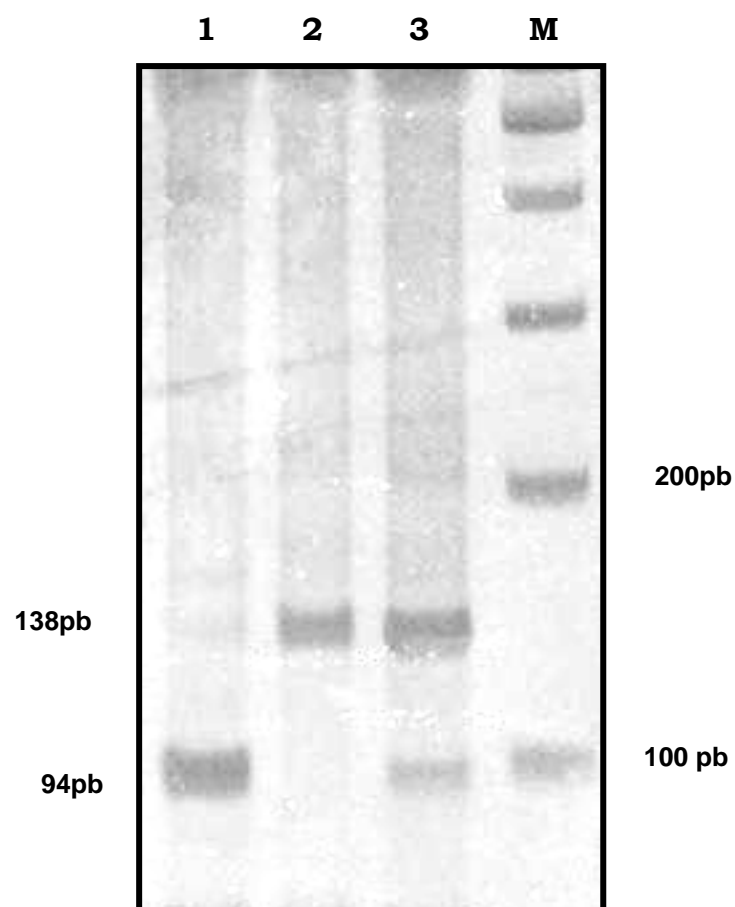
Todas as análises foram realizadas utilizando-se o software StatCal (Epi Info, versão 6.0).



## **4. RESULTADOS**

---

A A sensibilidade da eletroforese em gel de poliacrilamida seguida de coloração com nitrato de prata permitiu a visualização bem definida dos alelos no *loci* analisados (Figura 3).



**Figura 3-** PCR-RFLC para a detecção do polimorfismo Arg72Pro no éxon 4 do gene *TP53*, digeridos com a enzima de *BseDI*. Linha 1: homozigoto Pro/Pro; Linha 2: homozigoto Arg/Arg; Linha 3: heterozigoto Arg/Pro; M= marcador de peso molecular (100pb). Gel de poliacrilamida 10% não desnaturante, corado com nitrato de prata.

As Tabelas 1 e 2 apresentam os resultados da tipificação dos subtipos Pro/Pro, Arg/Arg e Arg/Pro do polimorfismo do gene *TP53* (códon 72), nos pacientes com GPAA e nos controles.

**Tabela 1-** Distribuição dos genótipos Pro/Pro, Arg/Arg e Arg/Pro nos 51 pacientes com GPAA. Ribeirão Preto, SP. 2006-2008.

<b>IDENTIFIC.</b>	<b>PRO/PRO</b>	<b>ARG/ARG</b>	<b>ARG/PRO</b>	<b>SEXO</b>	<b>IDADE</b>
009758-C		X		M	52
013570-D		X		F	64
018752-H		X		F	44
021282-D		X		M	65
040507-D			X	F	39
085305-I		X		F	32
119982-A			X	M	40
209438-G			X	F	74
228404-B		X		M	56
248964-G		X		F	66
274994-K	X			F	62
300441-E		X		M	42
311918-I			X	M	35
328323-E			X	F	42
329765-C			X	M	59
348887-F		X		F	75
353615-A			X	F	29
363468-G	X			M	39
378040-F		X		M	71
379516-F			X	M	55
401806-F			X	M	30
421762-F			X	M	69
433868-B			X	M	69
445336-F			X	M	74
446218-I		X		F	62
448748-C			X	F	24
453364-C			X	F	68
453413-D			X	M	65
455966-K		X		M	79
458198-F		X		M	63
459741-J			X	M	33
464664-B	X			M	68
468252-C			X	M	54
470404-I		X		M	84

continua

**conclusão**

<b>IDENTIFIC.</b>	<b>PRO/PRO</b>	<b>ARG/ARG</b>	<b>ARG/PRO</b>	<b>SEXO</b>	<b>IDADE</b>
474852-D			X	M	68
475145-E	X			M	63
475433-I			X	M	75
479808-J			X	M	79
490346-I		X		F	65
495478-B		X		F	72
523863-F			X	M	69
568686-K			X	F	65
582946-G		X		M	75
652647-G			X	F	43
670327-A		X		M	45
679408-A			X	M	65
726527-H			X	M	71
730893-C		X		M	42
733908-F		X		M	68
735833-G		X		M	67
747700-G		X		M	64

**Tabela 2-** Distribuição dos genótipos Pro/Pro, Arg/Arg e Arg/Pro nos 72 controles. Ribeirão Preto, SP. 2006-2008.

<b>IDENTIFIC.</b>	<b>PRO/PRO</b>	<b>ARG/ARG</b>	<b>ARG/PRO</b>	<b>SEXO</b>	<b>IDADE</b>
616		X		F	29
628		X		F	44
752		X		F	36
754			X	M	38
760		X		F	46
772	X			M	51
774			X	M	43
775			X	F	30
784		X		F	36
788		X		F	49
791		X		M	42
800		X		F	46
810			X	M	42
813		X		M	31
815		X		M	41
823		X		M	47
825		X		M	44
830		X		F	22

continua

continuação

IDENTIFIC.	PRO/PRO	ARG/ARG	ARG/PRO	SEXO	IDADE
840			X	F	31
842			X	M	51
843			X	M	39
844		X		M	40
845			X	M	37
847		X		F	39
857		X		M	43
861		X		M	37
862			X	F	52
865		X		M	42
867			X	F	24
868		X		M	30
869			X	M	38
870		X		F	35
872		X		M	36
877			X	M	28
878			X	F	43
883			X	M	33
885			X	M	34
886			X	M	33
887			X	M	41
888		X		M	30
892		X		F	43
898		X		M	41
899		X		F	30
904			X	M	26
906			X	M	30
907			X	M	42
911		X		M	38
915	X			M	29
918		X		M	34
919		X		M	37
920			X	M	39
932			X	M	23
949			X	M	42
950		X		M	47
952	X			M	38
964	X			M	35
968			X	M	27
980		X		M	39
998		X		M	34
1006			X	M	40
1007			X	M	40
1011		X		M	34
1012		X		M	30

continua

## conclusão

IDENTIFIC.	PRO/PRO	ARG/ARG	ARG/PRO	SEXO	IDADE
1013			X	M	32
1020			X	M	42
1021			X	M	41
1040		X		M	33
1052		X		M	49
1057		X		M	51
1058		X		F	32
1064		X		M	40
1066		X		M	34

A proporção de mulheres e de homens no grupo com GPAA não foi estatisticamente diferente do grupo controle ( $\chi^2=0.33$ ,  $p=0.566$ ).

Para verificar se existiam diferenças estatisticamente significantes no polimorfismo do gene *TP53* (códon 72) entre os grupos avaliados, foi aplicado o teste do Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ), com correção de Yates ou o teste de Fisher Bicaudal,.

A Tabela 3 sintetiza os resultados apresentados nas Tabelas 1 e 2 e a Tabela 4 mostra a frequência alélica dos grupos I (GPAA) e II (controles).

**Tabela 3-** Números absolutos (N) e números relativos (%), de acordo com o polimorfismo (Pro/Pro, Arg/Arg e Arg/Pro) do gene *TP53* (códon 72) nos casos e controles. Ribeirão Preto, SP. 2006-2008.

GRUPO	GENÓTIPO		
	Pro/ Pro N(%)	Arg/Arg N(%)	Arg/Pro N(%)
<b>I (GPAA)</b>	4 (7,9%)	22 (43,1%)	25 (49,0%)
<b>II (CONTROLES)</b>	4 (5,5%)	39 (54,2%)	29 (40,3%)

**Tabela 4-** Números absolutos (N) e números relativos (%), da distribuição alélica em pacientes com GPAA e controles. Ribeirão Preto, SP. 2006-2008.

GRUPO	ALELO	
	Pro N(%)	Arg N(%)
<b>GPAA</b>	33 (32,4%)	69 (67,6%)
<b>Controles</b>	37 (25,7%)	107 (74,3%)

No cálculo dos valores de probabilidade (**p**) para os alelos obteve-se **p**=0,32. Os resultados da análise estatística dos genótipos estão resumidos na Tabela 5.

**Tabela 5-** Cálculo dos valores de probabilidade (**p**) para o genótipo do polimorfismo do gene *TP53* (códon 72). Ribeirão Preto, SP. 2006-2008.

GENÓTIPO	GPAA x CONTROLES
Pro/Pro	<b>p</b> =0,71
Arg/Arg	<b>p</b> =0,27
Arg/Pro	<b>p</b> =0,36

Quando comparadas (Tabela 2X3) as frequências dos três genótipos nos pacientes com GPAA com a frequência dos três genótipos nos controles, obteve-se **p**=0,47.

Ao ser realizada a separação dos indivíduos que tiveram seus alelos HLA tipificado (27 casos e 72 controles), levando em consideração a presença de um dos haplótipos HLA A1-B8 ou HLA A2-B40, associados a glaucoma, os resultados foram os seguintes:

**Tabela 6-** Distribuição dos genótipos Pro/Pro, Arg/Arg e Arg/Pro em quatro pacientes com GPAA e de um dos haplótipos, de classe I, HLA A1-B8 ou HLA A2-B40. Ribeirão Preto, SP. 2006-2008.

