

**Cristiano Caixeta-Umbelino**

**FREQÜÊNCIAS DAS MUTAÇÕES T34T, E50K, M98K,  
691\_692insAG E R545Q NO GENE “OPTINEURIN” EM  
PACIENTES COM GLAUCOMA PRIMÁRIO DE ÂNGULO  
ABERTO NUMA POPULAÇÃO BRASILEIRA**

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação da  
Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de  
São Paulo para obtenção do título de mestre em  
Medicina.

São Paulo

2007

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**Cristiano Caixeta-Umbelino**

**FREQÜÊNCIAS DAS MUTAÇÕES T34T, E50K, M98K,  
691\_692insAG E R545Q NO GENE “OPTINEURIN” EM  
PACIENTES COM GLAUCOMA PRIMÁRIO DE ÂNGULO  
ABERTO NUMA POPULAÇÃO BRASILEIRA**

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação da  
Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de  
São Paulo para obtenção do título de mestre em  
Medicina.

Área de concentração: Ciências da Saúde

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mônica Barbosa de Melo

São Paulo

2007

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central da  
Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo

Caixeta-Umbelino, Cristiano

Freqüências das mutações T34T, E50K, M98K, 691\_692insAG e R545Q no gene "*optineurin*" em pacientes com glaucoma primário de ângulo aberto numa população brasileira./ Cristiano Caixeta-Umbelino. São Paulo, 2007.

Tese de Mestrado. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo – Curso de pós-graduação em Medicina.

Área de Concentração: Ciências da Saúde  
Orientador: Mônica Barbosa de Melo

1. Glaucoma ângulo aberto/genética 2. Genes
3. Freqüência do gene 4. Mutação

BC-FCMSCSP/26-07

O presente trabalho foi realizado com apoio financeiro da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - bolsa na modalidade II) e do Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

À minha esposa Daniela, pela  
compreensão e incentivo a sempre  
superar meus limites.

Aos meus pais Terezinha e Antônio,  
exemplo de companheirismo e superação.

Quem não compreende um olhar tampouco  
compreenderá uma longa explicação.

Mario Quintana

## ***AGRADECIMENTOS ESPECIAIS***

Ao Prof. Dr. Geraldo Vicente de Almeida, Médico assistente do Departamento de Oftalmologia da Santa Casa de São Paulo, pelo invejável conhecimento, constante disposição e entusiasmo, que torna tantos de seus alunos apaixonados pela oftalmologia. Exemplo de ética e caráter de personalidade marcante e espírito empreendedor. Dr Geraldo vários são os mestre que temos ao logo da vida, poucos são os mestres que serão lembrados a vida inteira.

Ao Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mônica Barbosa de Melo assistente do departamento de Biologia Molecular da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, pela incansável dedicação, paciência e amor ao que se propõe a fazer. Pessoa ímpar em seu modo de ser e agir. Capaz de transmitir seus ensinamentos com simplicidade e prazer.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Departamento de Oftalmologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo e à Irmandade de Santa Casa de São Paulo, que há 8 anos me acolheram, e onde me sinto em casa.

Ao Prof. Dr. Ralph Cohen, Médico assistente do Departamento de Oftalmologia da Santa Casa de São Paulo, pelo carinho, amizade e confiança ao longo destes anos.

Ao Prof. Dr. Carmo Mandia Júnior, Médico assistente do Departamento de Oftalmologia da Santa Casa de São Paulo, pelo carinho, alegria e por seu incontestável prazer de saborear a vida.

Ao Prof. Maurício Della Paolera, Médico assistente do Departamento de Oftalmologia da Santa Casa de São Paulo, pela amizade e cumplicidade no dia a dia do laboratório e rotina do departamento de oftalmologia.

Ao Amigo Niro Kasahara, Médico assistente do Departamento de Oftalmologia da Santa Casa de São Paulo, pelo exemplo de dedicação, responsabilidade e respeito a tudo e a todos.

Ao Prof<sup>o</sup> Carlos F. Uesugui, Médico assistente do Departamento de Oftalmologia da Santa Casa de São Paulo, pelo exemplo de humildade e desprendimento

Ao Prof<sup>o</sup> Carlos Roberto Neufeld, Médico assistente do Departamento de Oftalmologia da Santa Casa de São Paulo, pelo exemplo de dedicação, sabedoria e amizade.

À estatística Ting, pelo auxílio na análise dos dados referentes a esse estudo.

Aos funcionários da segurança da Santa Casa de São Paulo, que em várias noites e feriados permitiram a minha permanência no laboratório de medicina molecular.

As secretária da pós-graduação Rita e Mirtes, pela competência e disposição constantes.

Aos assistentes, colegas e funcionários do Departamento de Oftalmologia da Santa Casa de São Paulo, em especial a secretária Fátima Canutti, pela amizade e convívio saudável.

## ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<b>aa</b>	aminoácido
<b>AD</b>	autossômico dominante
<b>AR</b>	autosômico recessivo
<b>AS</b>	anti-sense
<b><i>Bbv</i> I</b>	enzima do <i>Bacillus brevis</i> (ATCC 9999)
<b><i>Bs</i> I I</b>	enzima do <i>Bacillus species</i> (R. Morgan)
<b>dATP</b>	desoxiadenosina trifosfato
<b>dCTP</b>	desoxicitosina trifosfato
<b>dGTP</b>	desoxiguanosina trifosfato
<b>dNTP</b>	desoxinucleotídeos trifosfato
<b>dTTP</b>	desoxitimidina trifosfato
<b>EDTA</b>	ácido etilenodiaminotetraacético
<b>GCP</b>	glaucoma congênito primário
<b>GLC</b>	código para genes associados ao glaucoma
<b>GLC1A</b>	primeiro locus associado ao GPAA
<b>GLC1B</b>	segundo locus associado ao GPAA
<b>GLC1C</b>	terceiro locus associado ao GPAA
<b>GLC1D</b>	quarto locus associado ao GPAA
<b>GLC1E</b>	quinto locus associado ao GPAA
<b>GLC1F</b>	sexto locus associado ao GPAA
<b>GLC1G</b>	sétimo locus associado ao GPAA
<b>GPAA</b>	glaucoma primário de ângulo aberto
<b>GPAA-A</b>	GPAA do tipo adulto
<b>GPAA-J</b>	GPAA do tipo juvenil

<b>GCS</b>	glaucoma crônico simples
<b>GPN</b>	glaucoma de pressão normal
<b>M</b>	molar
<b>mA</b>	miliampere
<b>mM</b>	milimolar
<b>mmHg</b>	milímetro de mercúrio
<b>mmol/l</b>	milimol por litro
<b>OPTN</b>	<i>Optic Neuropathy Induced Protein</i>
<b>p</b>	nível de significância estatística
<b>pb</b>	pares de bases
<b>PCR</b>	reação em cadeia da polimerase
<b>PIO</b>	pressão intra-ocular
<b>rpm</b>	rotação por minuto
<b>SSCP</b>	polimorfismo de conformação em fita simples
<b>Stu I</b>	enzima do <i>Streptomyces tubercidius</i> (H. Takahashi)
<b>Taq</b>	thermophilus
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	fator de necrose tumoral $\alpha$
<b>TIGR/MYOC</b>	<i>trabecular induced glucocorticoid response and myocilin gene</i>
<b>Tris-HCl</b>	trishidroximetil aminometano - ácido clorídrico
<b>U</b>	unidade
<b>U/<math>\mu</math>l</b>	unidades por microlitro
<b>UV</b>	luz ultra violeta
<b>x<sup>2</sup></b>	teste de significância do qui-quadrado
<b><math>\mu</math>g</b>	micrograma
<b><math>\mu</math>l</b>	microlitro

# Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>3</b>
1.1.1 Definição e classificação do glaucoma.....	3
1.1.2. Epidemiologia do Glaucoma Primário de Ângulo Aberto.....	5
1.1.3. Fatores de Risco .....	7
1.1.4. Genética e oftalmologia.....	8
1.1.5. Gene “Optineurin”.....	12
1.1.6. Justificativa.....	16
<b>2. OBJETIVO</b> .....	<b>17</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>18</b>
<b>3.1 Recrutamento de pacientes com GPAA e grupo controle</b> .....	<b>18</b>
3.1.1. Critérios de inclusão para portadores de GPAA.....	19
3.1.2 Critérios de exclusão para portadores de GPAA.....	19
3.1.3. Critérios de inclusão para grupo controle.....	19
3.1.4 Critérios de exclusão para grupo controle.....	20
<b>3.2 Coleta de sangue periférico</b> .....	<b>20</b>
<b>3.3 Extração de DNA</b> .....	<b>20</b>
<b>3.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)</b> .....	<b>21</b>
<b>3.6 Reação de Seqüenciamento</b> .....	<b>23</b>
<b>3.7 Purificação da Reação de Seqüenciamento</b> .....	<b>24</b>
<b>3.8 Digestão Enzimática</b> .....	<b>25</b>
<b>3.9 - Análise estatística</b> .....	<b>27</b>
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>29</b>
4.1. Dados Demográficos e Oftalmológicos .....	29
4.2. Análise Genética.....	30
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>39</b>
5.1 Polimorfismo E50K (458 G>A) .....	39
5.2 Mutação T34T (412 G> A) .....	43
5.3 Mutação M98K (603 T>A) .....	46
5.4 Mutação códon de parada prematuro (691_692insAG) .....	49
5.5 Mutação R545Q (1994G>A) .....	50
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>54</b>
<b>7. ANEXOS</b> .....	<b>55</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>66</b>
<b>FONTES CONSULTADAS</b> .....	<b>74</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>75</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>77</b>
<b>LISTA E APÊNDICES</b> .....	<b>78</b>

# **1. INTRODUÇÃO**

O termo glaucoma engloba uma série de doenças oculares que têm como característica comum a escavação progressiva da cabeça do disco óptico, decorrente da perda dos axônios das células ganglionares da retina, com correspondente perda de campo visual (Shields et al, 1996).

O glaucoma pode ser classificado de acordo com a sua etiologia, pelo aspecto anatômico do seio camerular, pelo nível da pressão intra-ocular (PIO  $\geq$  21 mmHg: glaucoma de pressão elevada; PIO  $<$  21mmHg: glaucoma de pressão normal) ou pela idade de seu aparecimento (Leske, 1983).

Entre as diversas formas de glaucoma, a mais prevalente é o glaucoma primário de ângulo aberto (GPAA), que compreende cerca de 50% dos glaucomas, variando de acordo com a população estudada, sendo o tipo predominante entre as populações caucasóide e negra (Sommer et al, 1991).

O GPAA apresenta uma prevalência que varia de 1 a 2% na população acima dos 40 anos de idade e representa uma das principais causas de cegueira no mundo, principalmente entre as populações negras (Tielsch et al, 1991).

Além da PIO, da idade e da raça, a história familiar é outro fator de risco associado ao desenvolvimento do GPAA (Quigley, 1993).

Recentemente, estudos de ligação em famílias com GPAA permitiram identificar os dois primeiros genes associados a esta forma de glaucoma. Apesar desta doença apresentar, principalmente, o padrão complexo de herança (Teikari, 1990), os dois genes identificados foram obtidos por meio de

estudos de ligação em famílias com GPAA e padrão de herança autossômica dominante (Stone et al,1997;Rezaie et al, 2002).

O primeiro gene, identificado por Stone et al, em 1997, foi denominado “Trabecular Meshwork-Induced Glucocorticoid Response Gene/ Myocilin Gene” (*TIGR/MYOC*) localizado no cromossomo 1q21-q31. Estudos em diferentes populações relataram alterações na seqüência do gene *TIGR/MYOC* em 3% a 5% dos pacientes com GPAA (Alward et al, 1998; Ayala-Lugo et al, 2002). No Brasil, a freqüência de mutações no gene *TIGR/MYOC* em pacientes com GPAA-J foi de 35, 7% (Vasconcellos ,2002; Vasconcellos et al, 2003).

Em 2002, Rezaie e colaboradores identificaram na população britânica o gene “Optineurin” (“Optic Neuropathy Induced Protein” – *OPTN*) localizado no cromossomo 10p14-p15, também associado ao GPAA. O mesmo estudo constatou alterações na seqüência deste gene em 16,7% das famílias com GPAA e história familiar de GPAA, incluindo indivíduos glaucomatosos com PIO normal (glaucoma de pressão normal - GPN). A partir deste estudo, outras populações com GPAA foram avaliadas quanto à presença de alterações no gene *OPTN*.

Como não existe estudo que avalie a freqüência das mutações no gene *OPTN* em uma população brasileira de indivíduos com GPAA, o objetivo deste estudo foi avaliar freqüência das mutações T34T, E50K, M98K, 691\_692insAG e R545Q, que são as mutações mais descritos para este gene, a fim de estabelecer o perfil destas alterações em nossa população glaucomatosa.

## **1.1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **1.1.1 Definição e classificação do glaucoma**

O termo glaucoma engloba um grupo heterogêneo de doenças oculares que têm como característica comum a neuropatia óptica, caracterizada pela escavação progressiva do disco óptico, associada à correspondente perda de campo visual (Leske, 1983; Shields et al, 1996; Quigley, Vitale, 1997). O principal fator de risco associado ao desenvolvimento de glaucoma é a pressão intra-ocular (PIO) (Quigley, 1993).

O glaucoma pode ser classificado, segundo a sua etiologia, em primário e secundário; segundo o aspecto anatômico do seio camerular; segundo a idade de seu aparecimento e quanto ao valor da pressão intra-ocular.

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

A classificação do seio camerular, segundo seu aspecto anatômico, é realizada por meio do exame de gonioscopia. A identificação das estruturas que compõem o seio camerular é fator determinante para a classificação do glaucoma em: 1) glaucoma de ângulo aberto 2) glaucoma de ângulo fechado ou fechado (Leske, 1983, Felman, 1998).

O glaucoma pode ser classificado de acordo com a idade de seu aparecimento em congênito (GCP) e glaucoma crônico simples (GCS) do adulto. Existem autores que fazem uma subdivisão no GCS em juvenil (GPAA-

J) e adulto (GPAA-A), contudo esta subdivisão não é consenso entre os glaucomatólogos.