IDENTIFIC.	PRO/PRO	ARG/ARG	ARG/PRO	SEXO	Subtipos HLA I
021282-D		X		M	A1-B8
274994-K	X			F	A1-B8
453364-C			X	F	A1-B8
455966-K		X		M	A2-B40

**Tabela 7-** Distribuição dos genótipos Pro/Pro, Arg/Arg e Arg/Pro em 23 pacientes com GPAA que não apresentam nenhuns dos haplótipos HLA de classe I, HLA A1-B8 ou HLA A2-B40. Ribeirão Preto, SP. 2006-2008.

IDENTIFIC.	PRO/PRO	ARG/ARG	ARG/PRO	SEXO
040507-D			X	F
228404-B		X		M
248964-G		X		F
300441-E		X		M
348887-F		X		F
453413-D			X	M
458198-F		X		M
379516-F			X	M
470404-I		X		M
013570-D		X		F
018752-H		X		F
085305-I		X		F
311918-I			X	M
328323-E			X	F
363468-G	X			M
378040-F		X		M
421762-F			X	M
445336-F			X	M
448748-C			X	F
459741-J			X	M
464664-B	X			M
468252-C			X	M
479808-J			X	M



**Tabela 8-** Distribuição alélica (N e %) em pacientes com GPAA que apresentam haplótipos HLA de classe I associados a glaucoma e pacientes que não apresentam nenhuns dos haplótipos HLA, e classe I, HLA A1-B8 ou HLA A2-B40. Ribeirão Preto, SP. 2006-2008.

GRUPO	ALELO	
	Pro N(%)	Arg N(%)
<b>GPAA com haplótipos</b>	3 (37,5%)	5 (62,5%)
<b>GPAA sem haplótipos</b>	15 (32,6%)	31 (67,39%)

Comparando a frequência alélica em pacientes com GPAA que apresentam haplótipos HLA de classe I associados a glaucoma e pacientes que não apresentam nenhuns dos haplótipos HLA, de classe I, HLA A1-B8 ou HLA A2-B40, obteve-se  $p=1,0$

**Tabela 9-** Genótipo do polimorfismo do gene *TP53* (códon 72) em pacientes com glaucoma, com e sem haplótipos de classe I a eles relacionados. Ribeirão Preto, SP. 2006-2008.

GENÓTIPO	Glaucoma c/haplótipos	Glaucoma s/haplótipos
Pro/Pro	1	2
Arg/Arg	2	10
Arg/Pro	1	11

Quando comparadas (Tabela 2X3) as frequências dos três genótipos nos pacientes com haplótipos de classe I associados a glaucoma com a frequência dos três genótipos nos pacientes sem haplótipos, obteve-se  $p=0,53$ .

**Tabela 10-** Distribuição dos genótipos Pro/Pro, Arg/Arg e Arg/Pro em sete controles que apresentam um dos haplótipos, de classe I, HLA A1-B8 ou HLA A2-B40. Ribeirão Preto, SP. 2006-2008.

<b>IDENTIFIC.</b>	<b>PRO/PRO</b>	<b>ARG/ARG</b>	<b>ARG/PRO</b>	<b>SEXO</b>	<b>HLA I</b>
752		X		F	A1-B8
784		X		F	A1-B8
788		X		F	A1-B8
949			X	M	A1-B8
950		X		M	A1-B8
998		X		M	A1-B8
1020			X	M	A1-B8

**Tabela 11-** Distribuição dos genótipos Pro/Pro, Arg/Arg e Arg/Pro em 65 controles que não apresentam nenhuns dos haplótipos HLA, de classe I, HLA A1-B8 ou HLA A2-B40. Ribeirão Preto, SP. 2006-2008.

<b>IDENTIFIC.</b>	<b>PRO/PRO</b>	<b>ARG/ARG</b>	<b>ARG/PRO</b>	<b>SEXO</b>
628		X		F
760		X		F
774			X	M
810			X	M
813		X		M
815		X		M
825		X		M
830		X		F
842			X	M
845			X	M
847		X		F
862			X	F
865		X		M
867			X	F
870		X		F
878			X	F
885			X	M
898		X		M
904			X	M
906			X	M

continua

**conclusão**

<b>IDENTIFIC.</b>	<b>PRO/PRO</b>	<b>ARG/ARG</b>	<b>ARG/PRO</b>	<b>SEXO</b>
907			X	M
911		X		M
932			X	M
1007			X	M
1012		X		M
1013			X	M
1052		X		M
066		X		M
616		X		F
754			X	M
772	X			M
775			X	F
791		X		M
800		X		F
823		X		M
840			X	F
843			X	M
844		X		M
857		X		M
861		X		M
868		X		M
869			X	M
872		X		M
877			X	M
883			X	M
886			X	M
887			X	M
888		X		M
892		X		F
899		X		F
915	X			M
918		X		M
919		X		M
920			X	M
952	X			M
964	X			M
968			X	M
980		X		M
1006			X	M
1011		X		M
1021			X	M
1040		X		M
1057		X		M
1058		X		F
1064		X		M

**Tabela 12-** Distribuição alélica (N e %) em controles que apresentam haplótipos HLA de classe I associados a glaucoma e em controles que não apresentam nenhuns dos haplótipos HLA, de classe I, HLA A1-B8 ou HLA A2-B40. Ribeirão Preto, SP. 2006-2008.

GRUPO	ALELO	
	Pro N(%)	Arg N(%)
<b>Controles com haplótipos</b>	2 (14,28%)	12 (85,78%)
<b>Controles sem haplótipos</b>	35 (26,92%)	95 (73,07)

Comparando a frequência alélica em controles que apresentam haplótipos HLA de classe I associados a glaucoma e controles que não apresentam nenhuns dos haplótipos HLA, de classe I, HLA A1-B8 ou HLA A2-B40, obteve-se  $p=0,51$ .

**Tabela 13-** Genótipo do polimorfismo do gene *TP53* (códon 72) em controles, com e sem haplótipos de classe I a eles relacionados. Ribeirão Preto, SP. 2006-2008.

GENÓTIPO	Controles c/haplótipos	Controles s/haplótipos
Pro/Pro	0	4
Arg/Arg	5	34
Arg/Pro	2	27

**Tabela 14-** Distribuição alélica (N e %) em pacientes que apresentam haplótipos HLA de classe I associados a glaucoma e em controles que apresentam um dos haplótipos HLA, de classe I, HLA A1-B8 ou HLA A2-B40. Ribeirão Preto, SP. 2006-2008.

GRUPO	ALELO	
	Pro N(%)	Arg N(%)
<b>GPAA com haplótipos</b>	3 (37,5%)	5 (62,5%)
<b>Controles com haplótipos</b>	2 (14,28%)	12 (85,78%)

Comparando a frequência alélica em pacientes com GPAA que apresentam haplótipos HLA de classe I associados a glaucoma e controles que apresentam um dos haplótipos HLA, de classe I, HLA A1-B8 ou HLA A2-B40, obteve-se  $p=0,31$ .

**Tabela 15-** Genótipo do polimorfismo do gene *TP53* (códon 72) em pacientes com glaucoma, com haplótipos de classe I a eles relacionados e em controles com haplótipos. Ribeirão Preto, SP. 2006-2008.

GENÓTIPO	Glaucoma c/haplótipos	Controles c/haplótipos
Pro/Pro	1	0
Arg/Arg	2	5
Arg/Pro	1	2

**Tabela 16-** Distribuição alélica (N e %) em pacientes que não apresentam haplótipos HLA de classe I associados a glaucoma e em controles que não apresentam nenhuns dos haplótipos HLA, de classe I, HLA A1-B8 ou HLA A2-B40. Ribeirão Preto, SP. 2006-2008.

GRUPO	ALELO	
	Pro N(%)	Arg N(%)
<b>GPAA sem haplótipos</b>	15 (32,60%)	31 (67,39%)
<b>Controles sem haplótipos</b>	35 (26,92%)	95 (73,07%)

Comparando a frequência alélica em pacientes com GPAA que não apresentam haplótipos HLA de classe I associados a glaucoma e controles que não apresentam nenhuns dos haplótipos HLA, de classe I, HLA A1-B8 ou HLA A2-B40, obteve-se  $p=0,10$ .

**Tabela 17-** Genótipo do polimorfismo do gene *TP53* (códon 72) em pacientes com glaucoma, sem haplótipos de classe I a eles relacionados e em controles sem haplótipos. Ribeirão Preto, SP. 2006-2008.

GENÓTIPO	Glaucoma s/haplótipos	Controles s/haplótipos
Pro/Pro	2	4
Arg/Arg	10	34
Arg/Pro	11	27

Quando comparadas (Tabela 2X3) as frequências dos três genótipos nos casos (GPAA) com a frequência dos três genótipos nos controles, obteve-se  $p=0,74$ .

**Tabela 18-** Distribuição alélica (N e %) no total de pacientes com GPAA e controles que não apresentam nenhuns dos haplótipos HLA, de classe I, HLA A1-B8 ou HLA A2-B40. Ribeirão Preto, SP. 2006-2008.

GRUPO	ALELO	
	Pro N(%)	Arg N(%)
<b>GPAA total</b>	18 (33,33%)	36 (66,66%)
<b>Controles sem haplótipos</b>	35 (26,92%)	95 (73,07)

Comparando a frequência alélica no total de pacientes com GPAA e controles que não apresentam nenhuns dos haplótipos HLA, de classe I, HLA A1-B8 ou HLA A2-B40, obteve-se  $p=0,37$ .

**Tabela 19-** Genótipo do polimorfismo do gene *TP53* (códon 72) em pacientes com glaucoma, com e sem haplótipos de classe I a eles relacionados. Ribeirão Preto, SP. 2006-2008.

GENÓTIPO	Glaucoma total	Controles s/haplótipos
Pro/Pro	3	4
Arg/Arg	12	34
Arg/Pro	12	27

Quando comparadas (Tabela 2X3), as frequências dos três genótipos nos casos (GPAA) com a frequência dos três genótipos nos controles, obteve-se  $p=0,64$ .

## **5. DISCUSSÃO**

---



Após 56 anos da descrição da estrutura do DNA por Watson e Crick (1953), é possível vislumbrar com mais clareza, através do *Projeto Genoma Humano*, a real extensão da quantidade de informações contida nessa molécula. Ao invés de 100 mil genes que se acreditava haver nos cromossomos humanos, ficou claro que não passam de 35 mil genes, muitos com função conhecida e que codificam um número muito maior de proteínas do que se supunha (INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, 2004).

A genética ocular é complexa. O rápido avanço tecnológico na análise dos genes, a rica informação do genoma humano, e a viabilidade da bioinformática, têm levado à indicação de muitos genes candidatos às doenças oculares (FAN et al., 2006a). A análise molecular desses genes candidatos às doenças tem fornecido informações para o estabelecimento de marcadores genéticos úteis ao diagnóstico. Há muitas vantagens no diagnóstico molecular direto: (a) providenciar um teste inequívoco de alta especificidade; (b) possibilitar a identificação de portadores assintomáticos, mais suscetíveis de desenvolverem a doença do que os não-portadores, predizendo o risco de doença ocular genética intratável e efetiva prevenção das tratáveis; (c) providenciar informações para consulta genética; (d) instituir serviços de diagnóstico pré-natal (PANG, 1998; FAN et al., 2006a).

O GPAA é uma doença ocular neurodegenerativa complexa com evidências de um componente hereditário (HARRIS, 1965; STONE et al., 1997; REZAIE et al., 2002; LIBBY et al., 2005; MONEMI et al., 2005). Essa doença reduz a visão à medida que as CGR morrem. Devido ao dano visual periférico ocorrer primeiro e a doença ser tipicamente indolor, sem sintomas óbvios, uma perda visual considerável pode ocorrer antes do seu diagnóstico. De fato, estimativas sugerem que

metade das pessoas acometidas pelo glaucoma não sabe que o são (LIBBY et al., 2005).

No glaucoma, a morte progressiva das CGR leva à degeneração do NO resultando na perda visual. A principal abordagem terapêutica do glaucoma, é, portanto, facilitar a sobrevivência das CGR. Amplas evidências demonstram que a redução da PIO, quer via farmacológica ou cirúrgica, produz uma neuroproteção efetiva contra a morte das CGR no glaucoma (HEIJL et al., 2002; KUEHN; FINGERT; KWON, 2005). Evidências também indicam que a apoptose pode ser a via final comum da morte das CGR no glaucoma, pois marcadores de apoptose têm sido observados na retina de pacientes glaucomatosos e em glaucoma experimental (QUIGLEY et al., 1995; GARCIA-VALENZUELA et al., 1995; NICKELLS, 1996; KERRIGAN et al., 1997; OKISAKA et al., 1997). O processo apoptótico requer a expressão de genes específicos e pode ser identificado usando-se métodos histoquímicos e bioquímicos (QUIGLEY et al., 1995; KERRIGAN et al., 1997; OKISAKA et al., 1997).

Um gene implicado na apoptose é o *TP53* que expressa a proteína supressora tumoral p53 que é ativada pelo dano celular e é uma das moléculas mais decisivas na função celular. Uma vez ativada, a p53 é capaz de funcionar como um fator de transcrição que pode, tanto aumentar como diminuir a expressão de múltiplos genes (NICKLELLS, 1999).

Toda a estrutura do gene *TP53* tem sido bem analisada, exceto o códon 72, que tem sido reconhecido como um polimorfismo de uma arginina (Arg) para uma prolina (Pro). A simples mudança de uma base nitrogenada do códon CGC para CCC causa a alteração no aminoácido de arginina para prolina (ARA et al., 1990).

Partindo-se do pressuposto de que o gene *TP53* seria suspeito de ter um papel na neuropatia glaucomatosa, surgiram alguns estudos para tentar elucidar essa suspeita. Lin et al. (2002) estudaram pacientes chineses portadores de GPAA e controles, através da

amplificação do DNA por PCR e leituras de eletroforese em gel de Agarose 3% contendo Brometo de Etídio, e encontraram diferenças significativas na distribuição do polimorfismo do gene *TP53* (códon 72) entre os grupos estudados. A distribuição genotípica no grupo controle revelou 42,3% de homozigotos Arg, 44% de heterozigotos e 13,6% de homozigotos Pro, enquanto no grupo com GPAA o resultado demonstrou 20,6% de homozigotos Arg, 44,8% de heterozigotos e 34,4% de homozigotos Pro. Também demonstraram que o alelo Pro foi prevalente em alta frequência nos chineses com GPAA, indicando que o polimorfismo Pro72 do *TP53* é um fator de risco significativo para o GPAA nos pacientes chineses, pois poderia induzir a instabilidade das CGR e falhar na proteção dessas células contra a apoptose (LIN et al., 2002).

No mesmo ano, Acharya et al. (2002) estudaram o mesmo polimorfismo do códon 72 mais o polimorfismo de uma duplicação no íntron 3 de 16 pb em pacientes indianos com GPAA e em controles. As leituras do material genético foram feitas em gel de Poliacrilamida 6% corado com Brometo de Etídio, porém realizando-se a análise pela RFLP. Na população indiana, a distribuição genotípica no grupo controle foi 26,8%, 50,9% e 22,3% para os homozigotos Arg, heterozigotos e homozigotos Pro, respectivamente, enquanto no grupo com GPAA o resultado da distribuição genotípica foi, na mesma ordem, 34,3%, 44,8% e 20,9%. Esses autores não encontraram nenhuma diferença significativa na distribuição do polimorfismo do *TP53* (códon 72) entre o grupo controle e os pacientes indianos com o GPAA, nem no estudo do polimorfismo da duplicação no íntron 3 de 16 pb.

Usando a técnica do sequenciamento automático, Sena (2003) encontrou, em pacientes caucasóides americanos com GPAA, uma frequência maior de Arg/Arg (50%), mas sem diferença estatística com os controles. A forma Pro/Pro do gene *TP53* (códon 72), embora sendo a menos frequente nesses pacientes, apareceu em proporção maior do

que nos indivíduos controles, e foi associada com a presença de alterações no campo visual atribuíveis ao glaucoma.

Procurando esclarecer todos esses achados Ressiniotis et al. (2004) estudaram esse mesmo polimorfismo, bem como um segundo polimorfismo (uma duplicação de 16pb no íntron 3 do gene *TP53*), em um estudo de corte de 140 pacientes caucasianos na Inglaterra. Usando as técnicas de amplificação do DNA por PCR e de digestão do seu produto pela RFLP, observaram diferença significativa na distribuição do haplótipo p53 entre casos e controles. Nos indivíduos sem o polimorfismo da duplicação de 16pb, a frequência de Arg ou Pro no códon 72 não teve diferença estatística, porém nos indivíduos com o polimorfismo da duplicação de 16pb no íntron 3, a arginina no códon 72 (polimorfismo Arg72) foi significativamente mais comum nos pacientes com GPAA do que nos controles.

Seguindo a mesma linha de pesquisa de dois sítios polimórficos (16pb no íntron 3 e polimorfismo de um único nucleotídeo G/C (arginina/prolina) no códon 72, éxon 4) Dimasi et al. (2005) recrutaram 283 pacientes australianos brancos com GPAA e verificaram que a frequência de distribuição do genótipo Arg/Arg foi mais comum entre pacientes e controles, porém sem diferença estatística. Esse estudo também avaliou e não encontrou associação do polimorfismo com a idade de início e a gravidade do glaucoma.

Baseando-se nesses trabalhos, o presente estudo investigou o polimorfismo do gene *TP53* (códon 72) em pacientes caucasóides com GPAA, recrutados no Ambulatório de Glaucoma do Setor de Oftalmologia do HCRPFMRPUSP e em controles sadios, através da técnica PCR-RFLP, em virtude de ser uma técnica de realização simples e de baixo custo, ao contrário da técnica de sequência direta do DNA, e de também ter sido empregada pelos dois primeiros trabalhos publicados em 2002.

Nesse estudo, o polimorfismo ocorreu, tanto em pacientes normais como nos com GPAA. O genótipo mais frequente nos pacientes com GPAA foi o Arg/Pro (49%), o que também ocorreu nos estudos de Lin et al. (2002) e Acharya et al. (2002), e nos controles foi o genótipo Arg/Arg (54,2%), que foi encontrado também em maior frequência no trabalho de Dimasi et al. (2005). O alelo mais comum nos pacientes com GPAA e nos controles foi o Arg72 (67,6% e 74,3%, respectivamente), da mesma forma que no trabalho de Dimasi et al. (2005). O alelo Arg72 tem sido demonstrado como mais eficiente em provocar a apoptose, em parte devido à sua maior capacidade para se localizar na mitocôndria, do que o alelo Pro72 (DUMONT et al., 2003).

Ao comparar-se os grupos, não houve diferença estatística entre nenhuma das formas genotípicas. Esse achado está de acordo com os estudos prévios de Acharya et al. (2002), Sena (2003) e Dimasi et al. (2005) e contrasta com os achados de Lin et al. (2002) e Rassinotis et al. (2004). Porém os polimorfismos associados ao glaucoma descritos por Lin et al. (2002) e Rassinotis et al. (2004) são opostos, uma vez que foi descrita a associação do polimorfismo Pro72 do *TP53* no primeiro estudo e do polimorfismo Arg72 do *TP53* no segundo estudo.

Recentemente (ARVO Meeting, 2009) foram apresentados os resultados de outros dois estudos, que tiveram como objetivo verificar a associação do polimorfismo do *TP53* com GPAA. Em estudo realizado na Turquia (IRKEC et al, 2009), não foi encontrada associação desse polimorfismo, e de outros dois genes estudados, em pacientes com glaucoma. Por outro lado, pesquisa realizada nos Estados Unidos evidenciou que o alelo Arg está significativamente aumentado em pacientes com GPAA, em relação ao grupo controle (ZAREPARSI et al, 2009).

As diferenças de resultados, entre os estudos sobre o polimorfismo do *TP53* (códon 72) no glaucoma, podem ser devidas às diferenças étnicas entre os mesmos e aos diferentes tamanhos das

amostras. A população brasileira é multiracial, de forma que o polimorfismo do gene *TP53* pode ter sido influenciado por essa mistura de raças, e esse fato ter se refletido nos resultados obtidos. A amostra em questão foi modesta, o que não permite excluir o polimorfismo do gene *TP53* da lista dos genes candidatos à suscetibilidade ao GPAA.

Os dados conflitantes entre os estudos sugerem que o polimorfismo possa ser apenas um contribuinte no desenvolvimento do glaucoma.

Como outros estudos realizados com pacientes do nordeste do Estado de São Paulo, mesma procedência da população do presente estudo, haviam avaliado a associação HLA *versus* glaucoma (ZENHA, 2008), encontrando os resultados mais significativos na associação da presença dos haplótipos HLA de classe I, HLA A1-B8 e HLA A2-B40, com progressão maior da relação escavação/disco - sinal indicativo de glaucoma - decidiu-se verificar eventual associação entre a presença desses e o polimorfismo do gene *TP53*. No entanto, não foram encontradas diferenças significativas em nenhuma das comparações realizadas. Como o estudo dessa associação é inédito, não há dados comparativos na literatura vigente.