O GCP geralmente desenvolve-se nos primeiros anos de vida, tendo como quadro clínico clássico a epífora, o blefaroespasma, a fotofobia e o bftalmo (Deluise, Anderson, 1983). A elevação da PIO ocorre devido à malformação congênita do seio camerular, impedindo o escoamento adequado do humor aquoso. A incidência do GCP varia de acordo com a população estudada (Gencik et al, 1982; Gencik, 1989; Wagner, 1993).

O glaucoma juvenil (GPAA-J) manifesta-se em indivíduos entre 10 e 35 anos de idade e normalmente apresenta níveis pressóricos elevados (PIO > 21 mmHg). Existe um predomínio de miopia neste tipo de glaucoma e freqüentemente há necessidade de tratamento cirúrgico (Jhonson et al, 1993; Wiggs et al, 1995).

No glaucoma do tipo adulto (GPAA-A), os aspectos clínicos são semelhantes aos aspectos do GPAA-J, os níveis pressóricos tendem a ser mais baixos e o dano glaucomatoso é detectado em idade mais avançada (Jhonson et al, 1996). Entretanto, esta divisão em idade muitas vezes se mostra artificial, devido à sobreposição destes subtipos de glaucoma (Stoilova et al, 1996; Wiggs et al, 1996; Sarfarazi et al, 1998; Wirtz et al, 1999).

Podemos também classificar o glaucoma em relação ao valor PIO: pacientes que apresentam alterações comprovadamente glaucomatosas e PIO abaixo de 21 mmHg (valor teoricamente normal) são chamados de glaucoma de pressão normal (GPN). Pacientes que apresentem PIO acima de 21 mmHg são considerados de glaucoma de pressão elevada.

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

Quigley em 1996 estimou para o ano 2000, a existência de cerca de 66,8 milhões de glaucomatosos no mundo (1,08%), sendo 33 milhões do tipo primário de ângulo aberto. Desta população, calculou-se que 6,6 milhões de indivíduos apresentariam cegueira bilateral, o que representaria a segunda maior causa de cegueira no mundo. Outros autores sugeriram que as probabilidades de desenvolvimento de cegueira unilateral e bilateral (acuidade visual menor do que 20/200 e/ou campo visual com 20º ou menos de visão central) por paciente com GPAA, no decorrer de 15 anos, seriam de 27% e 9%, respectivamente (Hattenhauer et al, 1998). No Brasil, Gullo et al (1995) avaliaram retrospectivamente pacientes atendidos pela primeira vez no Setor de Glaucoma do Hospital das Clínicas da UNICAMP e constataram elevada taxa de cegueira unilateral (51,8%) e bilateral (33,3%). O risco de perda de visão no glaucoma é maior nos indivíduos da raça negra (Sommer et al, 1991), na faixa etária acima de 60 anos (Perkins, 1978), e nos países em desenvolvimento (Thylefors, 1995).

Dados mais recentes da Organização Mundial de Saúde (OMS) publicados em seu boletim oficial do ano de 2004, cujos dados foram compilados em 2002, apresentam números diferentes dos já estimados anteriormente, porém, a própria OMS afirma mudanças nos parâmetros de avaliação e análise dos dados epidemiológicos comparados com estudos anteriores. No boletim de 2004, estima-se que o número de pessoas com deficiência visual caracterizadas como baixa visão (acuidade visual  $< 6 / 18$  e  $> 3 / 60$  e perda de campo visual menor que 20º e maior que 10º centrais no melhor olho) seja de 161 milhões de pessoas e que 37 milhões sejam cegas

(acuidade visual < 3 / 60 e campo visual menor que 10º centrais no melhor olho). O glaucoma é considerado a segunda maior causa de cegueira neste estudo, acometendo 12,3% da população mundial. Independentemente da diferença numérica apresentada pelos autores, a incidência de cegueira pelo glaucoma no mundo é muito elevada, principalmente, se levarmos em consideração que esta é uma causa tratável de cegueira. Além disso, é uma doença que impõe à sociedade um custo elevado tanto no aspecto socioeconômico quanto no político (Resnikoff et al, 2004).

Smith & Smith em 1996 constataram a perda de um quarto a um sexto do produto interno bruto *per capita* no Reino Unido devido à cegueira. No Brasil Magacho et al em 2002 avaliando o custo do tratamento do glaucoma, apresentaram dados onde o gasto médio do paciente era de 36,09 ± 31,99 reais, valores que chegavam a comprometer até 15,5% da renda familiar. Publicações mais recentes avaliando o custo do tratamento na Europa demonstram que os gastos podem variar de €455 a € 969 euros por ano de acordo com a gravidade da doença (Traverso et al, 2005).

A prevalência do GPAA varia conforme a etnia, a faixa etária e a localização geográfica da população estudada. Em caucasianos acima de 40 anos, a mesma situa-se entre 0,8% e 3,0%; entre 4,74% e 8,8% em indivíduos da raça negra acima de 30 anos e na população japonesa acima de 40 anos é de 2,6% (Bengtsson, 1981; Tielch et al, 1991; Shiose et al, 1991; Klein et al, 1992; Coffey et al, 1993; Dielemans et al, 1994; Leske et al, 1994; Michell et al, 1996; Mason et al, 1989). Recentemente foram publicados dados do Blue Mountain Eye Study que mostram que a incidência pela idade nesta população foi crescente. Nos indivíduos com 40 anos a frequência foi de 0,07%; aos 50

anos de 0,2%; aos 60 anos de 0,7%; aos 70 anos de 2,3% e aos 80 anos esta incidência triplicou atingindo 6,9% da população nesta faixa etária (Hitzl W et al, 2007).

### **1.1.3. Fatores de Risco**

Dentre os fatores de risco relacionados ao glaucoma podemos citar a PIO, a raça, a idade, a miopia. A PIO é o único parâmetro no qual podemos atuar no tratamento do glaucoma. Em geral, quanto mais alta maior a possibilidade de dano ao nervo óptico (Armaly et al, 1980; Leske et al, 1995). A raça negra é sabidamente mais frequentemente acometida, em comparação às raças branca e amarela. Além da maior frequência, o grau de severidade e progressão da lesão óptica também é maior na raça negra (Tielch et al., 1991; Quigley, Vitale, 1997). Quanto à idade, estudos indicam que a prevalência do glaucoma aumenta com o envelhecimento. (Armaly et al, 1980; Shiose et al, 1991; Leske et al, 1994). A miopia também é descrita por alguns autores com fator de risco para o glaucoma. (Michell et al, 1999; Wu et al, 2000).

Além dos fatores já mencionados, a história familiar é outro fator de risco associado ao GPAA. Vários estudos sugerem que o indivíduo com antecedente familiar de glaucoma apresenta um maior risco de desenvolvimento da doença e, possivelmente, um maior risco de sua progressão. A frequência da relação entre glaucoma e história familiar nos estudos é variada, mas sempre ocorre uma maior incidência da doença no grupo que apresenta antecedentes na família, quando comparado ao grupo sem história familiar (Tielsch et al, 1994; Leske et al, 1995; Wu, Leske, 1997).