Até o presente momento, há pouco entendimento sobre a genética do glaucoma. *MYOC* e *OPTN* foram os primeiros genes implicados no glaucoma, observados em estudos familiares, devido ao fenótipo dominante e início relativamente precoce (STONE et al., 1997; ALWARD et al., 1998; REZAIE et al., 2002; POVOA et al., 2006). Mesmo para esses genes a situação não é tão simples. Parece haver uma alteração fenotípica ocasionada por modificadores genéticos e algumas mutações somente podem causar a doença quando presentes em um contexto de susceptibilidade genética. Mais difícil ainda é caracterizar alelos causadores da doença nos casos mais complexos de glaucoma (sem sinais de herança Mendeliana), nos quais múltiplos genes e fatores

ambientais provavelmente afetam o fenótipo, e as alterações genéticas podem ser sutis (LIBBY et al., 2005).

Uma vez que o glaucoma é uma doença responsável por uma forma de cegueira irreversível, e as técnicas de genética molecular têm propiciado grandes avanços na identificação de genes que causam doenças oculares, esforços devem ser realizados para obter-se os genes implicados no desenvolvimento do glaucoma, permitindo o diagnóstico precoce, e o desenvolvimento de estratégias para prevenir ou retardar sua progressão.

Para concluir, como não há uma associação clara do aumento do risco de desenvolvimento do GPAA com o polimorfismo do gene *TP53*, estudos ulteriores devem ser realizados.

## **6. CONCLUSÕES**

---



- 
- O alelo Arg foi o mais frequente, tanto nos paciente com GPAA quanto nos controles (67,6% e 74,3%, respectivamente). A distribuição genotípica no grupo I (GPAA) revelou 43,1% de homozigotos Arg, 49% de heterozigotos e 7,9% de homozigotos Pro, enquanto no grupo II (controles) o resultado demonstrou 54,2% de homozigotos Arg, 40,3% de heterozigotos e 5,5% de homozigotos Pro.
  
  - Não se verificou associação de nenhum dos genótipos do polimorfismo do gene *TP53* (códon 72) com o GPAA.
  
  - Não foi encontrada associação entre a presença de subtipos HLA componentes de haplótipos de classe I associados a GPAA e o polimorfismo do gene *TP53*.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

ACHARYA, M.; MITRA, S.; MUKHOPADHYAY, A.; KHAN, M.; ROYCHOUDHURY, S.; RAY, K. Distribution of p53 codon 72 polymorphism in Indian primary open angle glaucoma patients. **Mol Vis**; v. 30, p. 367-371, 2002.

ALLINGHAM, R. R.; LIU, Y.; RHEE, D. J. The genetics of primary open-angle glaucoma: A review. **Exp Eye Res**.; v. 88, p. 837-844, 2009.

ALWARD, W. L.; FINGERT, J. H.; COOTE, M. A.; JOHNSON, A.T. ; LERNER, S. F.; JUNQUA, D. et al. Clinical features associated with mutations in the chromosome 1 open-angle glaucoma gene (GLC1A). **N Engl J Med**.; v. 338, p.1022-1027, 1998.

AMERICAN ACADEMY OF OPHTHALMOLOGY, GLAUCOMA PAINEL. Primary open-angle glaucoma. Preferred practice pattern. San Francisco. **American Academy of Ophthalmology**, 2000; p. 1-36.

ARA, S.; LEE, P. S.; HANSEN, M. F.; SAYA, H. Codon 72 polymorphism of the TP53 gene. **Nucleic Acids Res**.; v. 18, p. 49-61, 1990.

AVINER, Z.; HENLEY, W.L.; FOTINO, M.; LEOPOLD, I.H. Histocompatibility (HLA) antigens and primary open-angle glaucoma. **Tissue Antigens**.; v. 7, p. 193-200, 1976.

BÁLINT, E. E.; VOUSDEN, K. H. Activation and activities of the p53 tumor suppressor protein. **Br J Cancer**.; v. 85, p.1813-1823, 2001.

BALASUBRAMANIAN, S. P.; COX, A.; BROWN, N. J.; REED, M. W. Candidate gene polymorphisms in solid cancers. **Eur J Surg Oncol**.; v. 30, p. 593-601, 2004.

BENJAMIN, E.; COICO, R.; SUNSHINE, G. **Immunology. A short course**. 4<sup>th</sup> ed. New York: Wiley-Liss. The role of the major histocompatibility complex in the immune response; 2000, p.147-68.

BODMER, J. G.; MARSH, S. G. E.; ALBERT, E. D.; BODMER, W. F.; BONTROP, R.E.; DUPONT, B. et al. Nomenclature for factors of HLA system, 1998. **Tissue Antigens**; v. 53(4 Pt 2), p. 407-446, 1999.

CABELLO, P. H.; KRIEGER, H.; LOPES, J. D.; SANT'ANA, E. J. On the association between HLA-A1 and B5 and clinical forms of schistosomiasis mansoni. **Mem Inst Oswaldo Cruz**; v. 86, p. 37-40, 1991.

CASTALDELLI, R. M. O. B. **Prevalência de antígenos de histocompatibilidade classes I e II em pacientes portadores de glaucoma primário de ângulo aberto ou hipertensão ocular.** [Dissertação]. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 2000, 58p.

CHEW, S. J.; RITCH, R. Neuroprotection: the next breakthrough in glaucoma? Proceedings of the Third Annual Optic Nerve Rescue and Restoration Think Tank. **J Glaucoma**; v. 6, p. 263-266, 1997.

DEGHAIDE, N. H. S.; DANTAS, R. O.; DONADI, E. A. HLA class I and II profiles of patients presenting with Chagas' disease. **Dig Dis Sci.**; v. 43, p. 246-252, 1998.

DIMASI, D. P.; HEWITT, A. W.; GREEN, C.M.; MACKEY, D. A.; CRAIG, J. E. Lack of association of p53 polymorphisms and haplotypes in high and normal tension open angle glaucoma. **J Med Genet.**; v. 42, p. e55, 2005.

DONADI, E. A.; VOLTARELLI, J. C.; PAULA-SANTOS, C. M.; KIMACHI, T.; FERRAZ, T. Association of Alport's syndrome with HLA-DR2 antigen in a group of unrelated patients. **Braz J Med Biol Res.**; v. 31, p. 543-547, 1998.

DONADI, E. A. Como entender a nomenclatura e os mecanismos de associação entre os antígenos e alelos de histocompatibilidade com as doenças. **Medicina**, Ribeirão Preto; v. 33, p. 7-18, 2000.

DONADI, E. A. Marcadores imunogenéticos das doenças oculares. In: Rodrigues, MLV; Dantas, AM, editores. **Oftalmologia Clínica**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica; 2001, p. 169-175.

DUMONT, P.; LEU, J.I.; DELLA PIETRA, A. C. 3RD, GEORGE, D. L.; MURPHY, M. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. **Nat Genet.**; v. 33, p. 357-365, 2003.

EIZIRIK, D. L.; MONTEIRO, C. M. C.; VOLTARELLI, J. C.; FOSS, M. C. Frequency of HLA antigens in a Brazilian type I diabetic population. **Braz J Med Biol Res.**; v. 20, p. 533-537, 1987.

FAN, B. J.; WANG, D. Y.; FAN, D. S.; TAM, P. O.; LAM, D. S.; THAM, C. C. et al. SNPs and interaction analyses of myocilin, optineurin and apolipoprotein E in primary open angle glaucoma patients. **Mol Vis.**; v. 11, p. 625-631, 2005.

FAN, B. J.; TAM, P. O.; CHOY, K. W.; WANG, D. Y.; LAM, D. S.; PANG, C. P. Molecular diagnostics of genetic eye diseases. **Clin Biochem.**;v. 39, p. 231-239, 2006a.

FAN, B. J.; WANG, D. Y.; LAM, D. S.; PANG, C.P. Gene mapping for primary open angle glaucoma. **Clin. Biochem.**; v. 39, p. 249-258, 2006b.

FAN, B. J.; WANG, D. Y.; CHENG, C.Y.; KO, W. C.; LAM, S. C.; PANG, C. P. Different WDR36 mutation pattern in Chinese patients with primary open-angle glaucoma. **Mol Vis.**; v. 15, p. 646-653, 2009. Epub 2009 Apr 3.

FERNANDES, A. P. M.; GONÇALVES, M. A. G.; ZAVANELLA, R. B.; FIGUEIREDO, J. F. C.; DONADI, E. A.; RODRIGUES, M. L. V. HLA markers associated with progression to AIDS are also associated with susceptibility to cytomegalovirus retinitis. **AIDS**; v. 17, p. 2133-2136, 2003.

FERRERI, G.; D'ANDREA, A.; CASTAGNA, I.; RECHICHI, C.; PETTINATO, G.; D'ANDREA, D. The role of class I and class II HLA

antigens in primary open angle glaucoma (POAG). **Acta Ophthalmol Scand Suppl.**; v. 227, p. 17-19, 1998.

FINGERT, J. H.; HÉON, E.; LIEBMANN, J. M.; YAMAMOTO, T.; CRAIG, J. E.; RAIT, J. et al. Analysis of myocilin mutations in 1703 glaucoma patients from five different populations. **Hum Mol Genet.**; v. 8, p. 899-905, 1999.

FOSTER, A.; GILBERT, C.; JOHNSON, G. Changing patterns in global blindness: 1988-2008. **Community Eye Health Journal.**; v. 21, p. 37-39, 2008.

GARCIA-VALENZUELA, E.; SHAREEF, S.; WALSH, J.; SHARMA, S. C. Programmed cell death of retinal ganglion cells during experimental glaucoma. **Exp Eye Res.**; v. 61, p. 33-44, 1995.

GAVRIELI, Y.; SHERMAN, Y.; BEN, S. S. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. **J Cell Biol.**; v. 119, p. 493-501, 1992.

GHANEM, C. C. Levantamento de casos de glaucoma em Joinville - Santa Catarina, 1984. **Arq Bras Oftalmol.**; v. 52, p. 40-43, 1989.

GIL-CARRASCO, F.; GRANADOS, J.; BAROJAS-WEBER, E.; GILBERT-LUCIDO, M. E.; VARGAS-ALARCÓN, G. Immunogenetic aspects in primary open-angle glaucoma in family members of Mexican mestizo glaucomatous patients. **Am J Ophthalmol.**; v. 118, p. 744-778, 1994.

GOLDANI, L. Z.; MONTEIRO, C. M. C.; DONADI, E. A.; MARTINEZ, R.; VOLTARELLI, J. C. HLA antigens in Brazilian patients with paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia.**; v. 114, p. 88-91, 1991.

GONG, G.; KOSOKO-LASAKI, O.; HAYNATZKI, G. R.; WILSON, M. R. Genetic dissection of myocilin glaucoma. **Hum Mol Genet.**; v. 13, p. 1R91-R102, 2004.

GOODMAN, J. W. Antigen presentation and the major histocompatibility complex. In: Stites, D.P., Terr, A.I., Parslow, T.G., eds, **Basic and clinical immunology**. 8<sup>th</sup> ed, East Norwalk: Appleton & Langué; 1994. p.58-65.

HARRIS, D. The inheritance of glaucoma - A pedigree of familial glaucoma. **Am J Ophthalmol.**; v. 60, p. 91-95, 1965.

HEIJL, A.; LESKE, M. C.; BENGTSSON, B.; HYMAN, L.; BENGTSSON, B.; HUSSEIN, M. Early Manifest Glaucoma Trial Group. Reduction of intraocular pressure and glaucoma progression: results from the Early Manifest Glaucoma Trial. **Arch Ophthalmol.**; v.120, p. 1268-1279, 2002.

HENNEKENS, C. H.; BURING, J. E. Epidemiology. In: **Medicine**, Boston/Toronto: Little Brown; 1987a, p. 54-98.

HENNEKENS, C. H.; BURING, J. E. Epidemiology. In: **Medicine**. Boston/Toronto: Little Brown; 1987b, p. 243-246.

HUMAN GENOME ORGANIZATION (HUGO) - Geneva, Switzerland. Disponível em <http://www.genenames.org/index.html>. Verificado em 20 de maio de 2009.

INFELD, D. A.; O'SHEA, J. G. Glaucoma: diagnosis and management. **Postgrad Med.**; v. 74, p. 709-715, 1998.

INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. **Nature**; v. 431, p. 931-945, 2004.

IRKEC, M. T.; SAGLAR, E.; YUCEL, D.; AKAR, G.; BOZKURT, B.; OZGUL, K. R. et al. **Association of single nucleotide polymorphisms in APOE, p53 and p21 genes with primary open-angle glaucoma in Turkish patients.** Disponível em: <http://arvo.abstractsonline.com.2009;864/A450>. Verificado em 27 de maio de 2009.

IZZOTTI, A. DNA damage and alterations of gene expression in chronic-degenerative diseases. **Acta Biochim Pol.**; v. 50, p. 145-154, 2003.

KERRIGAN, L. A.; ZACK, D. J.; QUIGLEY, H. A.; SMITH, S.D.; PEASE, M. E. TUNEL-positive ganglion cells in human primary open-angle glaucoma. **Arch Ophthalmol.**; v. 115, p. 1031-1035, 1997.

KIETHHUBTHEW, S.; SRIPLUNG, H.; AU, W. W. W.; ISHIDA, T. The p53 codon 72 polymorphism and risk of oral cancer in southern Thailand. **Asian Pac J Cancer Prev.**; v. 4, p. 209-214, 2003.

KUEHN, M. H.; FINGERT, J. H.; KWON, Y. H. Retinal Ganglion Cell Death In Glaucoma: Mechanisms and Neuroprotective Strategies. **Ophthalmol Clin N Am.**; v. 18, p. 383-395, 2005.

LANE, D. P. Cancer. p53, guardian of the genome. **Nature.**; v. 358, p. 15-16, 1992.

LIBBY, R. T.; GOULD, D. B.; ANDERSON, M. G.; JOHN, S. W. Complex genetics of glaucoma susceptibility. **Annu Rev Genomics Hum Genet.**; v. 6, p. 15-44, 2005.

LIN, H. J.; CHEN, W. C.; TSAI, F. J.; TSAI, S. W. Distribution of p53 codon 72 polymorphism in primary open angle glaucoma. **Br J Ophthalmol.**; v. 86, p. 767-770, 2002.

LIPTON, S. A.; ROSENBERG, P. A. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. **N Engl J Med.**; v. 330, p. 613-622, 1994.

LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S. L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J. Análise genética em biologia molecular. In: Nader, HB, ed. **Biologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Revinter; 2002, p. 255-293.

LOPEZ-MARTINEZ, LOPEZ-GARRIDO, M. P.; SANCHEZ-SANCHEZ, F.; CAMPOS-MOLLO, E.; COCA-PRADOS, M.; ESCRIBANO, J. Role of



MYOC and OPTN sequence variations in Spanish patients with primary open-angle glaucoma. **Mol Vis.**; v. 13, p. 862-872, 2007.

MACIEL, L. M. Z.; NAVARRO, P. A. A. S.; RODRIGUES, S. S.; IAZIGI, N.; DONADI, E. A. Antígenos de histocompatibilidade de classe II em pacientes brasileiros portadores de doença de Graves com ou sem exoftalmia. **Arq Bras Endocrinol Metabol.**; v. 41, p. 76-81, 1997.

MARSH, S. G. E.; ALBERT, E. D.; BODMER, W. F.; BONTROP, R. E.; DUPONT, B.; ERLICH, H. A. et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 2002. **Tissue Antigens.**; v. 60, p. 407-467, 2002.

MEIRA, D. A.; PELLEGRINO, J. J.; MACHADO, J. M.; TSUJY, K.; MATSUOKA, E. S.; HAIDA, E.; KHOURY, A. B. E. Frequency of human leukocyte antigen (HLA) in patients with malaria and in the general population of Humaita country, Amazonas state, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop.**; v. 20, p. 153-158, 1987.

MELLO, P. A. A.; MANDIA Jr., C. Sociedade Brasileira de Glaucoma: 2º Consenso Brasileiro de Glaucoma Primário de Ângulo Aberto. Planalto Paulista, **Planmark**, 2005. p. 9.

MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Res.**; v. 16, p. 1215, 1988.

MONEMI, S.; SPAETH, G.; DASILVA, A.; POPINCHALK, S.; ILITCHEV, E.; LIEBMANN, J. et al. Identification of a novel adult-onset primary open-angle glaucoma (POAG) gene on 5q22.1. **Hum Mol Genet.**; v. 14, p. 725-733, 2005.

MORAES, J. R.; MORAES, M. E.; FERNANDEZ-VINA, M.; DIAZ, L. A.; FRIEDMAN, H.; CAMPBELL, I. T. et al. HLA antigens and risk for development of pemphigus foliaceus (fogo selvagem) in endemic areas of Brazil. **Immunogenetics.**; v. 33, p. 388-391, 1981.

NASKAR, R.; DREYER, E. B. New horizons in neuroprotection. **Surv Ophthalmol.**; v. 45, p. 250-255, 2001.

NICKELLS, R. W. Retinal ganglion cell death in glaucoma: the how, the why, and the maybe. **J Glaucoma**; v. 5, p. 345-356, 1996.

NICKELLS, R. W. Apoptosis of retinal ganglion cells in glaucoma: an update of the molecular pathways involved in cell death. **Surv Ophthalmol.**; v. 43, p. 151-161, 1999.

OPPENHEIM, R. W. Cell death during development of the nervous system. **Ann Rev Neurosci.**; v. 14, p. 453-501, 1991.

OKISAKA, S.; MURAKAMI, A.; MIZUKAWA, A.; ITO, J. Apoptosis in retinal ganglion cell decrease in human glaucomatous eyes. **Jpn J Ophthalmol.**; v. 41, p. 84-88, 1997.

PANG, C. P. Molecular diagnostics for cardiovascular disease. **Clin Chem Lab Med.**; v. 36, p. 605-614, 1998.

PANG, C. P.; LEUNG, Y. F.; FAN, B.; BAUM, L.; TONG, W. C.; LEE, W. S. et al. TIGR/MYOC gene sequence alterations in individuals with and without primary open angle glaucoma. **Invest Ophthalmol Vis Sci.**; v. 43, p. 3231-325, 2002.

PINHO, M. S. L. Proteína p53: algum valor clínico ou apenas pesquisa? Uma revisão da literatura. **Rev Bras Coloproct.**; v. 20, p. 258-260, 2000.

POVOA, C. A.; NICOLELA, M. T.; VALLE, A. L. S. L.; GOMES LES, NEUSTEIN I. Prevalência de glaucoma identificada em campanha de detecção em São Paulo. **Arq Bras Oftalmol.**; v. 64, p. 303-307, 2001.

POVOA, C. A.; MALTA, R. F. S.; REZENDE, M. M.; MELO, K. F. S.; GIANNELLA-NETO, D. Correlation between genotype and phenotype in primary open angle glaucoma of Brazilian families with mutations in exon 3 of the TIGR/MYOC gene. **Arq. Bras. Oftalmol.**; v. 69, 289-297, 2006.

QUIGLEY, H. A.; NICKELLS, R. W.; KERRIGAN, L. A.; PEASE, M. E.; THIBAUT, D. J.; ZACK, D. J. Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma and after axotomy occurs by apoptosis. **Invest Ophthalmol.**; v. 36, p. 774-786, 1995.

QUIGLEY, H. A.; BROMAN, A. T. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. **Br J Ophthalmol.**; v. 90, p. 262-267, 2006.

RESSINIOTIS, T.; GRIFFITHS, P. G.; BIRCH, M.; KEERS, S.; CHINNERY, P. F. Primary open angle glaucoma is associated with a specific p53 gene haplotype. **J Med Genet.**; v. 41, p. 296-298, 2004.

RESNIKOFF, S.; PASCOLINI, D.; ETYA'ALE, D.; KOCUR, I.; PARARAJASEGARAM, R.; POKHAREL, G. P. et al. Global data on visual impairment in the year 2002. **Bull World Health Organ.**; v. 82, p. 844-851, 2004.

REZAIIE, T.; CHILD, A.; HITCHINGS, R.; BRICE, G.; MILLER, L.; COCA-PRADOS, M. et al. Adult-onset primary open-angle glaucoma caused by mutations in optineurin. **Science**; v. 295, p. 1077-1079, 2002.