#### 1.1.4. Genética e oftalmologia

A genética é a ciência da diversidade biológica. Nos últimos 45 anos, a genética humana evoluiu da diversidade fenotípica até chegar à variação do DNA propriamente dito.

A genética médica é um ramo da genética humana que estuda a relação entre a diversidade biológica em humanos, saúde e doença. Dedicase à investigação de doenças que acometem pacientes e seus familiares, seu diagnóstico, prevenção e tratamento (Mckusick, 1992). A evolução da genética médica permitiu determinar que as doenças podem apresentar um padrão de herança monogênico ou um padrão herança poligênica multifatorial. No padrão de herança monogênico podemos ter os tipos autossômico dominante (AD), autossômico recessivo (AR), ligado ao sexo (ligado ao X) e mitocondrial. O padrão complexo de hereditariedade, envolve mais de um gene e possíveis fatores ambientais na determinação etiológica da doença (herança poligênica multifatorial) (Teikari, 1987, 1990).

A determinação exata do padrão de herança é dificultada pela variabilidade da penetrância e expressividade da doença. Penetrância é um conceito que, geralmente, se refere à expressão de um genótipo mutante, aplicado a caracteres dominantes em heterozigose. A penetrância de um alelo mutante pode variar de acordo com a porcentagem de indivíduos portadores deste que manifestem seu fenótipo correspondente. Por exemplo, se uma condição se expressar em 100% dos indivíduos que possuam o alelo responsável, este alelo apresentaria uma penetrância de 100%, ao passo que, se esta mesma condição estiver presente em 70% das pessoas portadoras do alelo mutante, isto corresponderia a uma penetrância de 70% para este alelo. A

expressividade corresponde ao grau de severidade de uma moléstia associada a uma alteração genética. Se uma condição apresentar uma expressividade variável, o fenótipo (manifestação clínica) determinado por esta alteração genética variará em grau de intensidade (leve a intenso), mas sempre presente entre os indivíduos que possuírem o genótipo correspondente (Mussarella, 1992; Damji, Allingham, 1997).

A genética e a oftalmologia estão historicamente associadas desde o início do século XX. Em 1911, Wilson deduziu que a deficiência da visão de cores estava localizada no cromossomo X. Em 1947, observou-se a ligação no padrão de transmissão hereditária entre duas moléstias (hemofilia e deficiência de visão de cores) (Damji, Allingham, 1997). Em 1963, identificou-se a primeira doença humana ligada a um cromossomo autossomo: catarata pulverulenta com grupo sangüíneo Duffy no cromossomo 1 (Damji, Allingham, 1997).

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

A classificação proposta pela Organização Mundial do Genoma Humano designa para os genes associados ao glaucoma a sigla "GLC" (Raymond, 1997). Os números "1", "2" e "3" que seguem a sigla geral ("GLC") para os glaucomas representam ângulo aberto, ângulo fechado e glaucoma congênito, respectivamente. Finalmente, as letras "A", "B", "C" e assim por diante, indicam o primeiro e os subseqüentes *loci* identificados para determinado tipo de glaucoma (Raymond, 1997). Assim, o primeiro *locus* identificado em

associação com o GPAA recebeu o nome de GLC1A, enquanto o primeiro *locus* relacionado ao glaucoma congênito foi denominado GLC3A.

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

Até o momento temos a descrição de onze *loci* e três genes relacionados ao glaucoma primário de ângulo aberto (Tabela 1). O primeiro gene, situado no *locus* GLC1A (cromossomo 1q21-q31), foi o gene *TIGR/MYOC*, descrito em 1997 por Stone e colaboradores. Mutações no gene *TIGR/MYOC* são a causa mais freqüente de cegueira com base molecular conhecida. O segundo gene identificado foi o gene *OPTN*, situado no *locus* GLC1E (cromossomo 10p14-p15) e o terceiro gene associado ao GPAA, o “WD40-repeat 36” (*WDR36*) situado no *locus* GLC1G (cromossomo 5q22.1), foi identificado por Monemi e colaboradores em 2005.

TABELA 1: *Loci* genéticos descritos para o glaucoma primário de ângulo aberto

<b>Localização no cromossomo</b>	<b>Nome do locus</b>	<b>Gene identificado</b>	<b>Autor</b>
1q21-q31	GLC1A	<i>MYOC</i>	Stone et al, 1997
2p4	-	-	Wiggs JL et al, 2000
2p16.3-p15	GLC1H	-	<a href="http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature">www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature</a>
2cen-q13	GLC1B	-	Stoilova D et al, 1996
2q33-q34	-	-	Nemesure B et al, 2003
3p21-p22	-	-	Baird PN et al, 2005
3q21-q24	GLC1C	-	Wirtz MK et al, 1997
5q22.1	GLC1G	<i>WDR36</i>	Monemi S et al, 2005
7q35-q36	GLC1F	-	Wirtz MK et al, 1999
8q23	GLC1D	-	Trifan OC et al, 1998
9q22	GLC1J	-	Wiggs JL et al, 2004
10p12-p13	-	-	Nemesure B et al, 2003
10p14-p15	GLC1E	<i>OPTN</i>	Rezaie et al, 2002
14q11	-	-	Wiggs JL et al, 2000
14q21-q22	-	-	Wiggs JL et al, 2000
15q11-q13	GLC1I	-	Allingham RR et al, 2005
17p13	-	-	Wiggs JL et al, 2000
17q25	-	-	Wiggs JL et al, 2000
19q12-q14	-	-	Wiggs JL et al, 2000
20p12	GLC1K	-	Wiggs JL et al, 2004

Fonte: Adaptado de Bao Jian Fan et al 2006

### 1.1.5. Gene “Optineurin”

Descrito por Rezaie et al (2002), o gene *OPTN* foi relacionado à história familiar de GPAA e ao GPN. Tal aspecto, adicionado ao fato do gene *OPTN* poder participar da via de sinalização do fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), que está relacionada ao processo de apoptose celular do nervo óptico, abre novas perspectivas para o entendimento do mecanismo do dano glaucomatoso (Sarfarazi, Rezaie,2003). Posteriormente, observou-se que a expressão do gene *OPTN* no seio camerular (malha trabecular) estava aumentada após exposição à dexametasona, ao TNF- $\alpha$  e ao aumento da PIO, sugerindo que a proteína codificada por este gene poderia exercer função protetora neste tecido (Vittitow, Borrás, 2002). Portanto, tanto o disco óptico como o seio camerular, estruturas diretamente envolvidas na patogenia do glaucoma, apresentam expressão do gene *OPTN*, a análise deste dado poderá contribuir na determinação e seguimento do glaucoma.

O gene *OPTN* é constituído por 16 exons, dos quais três são considerados não codificadores (região 5'- não traduzida ou 5'UTR) e os demais 13 exons codificam uma proteína com 577 aminoácidos. (número de acesso no GenBank AF420371 a AF420373).

Rezaie et al em 2002, constataram as primeiras alterações na seqüência deste gene em 16,7% das famílias com GPAA, incluindo indivíduos glaucomatosos com PIO normal (GPN). Quatro alterações, divididas em a, b, c, e d, foram identificadas por estes autores: a) A mutação E50K, no exon 4 (458G>A), descrita em 7 famílias glaucomatosas (124 membros) sendo que 38 indivíduos apresentavam a mutação e glaucoma. Dos pacientes com glaucoma, 7 (18,4%) tinham PIO elevada, os demais apresentavam PIO dentro

dos valores estatisticamente normais (PIO < 21mmHg); b) A mutação no exon 6, determinada pela inserção de dois pares de bases “AG” na posição 691\_692 do gene *OPTN*, identificado em uma família com GPN. Essa alteração leva ao truncamento do produto protéico em 76% de sua extensão (levando à possível perda da função por haploinsuficiência); c) A mutação R545Q, no exon 16 (1944G>A), em uma família com GPN. Esta mutação localiza-se em uma parte desconhecida da proteína próximo a um motivo normalmente observado entre os fatores de transcrição (“zinc finger motif”); d) A quarta alteração na seqüência descrita neste estudo foi a M98K, no exon 5 (603T>A), observada entre as famílias glaucomatosas (13,6% - 23/169) e no grupo controle (2,1% - 9/422), com freqüência significativamente maior entre os indivíduos glaucomatosos ( $p = 2,18 \times 10^{-7}$ ).

A partir deste estudo, outras populações com GPAA foram avaliadas quanto à presença de alterações estruturais no gene *OPTN*.

Alguns grupos não relataram a presença destas mutações no gene *OPTN* em pacientes com GPAA, como o de Walter et al (2002) que analisaram indivíduos com GPAA e PIO elevada (>21mmHg) e Forsman et al (2003) que avaliaram 8 famílias Norueguesas com GPAA. Outros pesquisadores, apesar de observarem variações no gene *OPTN* em pacientes com GPAA provenientes de diferentes regiões, não as correlacionaram com a doença, quando comparados a um grupo controle (Raymond et al, 2002, na população francesa do Canadá, Wiggs et al, 2003 em indivíduos da Inglaterra e do sudeste dos Estados Unidos da América, Umeda et al, 2002 e Tang et al, 2003 na população japonesa, Baird et al, 2004, na população caucasiana da Austrália, Wang et al, em 2004, em uma família das Filipinas, Weischuh et al,

em 2005, na população alemã, Rezaie et al, em 2005, em um grupo de indivíduos da Suécia e Hauser et al, em 2006, nos Estados Unidos da América).

Entretanto, vários estudos relatam a associação entre as mutações no gene *OPTN* e a doença. Melki e colaboradores, em 2003, estudando comparativamente um grupo de franceses e um grupo de marroquinos, portadores de GPAA encontraram a mutação M98K (603 T>A) em maior frequência na população marroquina.

Na população Britânica foram investigadas duas alterações, a E50K e M98K, em pacientes portadores de GPAA e GPN, além de indivíduos pertencentes ao grupo controle, contudo estas mutações foram infreqüente (Child et al, 2002).

Fuse e colaboradores, em 2004, avaliando a população japonesa, não encontraram as alterações E50K (458 G>A), 691\_692 insAG e R545Q (1944G>A). As alterações T34T (412 G> A) e M98K (603T>A) foram observadas, porém apenas a mutação M98K (603 T>A) apresentou-se com frequência estatisticamente significativa, na comparação dos grupos GPAA e controle ( $p= 0,009$ ). Outro estudo também com a população japonesa, relatou uma frequência estatisticamente significativa para a mutação T34T na comparação entre portadores de GPAA e controles ( $p= 0,009$ ). A frequência das mutações M98K (603 T>A) e R545Q (1994G>) não foram estatisticamente significantes na comparação entre os grupos (Funayama et al, 2004).

Estudos envolvendo a população chinesa avaliaram portadores de GPAA e controles normais e encontraram mutações já descritas como a T34T

(412 G> A), a M98K (603 T>A) e a R545Q (1944 G>A) (Leung et al, 2003 Fan et al, 2005), além de 13 novas seqüências alteradas (Leung et al, 2003).

Em 2003, o grupo de Alward, estudou 1048 pacientes com GPAA de diferentes etnias e 251 controles, encontrando as mutações E50K (458 G>A), M98K (603T>A) e R545Q (1944G>A), principalmente no grupo de etnia japonesa.

Na Inglaterra, Willoughby et al, em 2004, avaliaram uma população miscigenada, composta por indivíduos portadores de GPAA-J, GPAA e controles normais observando que as mutações T34T (412 G> A), R545Q (1944G>A) e M98K (603T>A) foram encontradas em diferentes freqüências e significância distinta entre os grupo étnicos analisados.

Mukhopadhyay et al, em 2005, avaliaram portadores de GPAA e indivíduos controles, provenientes de várias partes da Índia, detectando as alterações T34T (412 G> A), M98K (603 T>A) e R545Q (1994G>A) em seus resultados. Entretanto apenas a R545Q (1994G>A) apresentou resultado estatisticamente significativo entre os grupos ( $p<0,05$ ).

### **1.1.6. Justificativa**

O segundo gene associado ao GPAA foi o *OPTN*. A presença de alterações estruturais neste gene ocorre em grupos populacionais específicos, tornando importante a caracterização do mesmo na população brasileira. No primeiro estudo, realizado por Rezaie et al em 2002, e em trabalhos subsequentes, cinco mutações têm sido consistentemente descritas como associadas ao dano glaucomatoso ou ao risco de desenvolvimento da doença, T34T, E50K, 691\_692insAG, M98K, e R545Q, sendo as mesmas o objetivo deste estudo.

## **2. OBJETIVO**

1. Determinar a frequência das mutações T34T, E50K, M98K, 691\_692insAG e R545Q no gene *OPTN* em uma população brasileira de pacientes com GPAA e comparar com a frequência encontrada em indivíduos sem glaucoma nesta população.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Recrutamento de pacientes com GPAA e grupo controle**

Após aprovação do projeto de pesquisa submetido ao Comitê de Ética em pesquisa em seres humanos da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (CEP) e à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, iniciamos o recrutamento de voluntários (anexos 1 e 2). Os pacientes com GPAA foram selecionados no Serviço de Glaucoma do Ambulatório de Oftalmologia da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo e no Serviço de Glaucoma do Ambulatório de Oftalmologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

O grupo controle foi selecionado dentre as pessoas que freqüentaram o ambulatório de oftalmologia de ambos os serviços em busca de exames oftalmológicos básicos, como refratometria. Também foram obtidos voluntários para este grupo, através de palestra educativa sobre glaucoma para os freqüentadores do grupo de terceira idade do SESC Dr Vila Nova, organização voltada ao lazer, cultura e bem estar da população.

Foram avaliados neste estudo 99 pacientes com diagnóstico comprovado de GPAA e 100 indivíduos sem diagnóstico de glaucoma (grupo controle). A todos os participantes foram dadas informações sobre o estudo e após esclarecimento de todas as dúvidas, os voluntários assinaram o termo de consentimento e livre esclarecimento (anexo 3).