RIORDAN, E. P.; VAUGHAN, D. G. Eye. In: Tierney, LM JR; McPhee, SJ; PAPADAKIS, MA, eds. **Current Medical Diagnosis & Treatment**. 40<sup>th</sup> ed. New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill, 2001, p. 185-216.

RODRIGUES, M.L.V.; FIGUEIREDO, J. F. C.; MABTUM, E. A.; DEGHAIDE, N. H. S.; SOUZA, N. V.; ROMÃO, E.; DONADI, E. A. **Analysis of class I HLA antigens and class II alleles in Brazilian patients with cytomegalovirus retinitis (CMV-R)**. In: International Proceedings Division. 12<sup>th</sup> World AIDS Conference Geneva, Switzerland, June 28-July 3, 1998. Bologna, Monduzzi Editors, 1998, p.159-163.

RODRIGUES, M. L. V. **Análise de antígenos e alelos de histocompatibilidade, de classes I e II, em pacientes com aids e com aids e retinite por citomegalovírus**. [Tese de Livre-Docência]. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2000,130p.

RODRIGUES, M. L. V.; FIGUEIREDO, J. F. C.; DEGHAIDE, N. H. S.; ROMÃO, E.; SOUZA, N. V.; DONADI, E. A. Frequency of HLA class 1 and 2 alleles in Brazilian patients with AIDS and cytomegalovirus retinitis. **Acta Ophthalmol Scand.**; v. 81, p. 514-516, 2003.

ROSENTHAL, A. R.; PAYNE, R. Association of HLA antigens and primary open-angle glaucoma. **Am J Ophthalmol.**; v. 88(3 Pt 1), p. 479-482, 1979.

SAKATA, K.; SAKATA, L. M.; SAKATA, V. M.; SANTINI, C.; HOPKER, L. M.; BERNARDES, R. et al. Prevalence of glaucoma in a South Brazilian population: Projeto Glaucoma. **Invest Ophthalmol Vis Sci.**; v. 48, p. 4974-4979, 2007.

SCHLOSSTEIN, L.; TERASAKI, P. I.; BLUESTONE, R.; PEARSON, C. M. High association of an HL-A antigen, w27, with ankylosing spondylitis. **N Engl J Méd.**; v. 288, p. 704-706, 1973.

SENA, D. F. R. **Polimorfismo do gene p53 (códon 72) no glaucoma primário de ângulo aberto e no glaucoma de pressão normal.** [Tese de Doutorado]. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 2003, 95p.

SHAULSKY, G.; BEN-ZE'EV, A.; ROTTER, V. Subcellular distribution of the p53 protein during the cell cycle of Balb/c 3T3 cells. **Oncogene**; v. 5, p. 1707-1711, 1990.

SHIINA, T.; INOKO, H.; KULSKI, J. K. An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations: 2004. **Tissue Antigens.**; v. 64, p. 631-649, 2004.

SHIN, D. H.; BECKER, B. The prognostic value of HLA-B12 and HLA-B7 antigens in patients with increased intraocular pressure. **Am J Ophthalmol.**; v. 82(6), p. 871-874, 1976.

SIEVING, P. A.; COLLINS, F. S. Genetic ophthalmology and the era of clinical care. **JAMA**; v. 297, p. 733-736, 2007.

SOMMER, A.; TIELSCH, J. M.; KATZ, J.; QUIGLEY, H. A.; GOTTSCH, J. D.; JAVITT, J. et al. Relationship between intraocular pressure and primary open angle glaucoma among white and black Americans. The Baltimore Eye Survey. **Arch Ophthalmol.**; v. 109, p. 1090-1095, 1991.

SOUZA, N. V. Distribuição dos antígenos HLA em 100 pacientes com descolamento de retina. **Arq Bras Oftamol.**; v. 45, p. 90-93, 1982.

SPONSEL, W. E. Glaucoma. In: Conn, HF; Rakel, RE; eds. Conn's Current Therapy: latest approved methods of treatment for the practicing physician. Philadelphia, Saunders, 2001, p. 976-979.

STONE, E. M.; FINGERT, J. H.; ALWARD, W. L.; NGUYEN, T. D.; POLANSKY, J. R.; SUNDEN, S. L. et al. Identification of a gene that causes primary open angle glaucoma. **Science**; v. 275, 668-670, 1997.

TADA, M.; FURUUCHI, K.; KANEDA, M.; MATSUMOTO, J.; TAKAHASHI, M.; HIRAI, A. et al. Inactivate the remaining p53 allele or the alternate p73? Preferential selection on the Arg72 polymorphism in cancers with recessive p53 mutants but not transdominant mutants. *Carcinogenesis*; v. 22, p. 515-517, 2001.

TANG, S.; TODA, Y.; KASHIWAGI, K.; MABUCHI, F.; IJIMA, H.; TSUKAHARA, S. et al. The association between Japanese primary open-angle glaucoma and normal tension glaucoma patients and the optineurin gene. **Hum Genet.**; v. 113, p. 276-279, 2003.

THOMAS, M.; KALITA, A.; LABRECQUE, S.; PIM, D.; BANKS, L.; MATLASHEWSKI, G. Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. **Mol Cell Biol.**; v. 19, p. 1325-1328, 1999.

TORRES, E. A.; SILVA, M. R. B. M.; BORTOLOZZI, J.; PELLEGRINO-Jr, J.; DELIMA, M. G. Complexo HLA e glaucoma crônico simples. **Rev Bras Alergia Imunopatol.**; v. 12, p. 198-201, 1989.

VOUSDEN, K. H.; LU, X. Live or let die: the cell's response to p53. **Nat Rev Cancer**; v. 2, p. 594-604, 2002.

WALFORD, R. L.; FINKELSTEIN, S.; NEERHOUT, R.; KONRAD, P.; SHANBROM, E. Acute childhood leukemia in relation to the HLA human transplantation genes. **Nature**; v. 225, p. 461-462, 1970.

WALTMAN, S. R.; PALMBERG, P.; NEWTON, W.; BECKER, B. Glaucoma and HLA antigens. **Lancet**.; v. 1, p. 927, 1975.

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. A structure for deoxyribose nucleic acid. **Nature**; v. 171, p. 737-738, 1953.

WESTON, B. C.; ALIABADI, Z.; WHITE, G. L. Glaucoma- review for the vigilant clinician. **Clinician Reviews**; v. 10, p. 59-74, 2000.

WIGGS, J. L.; ALLINGHAM, R. R.; VOLLRATH, D.; JONES, K. H.; DE LA PAZ, M.; KERN, J. et al. Prevalence of mutations in TIGR/Myocilin in patients with adult and juvenile primary open-angle glaucoma. **Am J Hum Genet**.; v. 63, p. 1549-1552, 1998.

WIGGS, J. L.; AUGUSTE, J.; ALLINGHAM, R. R.; FLOR, J. D.; PERICAK-VANCE, M. A.; ROGERS, K. et al. Lack of association of mutations in optineurin with disease in patients with adult-onset primary open-angle glaucoma. **Arch Ophthalmol**.; v. 121, 1181-1183, 2003.

YOLES, E.; SCHWARTZ, M. Potencial neuroprotective therapy for glaucomatous optic neuropathy. **Surv Ophthalmol**.; v. 42, p. 367-372, 1998.

YOSHINARI, N. N.; PASTOR, E. H.; OLIVEIRA, M. A.; ROSALES, T.; CORDONI, R.; COSSERMELLI, W. Estudo dos antígenos HLA-A e HLA-B em portadores de lúpus eritematoso sistêmico. **Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo**; v. 39, p. 208-214, 1984.

ZAREPARSI, S.; DAUGHERTY, C.; CURTIS, H.; NINNESS, B.; OFFUTT, M.; THURSTON, J. et al. **Primary open angle glaucoma is associated with polymorphisms within the P53 gene.** Disponível em: <http://arvo.abstractsonline.com.2009;864/A458>. Acessado em 27 de maio de 2009.

ZENHA, F. **Haplotipos HLA de classe I e evolução do glaucoma primário de ângulo aberto.** [Tese de Doutorado]. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 2008, 71p.

## **8. ANEXOS**

---



## ANEXO 1

### APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA  
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

[www.hcrp.fmrp.usp.br](http://www.hcrp.fmrp.usp.br)



Ribeirão Preto, 28 de maio de 2008


Ofício nº 1871/2008  
CEP/MGV

#### **PROCESSO HCRP nº 11150/2007**

**Prezada Professora,**

O Comitê de Ética em Pesquisa em sua 267ª Reunião Ordinária realizada em 26.05.2008, recebeu a proposta de “Criação do Banco de Amostras de DNA de pacientes com glaucoma no Laboratório de Imunologia Molecular do HCFMRP-USP”, e a enquadrou na categoria: **APROVADO**, bem como o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**.

Atenciosamente.

  
**DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA**  
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética  
em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssima Senhora  
**PROFª DRª MARIA DE LOURDES VERONESE RODRIGUES**  
Depto. de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA  
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

Campus Universitário Monte Alegre - Fone: 602-1000 - Fax: 633-1144  
CEP 14048-900 RIBEIRÃO PRETO - SÃO PAULO

Mem. nº 64/2002  
GS-3/KT

Ribeirão Preto, 24 de abril de 2002

Ilustríssima Senhora

**PROFª DRª MARIA DE LOURDES VERONESE RODRIGUES**

Depto. de Oftalmo, Otorrino e Cirurgia de Cabeça e Pescoço

Em mãos

Prezada Senhora:

Atendendo solicitação do Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa, Prof. Dr. Sérgio Pereira da Cunha, encaminho a Vossa Senhoria Parecer nº 476/2002 – CONEP, referente ao Projeto de Pesquisa intitulado **“TIPIFICAÇÃO DE ANTÍGENOS LEUCOCITÁRIOS DE HISTOCOMPATIBILIDADE EM PACIENTES COM GLAUCOMA”**, de acordo com o Processo HCRP nº 8991/2001.

O parecer informa que seu projeto encontra-se **APROVADO**.

Aproveito a oportunidade para renovar os protestos de estima e consideração.

Atenciosamente.