### **3.1.1. Critérios de inclusão para portadores de GPAA**

Foram incluídos pacientes com diagnóstico de GPAA para avaliação oftalmológica e genética. O GPAA foi definido como: 1. ângulo aberto à gonioscopia, 2. alteração glaucomatosa do disco óptico, incluindo: redução localizada da rima neural; aumento vertical da escavação; hemorragia e assimetria de escavação maior ou igual a 0,2 (relação escavação/disco) segundo avaliação oftalmológica sob visão binocular e 3. lesão glaucomatosa do disco óptico acompanhada por perda de campo visual correspondente na perimetria computadorizada acromática, caracterizada por: três pontos adjacentes não periféricos com  $p < 5\%$  (um deles com  $p < 1\%$  pertencentes ao gráfico de probabilidades do “pattern deviation”); “corrected pattern standard deviation” com  $p < 5\%$  e “glaucoma hemifield test” apresentando o resultado “borderline” ou “outside normal limits”.

### **3.1.2 Critérios de exclusão para portadores de GPAA**

Foram excluídos do estudo pacientes que apresentassem alterações oculares compatíveis com glaucomas secundários (ou de desenvolvimento) e/ou qualquer outra doença ocular ou sistêmica que pudesse levar a alterações de disco óptico e campo visual simulando lesões glaucomatosas.

### **3.1.3. Critérios de inclusão para grupo controle**

Foram incluídos voluntários que, após submetidos a exame oftalmológico, não apresentassem diagnóstico de glaucoma. No exame deveriam apresentar PIOs menores do que 15 mmHg e escavações do disco

óptico menores do que 0,4 (relação escavação/disco), ausência de alterações campimétricas em exame realizado com a perimetria de frequência dupla (FDP), programa “screening”.

#### **3.1.4 Critérios de exclusão para grupo controle**

Foram excluídos do grupo controle indivíduos que apresentassem qualquer alteração, ocular ou sistêmica, que pudesse levar a alterações de disco óptico e campo visual, mimetizando lesões glaucomatosas. Indivíduos com antecedentes familiares de glaucoma ou cegueira de causa desconhecida também foram excluídos. Foi respeitada e acatada qualquer manifestação de desinteresse em participar do estudo.

#### **3.2 Coleta de sangue periférico**

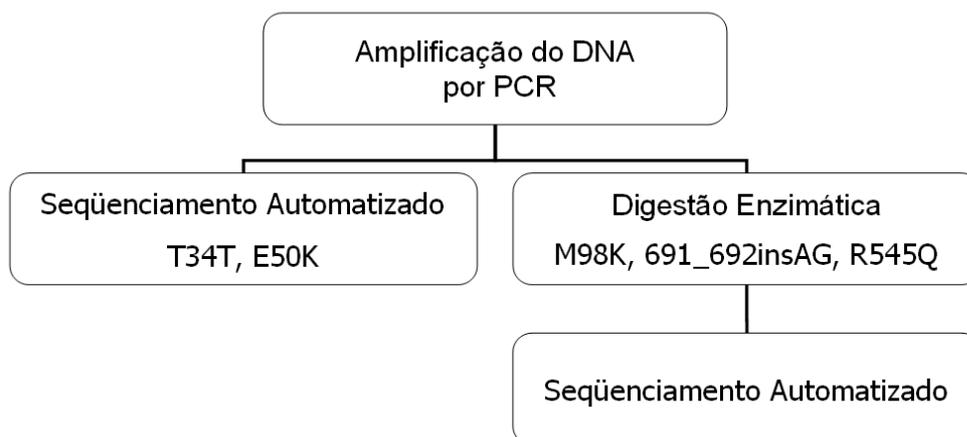
Foi extraída uma amostra de 5 ml de sangue periférico da veia antecubital de todos os participantes, em frasco estéril contendo EDTA 10% como anticoagulante. Os tubos com material coletado foram encaminhados ao Laboratório de Genética Molecular, do Departamento de Genética Médica da Unicamp, onde procedeu-se a extração do DNA.

#### **3.3 Extração de DNA**

A extração de DNA foi realizada segundo o método de fenol/clorofórmio, conforme descrito no anexo 4.

### 3.4 Organograma do modelo do estudo

ORGANOGRAMA 1: Modelo do estudo



### 3.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Foram desenhados 4 pares de oligonucleotídeos iniciadores ou “primers” para amplificação das regiões compreendendo as mutações a serem investigadas (regiões 4, 5, 6 e 16), por meio do programa *primer 3* ([www.broad.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3\\_www.cgi](http://www.broad.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi)), baseando-se na seqüência do gene *OPTN* (Número de acesso no “Genbank” AF420371 a AF420373). Os “primers” foram sintetizados pela Invitrogen™ Life Technologies (Carlsbad, CA, USA) (Tabela 2).

TABELA 2: Seqüências dos “primers”, tamanho do fragmento amplificado e temperatura de anelamento utilizados para o rastreamento de mutações nos 4 exons do gene *OPTN*.

Exon	Fragmento (pb)	Seqüência do “primer” ‘S’	Seqüência do “primer” ‘AS’	TA
4	224	5’GGGGGACAGCTCTATTTTCA3’	CTGCTCACCTTTCAGCTGGT	60°C
5	218	5’TCCACTTTCCTGGTGTGTGA3’	TTTTCCAAGCTCTTCCTTCAA	58°C
6	201	5’ATGGTGCCCGAGCCTTAGTTT3’	CGCTGGAGTTCAGCTTGAG	58°C
16	232	5’CGCCATCTGTTCTTCAAGTG3’	ACCAACAGTTTTGGGGAGGT	58°C

pb: pares de bases, ‘S’: sense, ‘AS’: anti-sense, TA: temperatura de anelamento

Para a reação de PCR, às amostras de DNA foram adicionados 20 pmoles dos “primers” sense e anti-sense, em conjunto com 200 µmoles de cada dNTP, tampão da enzima 1X (Tampão 10X: Tris-HCl 100mM pH 8.3; KCl 500 mM; MgCl<sub>2</sub> 15 mM; gelatina 0,01% w/v), 0,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen<sup>TM</sup> Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), completando-se o volume final da reação para 25µL com água deionizada estéril. As amostras foram amplificadas em aparelho ciclador de temperatura “MasterCycler EP Gradient S” (Eppendorf, Hamburg, Germany). As temperaturas e duração dos ciclos para cada região foram determinadas após testes de padronização. Para as regiões 5, 6 e 16 as condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 58°C por 1 minuto e a 72° C por 2 minutos, finalizando-se com uma extensão a 72°C por 7 minutos. Para a região 4 as condições de amplificação foram: desnaturação inicial a (94°C) por 5 minutos, seguida de 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 60°C por 1

minuto e a 72° C por 1 minuto e 30 segundos, finalizando-se com uma extensão a 72°C por 7 minutos.

Ao final da reação, 5 µL do produto da PCR foram misturados a 1 µL do tampão de corrida 10X “Blue Juice·Gel Loading Buffer” (Invitrogen™·Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo e visualizados sob iluminação UV. Os fragmentos amplificados foram comparados ao marcador de peso molecular “100bp DNA Ladder” (Invitrogen™·Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) ou, no caso de realização de reação de seqüenciamento, a concentração do DNA da amostra purificada foi estimada a partir da comparação com a intensidade da banda do marcador de peso e massa molecular “Low DNA Mass Ladder” (Invitrogen™·Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). As imagens foram digitalizadas através da câmera “Kodak Digital Science” (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA).

### ***3.6 Reação de Seqüenciamento***

As mutações T34T e E50K, localizados no exon 4, foram analisados por meio de seqüenciamento direto do produto da PCR. Após confirmação da amplificação, o produto da PCR foi purificado utilizando-se os seguintes reagentes: 5,0 µl da PCR amplificada e 2,0 µl da mistura de enzimas exonuclease I e fosfatase alcalina de camarão “ExoSAP-IT” (Amersham Life Sciences, Uppsala, Sweden). A seguir as amostras foram levadas ao aparelho ciclador de temperatura por 15 minutos a 37°C e 15 minutos a 80°C.

Para a reação de seqüenciamento foram utilizados de 3 a 10 ng (1,5 µL) do produto purificado para um volume final de reação de 10 µL, contendo 1 µL de “Big Dye Terminator Ready Reaction v3.0” (ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems Foster City, CA, USA), 3µL do tampão de seqüenciamento 5X (Applied Biosystems Foster City, CA, USA) e 1,6 pmol de um dos “primers” (sense ou antisense) utilizados na PCR, sendo o volume final completado com água deionizada estéril.

As condições da reação de seqüenciamento foram: 25 ciclos a 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos. Após esta reação, as amostras foram novamente purificadas para eliminação dos nucleotídeos não incorporados.

### ***3.7 Purificação da Reação de Seqüenciamento***

Após realização da reação de seqüenciamento os 10µl do produto final foram tratados com adição de 50 µl de Isopropanol 65%, permanecendo em repouso em ambiente escuro por 20 minutos e logo em seguida submetidos à centrifugação por 25 minutos a 25°C a 13000rpm. Após centrifugação, o sobrenadante foi retirado por pipetagem. Procedeu-se em seguida com a adição de 250 µl de etanol 60%, levando-se à centrifugação por 10 minutos a 25°C a 13000rpm. Após centrifugação o sobrenadante foi retirado por pipetagem. Em seguida os tubos foram levados ao banho seco a 90°C por 4 minutos para evaporação do etanol residual, permanecendo no tubo apenas o “pellet” do material tratado aderido à parede do tubo.

As amostras foram ressuspensas em 17  $\mu$ L de Formamida Hi-Di (Applied BioSystems, Foster City, CA, USA), desnaturadas a 95°C por 3 minutos, colocadas em gelo e submetidas à eletroforese no analisador automático “ABI PRISM 310” (Applied BioSystems, Foster City, CA, USA). Para confirmação da região genômica analisada, as seqüências foram submetidas a buscas por similaridade, utilizando-se o “algoritmo de buscas” *Blast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

### **3.8 Digestão Enzimática**

Três das cinco alterações estudadas foram determinadas por meio de digestão enzimática do produto da PCR. As alterações M98K (exon 5 - 603T>A), 691\_692insAG (exon 6 – códon de parada prematuro) e R545Q (exon 16 -1944G>A) foram avaliadas por meio da digestão com as enzimas *StuI*, *BstI*, e *BbvI* (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), respectivamente. Após o tratamento enzimático o produto da digestão foi aplicado em gel de agarose 3,0% corado com brometo de etídeo e visualizado sob iluminação UV, comparando-se os produtos da digestão com o marcador de peso molecular 50bp DNA Ladder (Invitrogen™-Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). As amostras controle, positivas para cada uma destas alterações, foram gentilmente cedidas pela Dra. Tayebah Rezaie, da Universidade de Connecticut, New Haven, CT, USA.

Para a detecção da mutação M98K (603T>A) realizou-se a digestão com a endonuclease de restrição *StuI* (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA), visto que esta substituição cria um novo sítio de restrição para a enzima. Foram utilizadas 10 unidades de *StuI* e 7 $\mu$ l do produto da PCR, no tampão apropriado,

incubando-se a reação a 37°C em banho seco durante 2 horas e procedendo-se com a inativação da enzima a 65°C por 20 minutos. Os indivíduos sem mutação apresentam um fragmento de 218pb, as mutações em homozigose, apresentam dois fragmentos, de 174pb e 44pb e os indivíduos com mutações em heterozigose apresentam três fragmentos, de 218pb, 174pb e 44bp (Tabela 3, Figura 1-A).

Com o objetivo de se detectar a mutação 691\_692insAG realizou-se a digestão com a endonuclease de restrição *BsI* (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA), visto que esta substituição cria um novo sítio de restrição para a enzima. Foram utilizadas 10 unidades de *BsI* e 9µl do produto da PCR, no tampão apropriado, incubando-se a reação a 55°C em banho seco durante 2 horas, seguindo-se com a inativação da enzima a 80°C por 20 minutos. Os indivíduos sem mutação apresentam um fragmento de 201pb, as mutações em homozigose, apresentam dois fragmentos, de 136pb e 65pb e os indivíduos com mutação em heterozigose apresentam três fragmentos, de 201pb, 136pb e 65bp (Tabela 3, Figura 1-B).

Para a detecção da mutação R545Q (1944G>A) realizou-se a digestão com a endonuclease de restrição *BbvI* (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA), visto que esta substituição cria um novo sítio de restrição para a enzima. Foram usadas 2 unidade de *BbvI* e 3µl do produto da PCR, no tampão apropriado, incubando-se a reação a 37°C em banho úmido durante 12 horas, procedendo-se com a inativação da enzima a 65°C por 20 minutos. Os indivíduos sem mutação apresentam um fragmento de 232pb, as mutações em homozigose, apresentam dois fragmentos, de 126pb e 106pb e os indivíduos

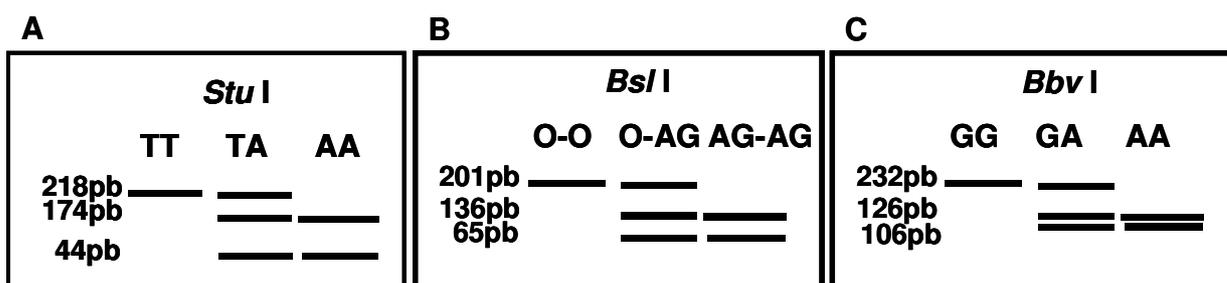
com mutações em heterozigose apresentam três fragmentos, de 232pb, 126pb e 106pb (Tabela 3, Figura 1-C).