**KIMIE TANAKA**  
Diretora do Serviço de Comunicações  
Administrativas

R.F. nº 9802



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA  
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

[www.hcrp.fmrp.usp.br](http://www.hcrp.fmrp.usp.br)



Ribeirão Preto, 25 de junho de 2008

Ofício nº 2253/2008  
CEP/SPC


**Prezada Professora,**

O trabalho intitulado **“ANÁLISE DO POLIMORFISMO DO GENE TP53 (CODON 72) EM PACIENTES BRASILEIROS COM GLAUCOMA”**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 268ª Reunião Ordinária realizada em 23/06/2008 e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 9346/2007.

*Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.*

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.



**PROF. DR. SÉRGIO PEREIRA DA CUNHA**  
Coordenador do Comitê de Ética em  
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssima Senhora

**PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> MARIA DE LOURDES VERONESE RODRIGUES**

Depto. de Oftalmo, Otorrino e Cirurgia de Cabeça e Pescoço

## ANEXO 2

### TERMO DE CONSENTIMENTO (PÓS-ESCLARECIMENTO)

EU, \_\_\_\_\_,  
abaixo assinado, tendo sido devidamente esclarecido sobre todas as condições que constam do documento **ESCLARECIMENTO AOS SUJEITOS DA PESQUISA: TIPIFICAÇÃO DE ANTÍGENOS LEUCOCITÁRIOS DE HISTOCOMPATIBILIDADE EM PACIENTES COM GLAUCOMA**, que tem como pesquisadora responsável a Profa. Dra. Maria de Lourdes Veronese Rodrigues, especialmente no que diz respeito ao objetivo da pesquisa, aos procedimentos que serei submetido, aos riscos e aos benefícios, à forma de ressarcimento no caso de eventuais despesas, bem como a forma de indenização por eventuais danos decorrentes da pesquisa, declaro que tenho pleno conhecimento dos direitos e das condições que me foram assegurados, a seguir relacionados:

1. A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida a respeito dos procedimentos, riscos, benefícios e de outras situações relacionadas com a pesquisa e o tratamento a que serei submetido.
2. A liberdade de retirar o meu consentimento e deixar de participar do estudo, a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo à continuidade do meu tratamento.
3. A segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada a minha privacidade.
4. O compromisso de que me será prestada informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar a minha vontade de continuar dele participando.
5. O compromisso de que serei devidamente acompanhado e assistido durante todo o período de minha participação no projeto.
6. O ressarcimento de eventuais despesas decorrentes da minha participação.

Declaro, ainda, que concordo inteiramente com as condições que me foram apresentadas e que, livremente, manifesto a minha vontade em participar do referido projeto.

Ribeirão Preto, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2003.

Assinatura do paciente ou representante legal

Contatos: Hospital das Clínicas - Oftalmologia – Setor de Glaucoma – Campus  
Universitário 14048-900 – Ribeirão Preto, SP – telefone: 3602-2426  
email: [mdlvrodr@fmrp.usp.br](mailto:mdlvrodr@fmrp.usp.br)  
Márcia Abelin Vargas: Pós-graduanda/  
email: [marciabelin@terra.com.br](mailto:marciabelin@terra.com.br)

## **ANEXO DE PUBLICAÇÃO**

---

**TP53 POLYMORPHISM IN BRAZILIAN PATIENTS WITH PRIMARY OPEN-  
ANGLE GLAUCOMA**

Marcia Abelin Vargas<sup>1</sup>; Maria de Lourdes Veronese Rodrigues<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Post-Graduated in Ophthalmology (doctorate) from the Department of Ophthalmology, Otolaryngology, and Head & Neck Surgery - Faculty of Medicine of Ribeirão Preto - University of São Paulo-USP-Brazil

<sup>2</sup>Associate Professor from the Department of Ophthalmology, Otolaryngology, and Head&Neck Surgery - Faculty of Medicine of Ribeirão Preto - University of São Paulo-USP-Brazil

## ABSTRACT

**Purpose:** Based on the assumption that gene *TP53* may play an important role in the apoptosis that occurs in glaucomatous optic neuropathy, gene *TP53* codon 72 polymorphism has been studied in different populations, with conflicting results. Since polymorphism has not been studied in the Brazilian POAG patients, the objectives of the present study were: to determine the distribution of the Pro/Pro, Arg/Arg and Arg/Pro genotypes of gene *TP53* codon 72 in a sample of this population; and to verify the association of these genotypes with POAG. Design: Case-control study. **Methods:** The study was conducted on 51 patients with POAG and 72 normal individuals (control group). POAG diagnosis was based in gonioscopy, tonometry, ophthalmoscopy and Goldmann perimetry. DNA was amplified by polymerase chain reaction. The exon 4 region of gene *TP53* was amplified and digested with the restriction enzyme *BseDI* (restriction fragment length polymorphism). **Main outcome measure:** Determination of gene *TP53* codon 72 Pro/Pro, Arg/Arg or Arg/Pro genotype. Results: The Arg/Pro genotype was the most frequent in Brazilian patients with POAG, but its frequency did not differ significantly from that observed in the controls. **Conclusions:** The results indicate lack of association of any genotype of *TP53* codon 72 polymorphism with POAG.

**Keywords:** *TP53* gene, primary open-angle glaucoma, genetics of glaucoma, apoptosis.

## INTRODUCTION

Glaucoma is one of the major causes of blindness in the world and is the second most frequent cause of legal blindness in industrialized countries. Primary open-angle glaucoma (POAG) is the most common type of glaucoma, which affects more than half of all cases.<sup>1-4</sup>

Two theories, a mechanical one and a vascular one, have been proposed to elucidate the development of glaucoma. Regardless of the mechanism responsible for glaucomatous damage, ganglion cells die, an event that represents the final common pathway of glaucomatous visual loss.<sup>5-6</sup>

Although the mechanisms that mediate the death of ganglion cells in glaucoma are not fully understood, elevated intraocular pressure (IOP) and differences in susceptibility to the death of these cells may be local risk factors. Blockade of axoplasmic flow in the crivous lamina during periods of high IOP may block the impulse of neurotrophins of the terminal axon towards the cell body, leading to cell death by apoptosis.<sup>6-7</sup>

Apoptosis is an autonomous cellular event which is genetically controlled by the agonizing cell. The genes and molecular pathways involved in this process have been intensively studied, but a wide variety of genes are involved. One of the major genes involved in apoptosis is *TP53* which expresses the p53 protein. This protein is characteristically expressed when the DNA is damaged and its main function is to maintain the integrity of the genetic code of each cell.<sup>8-9</sup> In fact, p53 can provoke several responses including the interruption of the cell cycle, cell aging, cell differentiation and apoptosis depending on many factors both intrinsic and extrinsic to the cell such as cell type, cellular environment and other oncogenic changes experienced by the cell.<sup>10</sup>



The polymorphism of the *TP53* locus in codon 72 has been investigated in order to determine its association with various types of cancer all over the world, included in Brazil.<sup>11</sup> Codon 72 codes for the amino acids arginine (CGC;Arg) or proline (CCC;Pro), due to the presence of a single nucleotide polymorphism (SNP) at the second base of the codon.<sup>12,13</sup>

The retinal ganglion cells in glaucoma, receives a stimulus to die. This stimulus may be in the form of loss of neurotrophic support<sup>14</sup> and/or exposure to excess excitatory amino acids (excitotoxins) such as glutamate.<sup>15,16</sup>

In view of the conflicting results obtained in studies on *TP53* codon 72 polymorphism in POAG, and considering that this polymorphism has not been studied in the Brazilian POAG patients, the objective of the present investigation was to determine the distribution of the *TP53* codon 72 polymorphism among Brazilian Caucasoid patients with POAG compared to a health control group, and to determine the association of genotypes Pro/Pro, Arg/Arg and Arg/Pro of *TP53* codon 72 with this disease.

## **METHODS**

The study was conducted on 123 Brazilian Caucasoid individuals, 88 of them males, recruited at the Medical School of Ribeirão Preto University Hospital (HCRP). The patients were divided into two groups: Group 1, consisting of 51 patients with POAG (34 men) ranging in age from 24 to 84 years (median 64 years, SD 15.39) and Group 2, consisting of 72 patients with no systemic or ocular disease (54 men) ranging in age from 22 to 52 years (median 38 years, SD 6.45).

Inclusion criteria for Group 1 were: open anterior chamber angle determined by gonioscopy and IOP levels of 21 mmHg or higher determined by applanation tonometry with a Goldmann tonometer, accompanied by typical changes of glaucoma in the optic nerve observed by direct ophthalmoscopy, and/or typical changes in the visual field.

Exclusion criteria were: history of systemic arterial hypertension, diabetes mellitus and/or Chagas' disease.

Men and women bone marrow Caucasoid donors of the Blood Center of USP, Ribeirão Preto were used as controls.

Before collection of peripheral blood for DNA extraction, the patients gave written informed consent to participate in the study, approved by Ethical Committee of the Medical School of Ribeirão Preto University Hospital (Pr. HCRP 8991/2001 and 9346/2007).

The *TP53* codon 72 was evaluated by using a polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) approach. First, exon 4 of the *TP53* locus was amplified by PCR in a 30 uL reaction containing 1X PCR buffer (0.2 M Tris-HCL pH 8.5; 0.5 M KCl), 2.4 mM of MgCl<sub>2</sub>, 0.3 mM of dNTPS, 1 U of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen) and 0.9 pmol of each primer: Pro – (5' CGT GCA AGT CAC AGA CTT -3') e Arg + (5' TCC CCC TTG CCG TCC CAA -3'). The procedure was carried out as follows: one cycle at 94° C for 5 minutes with the sample heated for DNA denaturation, followed by 35 cycles at 94° C for 45 seconds, 60° C for 45 seconds, and 72° C for 45 seconds for primer hybridization, and a final cycle at 72° C for 4 minutes. The presence of a 279 bp DNA fragment indicated the a positive amplification of the *TP53* exon 4. PCR products were evaluated in 10% polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) stained with 2% silver nitrate.

After the amplification, an aliquot of 7.0  $\mu$ l) of each PCR product was digested with the restriction enzyme *Bse*DI (Fermentas,USA) following the provider recommendations. The RFLP pattern was evaluated on 10% PAGE stained with 2% silver nitrate. The presence of the guanine (corresponding to an arginine residue) or cytosine (corresponding to a proline residue) at codon 72 was detected when the expected size of the DNA fragments (94 bp or 138 bp respectively) occurred.

Probability (p) values were obtained by calculating the chi-square ( $\chi^2$ ) with Yates correction or by the two-tailed Fisher exact test when a box with a value of less than 5 was present in the 2 x 2 table. Values of 0.05 (95% confidence interval) or less were considered to be significant.

## RESULTS

Table 1 and 2 presents the phenotypic and allelic frequencies in patients with POAG and in controls, respectively. There were no significant results in the calculation of the probability (p) values for the different phenotypes and alleles of *TP53* polymorphism.

## DISCUSSION

POAG is a complex neurodegenerative ocular disease involving evidence of a hereditary component<sup>17-19</sup> which reduces vision as retinal ganglion cells (RGC) die<sup>19</sup>. Evidence indicates that apoptosis may be the final common pathway for RGC death since apoptosis markers have been observed in the retina of glaucomatous patients and in experimental glaucoma<sup>6, 20,21</sup>.

*TP53* is a gene implicated in apoptosis that expresses the tumor suppressor protein p53, which is activated by cell damage and is one of the most important molecules involved in cell function. Once activated, p53 can function as a transcription factor that can both increase and decrease the expression of multiple genes.<sup>7</sup>

Based on the assumption that the *TP53* locus may play an important role in the apoptosis that occurs in glaucomatous optic neuropathy, the *TP53* codon 72 polymorphism has been studied in patients with POAG and compared to health controls. Predominance of the Pro/Pro form was detected in patients with POAG in a study on Chinese patients,<sup>22</sup> whereas in another study conducted in Asia<sup>23</sup> this association of *TP53* codon 72 polymorphism was not detected. The Pro/Pro form, although less frequent among American patients with normal pressure glaucoma, was present at a higher proportion in these patients than in controls and was associated with the presence of changes in visual field attributable to glaucoma.<sup>24</sup> *TP53* codon 72 polymorphism, as well as a 16 bp duplication in intron 3 of the *TP53* locus was studied in a British population<sup>25</sup> and in an Australian population<sup>26</sup> with POAG. The authors observed a significant difference in the distribution of haplotype *TP53* which had an insertion of 16 bp together with polymorphism of the Arg allele in codon 72, while in the latter *TP53* codon 72 polymorphism was not associated with the presence of POAG.

The *TP53* codon 72 polymorphism in Brazilian patients with POAG and in health controls was investigated by PCR-RFLP since this is a simple and low-cost technique, in contrast to direct DNA sequencing. This method was used in the first two studies<sup>22,23</sup> published about *TP53* codon 72 polymorphism.

In the present study, the most frequent genotype among patients with POAG was Arg/Pro, as also reported in previous studies,<sup>22,23</sup> and the most frequent genotype

detected among controls was Arg/Arg, as also observed in the Australian study.<sup>26</sup> Comparison of the groups revealed no statistically significant difference between any of the genotypic forms.

The different results obtained in studies on *TP53* codon 72 polymorphism may be due to the different ethnic groups, with miscegenation between the populations under study, especially in the Brazilian population, and a consequent variation of *TP53* gene expression, suggesting that polymorphism may be only one factor contributing to the development of glaucoma.

The glaucoma genetics is complex. A phenotypic change caused by genetic modifiers and some mutations that can cause the disease only when present within a context of genetic susceptibility appear to occur. It is even more difficult to characterize the alleles causing the disease in more complex cases of glaucoma (with no signs of Mendelian inheritance), in which multiple genes and environmental factors probably affect the phenotype, with possibly subtle genetic changes.<sup>19-21,27,28</sup>

Since glaucoma is a disease responsible for an irreversible form of blindness and since molecular genetics techniques have led to great advances in the identification of genes that cause eye diseases, efforts should be devoted to the determination of the genes implicated in the development of glaucoma, permitting an early diagnosis of the disease and the development of strategies for the prevention or delay of its progression.

In conclusion, in Brazilian individuals, no differences were found regarding the *TP53* codon 72 polymorphism in POAG and health controls.

## **ACKNOWLEDGEMENT**

To Drs. Dayse Figueiredo Ribeiro de Sena and Renata Toscano Simões.

**REFERENCES**

1. Klein BE, Klein R, Sponsel WE, Franke T, Cantor LB, Martone J, et al. Prevalence of glaucoma. The Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology* 1992;99:1499-504.
2. Dielemans I, Vingerling JR, Wolfs RC, Hofmann A, Grobbee DE, de Jong PT. The prevalence of primary open-angle glaucoma in a population-based study in the Netherlands. The Rotterdam Study. *Ophthalmology* 1994;101:1851-55.
3. Leske MC, Connell AM, Schachat AP, Hyman L. The Barbados Eye Study. Prevalence of open angle glaucoma. *Arch Ophthalmol*. 1994;112:821-9.
4. Quigley HA, Vitale S. Models of open-angle glaucoma prevalence and incidence in the United States. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1997;38:83-91.
5. Garcia-Valenzuela, E, Shareef S, Walsh J, Sharma SC. Programmed cell death of retinal ganglion cells during experimental glaucoma. *Exp Eye Res*. 1995;61:33-44.
6. Quigley HA, Nickells RW, Kerrigan LA, Pease ME, Thibault DJ, Zack DJ. Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma and after axotomy occurs by apoptosis. *Invest Ophthalmol*. 1995;36:774-86.
7. Nickells RW. Apoptosis of retinal ganglion cells in glaucoma: an update of the molecular pathways involved in cell death. *Surv Ophthalmol*. 1999;43:151-61.
8. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*. 1992;358:15-6.
9. Pinho MSL. Proteína p53: algum valor clínico ou apenas pesquisa? Uma revisão da literatura. *Rev Bras Coloproct*. 2000;20: 258-60.
10. Bálint EE, Vousden KH. Activation and activities of the p53 tumor suppressor protein. *Br J Cancer*. 2001;85:1813-23.
11. Honma HN, De Capitani EM, Perroud MW Jr, Barbeiro AS, Toro IF, Costa DB et al. Influence of p53 codon 72 exon 4, GSTM1, GSTT1 and GSTP1\*B

- polymorphisms in lung cancer risk in a Brazilian population. *Lung Cancer*. 2008;61:152-62.
12. Tada M, Furuuchi K, Kaneda M, Matsumoto J, Takahashi M, Hirai A, et al. Inactivate the remaining p53 allele or the alternate p73? Preferential selection on the Arg72 polymorphism in cancers with recessive p53 mutants but not transdominant mutants. *Carcinogenesis*. 2001;22:515-7.
  13. Thomas M, Kalita A, Labrecque S, Pim D, Banks L, Matlashewski G. Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. *Mol Cell Biol*.1999;19:1325-8.
  14. Dumont P, Leu JI, Della Pietra AC III, George DL, Murphy M. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet* 2003; 33:357-365.
  15. Oppenheim RW. Cell death during development of the nervous system. *Ann Rev Neurosci*.1991;14:453-501.
  16. Lipton SA, Rosenberg PA. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med*.1994;330:613-22.
  17. Naskar R, Dreyer EB. New horizons in neuroprotection. *Surv Ophthalmol*.2001;45:250-5.
  18. Harris D. The inheritance of glaucoma - A pedigree of familial glaucoma. *Am J Ophthalmol*.1965;60:91-5.
  19. Stone EM, Fingert JH, Alward WL, Nguyen TD, Polansky JR, Sunden SL, et al. Identification of a gene that causes primary open angle glaucoma. *Science*.1997;275:668-70.

- 
20. Libby RT, Gould DB, Anderson MG, John SW. Complex genetics of glaucoma susceptibility. *Annu Rev Genomics Hum Genet.*2005;6:15-44.
  21. Kerrigan LA, Zack DJ, Quigley HA, Smith SD, Pease ME. TUNEL-positive ganglion cells in human primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol.*1997;115:1031-5.
  22. Okisaka S, Murakami A, Mizukawa A, Ito J. Apoptosis in retinal ganglion cell decrease in human glaucomatous eyes. *Jpn J Ophthalmol.* 1997;41:84-8.
  23. Lin HJ, Chen WC, Tsai FJ, Tsai SW. Distribution of p53 codon 72 polymorphism in primary open angle glaucoma. *Br J Ophthalmol.*2002;86:767-70.
  24. Acharya M, Mitra S, Mukhopadhyay A, Khan M, Roychoudhury S, Ray K. Distribution of p53 codon 72 polymorphism in Indian primary open angle glaucoma patients. *Mol Vis.*2002;30:367-71.
  25. Sena DFR. Polimorfismo do gene p53 (codon 72) no glaucoma primário de ângulo aberto e no glaucoma de pressão normal.[Thesis].Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo;2003.
  26. Ressiniotis T, Griffiths PG, Birch M, Keers S, Chinnery PF. Primary open angle glaucoma is associated with a specific p53 gene haplotype. *J Med Genet.* 2004;41:296-8.
  27. Dimasi DP, Hewitt AW, Green CM, Mackey DA, Craig JE. Lack of association of p53 polymorphisms and haplotypes in high and normal tension open angle glaucoma. *J Med Genet.*2005;42:e55.
  28. Alward WL, Fingert JH, Coote MA, Johnson AT, Lerner SF, Junqua D, et al. Clinical features associated with mutations in the chromosome 1 open-angle glaucoma gene (GLC1A). *N Engl J Med.*1998;338:1022-7.



29. Pova CA, Malta RFS, Rezende MM, Melo KFS, Giannella-Neto D. Correlation between genotype and phenotype in primary open angle glaucoma of Brazilian families with mutations in exon 3 of the TIGR/MYOC gene. *Arq. Bras. Oftalmol.*2006;69:289-97.

**Table 1-** *TP53* codon 72 genotype frequencies in Primary open-angle glaucoma (POAG) patients and health controls. Ribeirão Preto, SP. 2006-2008.

Group	Genotype		
	Pro/Pro n (%)	Arg/Arg n (%)	Arg/Pro n (%)
<b>I (POAG)</b>	4 (7,9%)	22 (43,1%)	25 (49,0%)
<b>II (CONTROLS)</b>	4 (5,5%)	39 (54,2%)	29 (40,3%)

**Table 2-** *TP53* codon 72 allelic frequencies in Primary open-angle glaucoma (POAG) patients and health controls. Ribeirão Preto, SP. 2006-2008.

Group	Codon coding for	
	Pro	Arg
<b>POAG</b>	33 (32,4%)	69 (67,6%)
<b>Controls</b>	37 (25,7%)	107 (74,3%)

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)