Para confirmação das alterações determinadas por meio de digestão enzimática, amostras positivas e negativas para cada alteração foram escolhidas aleatoriamente e submetidas ao seqüenciamento, conforme descrito nos itens 3.6 e 3.7.

TABELA 3: Padrão de restrição da digestão enzimática

Exon	Mutações	Enzima	Tamanho do fragmento encontrado (pb)		
			Fragmento esperado	Polimorfismo Homozigose	Polimorfismo heterozigos
5	M98K	<i>Stu I</i>	218	174 / 44	218 / 174 / 44
6	691_692insAG	<i>Bsl I</i>	201	136 / 65	201 / 136 / 65
16	R545Q	<i>Bbv I</i>	232	126 / 106	232 / 126 / 106

FIGURA 1: Modelo esquemático do padrão de restrição enzimática em gel de agarose; A: enzima *Stu I*; B: enzima *Bsl I*; C: enzima *Bbv I*



### 3.9 - Análise estatística

Realizou-se a análise descritiva dos dados epidemiológicos, clínicos, diagnósticos e moleculares da população.

Os dados foram estatisticamente avaliados por meio do Teste de Qui-quadrado ou Teste Exato de Fisher para análise de variáveis categóricas, com o auxílio do programa “Epi Info™ Version 3.3.2”. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

## 4 . RESULTADOS

### ***4.1. Dados Demográficos e Oftalmológicos***

O grupo de pacientes estudados era composto por 99 portadores de GPAA, sendo 46 (46,46%) do sexo feminino e 53 (53,54%) do sexo masculino. Apresentaram idade média de  $63,67 \pm 12,96$  anos, sendo a idade mínima de 35 e a idade máxima de 87 anos. Em relação à cor da pele, 68 (68,69%) eram brancos, 17 (17,17%) eram pardos e 14 (14,14%) eram negros.

O grupo controle estudado era composto por 100 indivíduos, sendo 62 (62,00%) do sexo feminino e 38 (38,00%) do sexo masculino. Apresentaram idade média de  $69,30 \pm 6,57$  anos, sendo a idade mínima de 52 e a idade máxima de 94 anos. Em relação à cor da pele, 75 (75,00%) eram brancos, 15 (15,00%) eram pardos e 10 (10,00%) eram negros.

Em relação aos dados oftalmológicos, no grupo com GPAA a PIO média foi de  $24 \pm 8,52$  mmHg no olho direito (OD) e de  $25 \pm 8,42$  mmHg no olho esquerdo (OE) sendo que estes valores só eram alcançados com uso de medicação hipotensora, a média da escavação (lesão no disco óptico) foi de  $0,8 \pm 0,17$  (relação escavação / disco óptico) no OD e de  $0,8 \pm 0,18$  (relação escavação / disco óptico) no OE. A média do número de cirurgias neste grupo foi de  $1,31 \pm 1,18$  e a média de medicações utilizadas pelos pacientes diariamente foi de  $2,41 \pm 1,03$  colírios. Todos os pacientes apresentavam alterações campimétricas em maior ou menor gravidade de acordo com cada caso (anexo 2).

No grupo controle, a PIO média foi de  $12 \pm 2,11$  mmHg no OD e de  $12 \pm 1,73$  mmHg no OE e na avaliação do disco óptico, a média da escavação foi de  $0,3 \pm 0,09$  (relação escavação / disco óptico) no OD e de  $0,3 \pm 0,07$  (relação escavação / disco óptico) no OE. Uma vez que estes pacientes foram submetidos à avaliação cuidadosa para que se enquadrassem nos critérios de inclusão pré-determinados, nenhum destes pacientes usava medicamentos oculares ou haviam sido submetidos à cirurgia ocular prévia e nem apresentavam alterações campimétricas (anexo 3).

#### **4.2. Análise Genética**

Ao analisar os resultados encontrados para o exon 4 constatou-se a ausência da mutação E50K (458 G>A) em nosso grupo de estudo. Porém a alteração T34T (412 G>A) foi identificada em 37/99 (37,37%) pacientes portadores de glaucoma e em 23/100 (23,00%) indivíduos do grupo controle ( $p = 0,027$ ).

Ao avaliar as freqüências dos genótipos e alelos da mutação T34T, encontramos como genótipo mais freqüente no grupo de estudo o “GG” em 62/99 (62,63%) seguido por “GA” em 28/99 (28,28%) e “AA” em 9/99 (9,09%) e para o grupo controle encontramos “GG” em 77/100 (77,00%) seguido por “GA” em 17/100 (17,00%) e “AA” em 6/100 (6,00%) ( $p = 0,086$ ).

Os alelos mais comuns para esta mutação no grupo de estudo foram o “G” em 152/198 (76,77%) e “A” em 46/198 (23,23%) e para o grupo controle, observou-se “G” 173/200 (86,50%) e “A” em 27/200 (13,50%) ( $p = 0,012$ ) (Tabela 4).

A representação dos padrões de genotipagem da mutação T34T, por seqüenciamento, encontra-se na Figura 2.

TABELA 4: Mutações do gene *OPTN* avaliadas no estudo

Exon	Seqüência alterada	Mutações	GPAA (%)	Controle (%)	p	Genótipos*			Alelos	
						GPAA n = 99 (%)	Controle n = 100 (%)	p	GPAA n = 198 (%)	Controle n = 200(%)
4	412G>A	T34T	37/99 (37,37)	23/100 (23,00)	0,027	AA: 9 (9,09) GA: 28 (28,28) GG: 62 (62,63)	AA: 6 (6,00) GA: 17 (17,00) GG: 77 (77,00)	0,086	A: 46 (23,23) G: 152 (76,77)	A: 27 (13,50) G: 173 (86,50)
4	458 G>A	E50K	0/99 (0,00)	0/100 (0,00)		0 (0,00)	0 (0,00)		0 (0,00)	0 (0,00)
5	603T>A	M98K	1/99 (1,01)	2/100 (2,00)	0,566	AA: 0 (0,00) TA: 1 (1,01) TT: 98 (98,99)	AA: 0 (0) TA: 2 (2,00) TT: 98 (98,00)	0,566	A: 1 (0,5) T: 197 (99,5)	A: 2 (1,00) T: 198 (99,00)
6	691_692 ins AG	códon de parada prematuro	2/99 (2,02)	2/100 (2,00)	0,991	AG-AG: 0 (0,00) 0-AG: 2 (2,03) 0-0: 97 (97,97)	AG-AG: 0 (0) 0-AG: 2 (2,00) 0-0 98: (98,00)	0,991	AG: 2 (1,02) 0: 196 (98,98)	AG: 2 (1,00) 0: 198 (99,00)
16	1994G>A	R545Q	10/99 (10,10)	23/100 (23,00)	0,014	AA: 0 (0,00) GA: 10 (10,11) GG: 89 (89,89)	AA: 0 (0) GA: 23(23,00) GG: 77 (77,00)	0,011	A: 10 (5,05) G: 188 (94,95)	A: 23 (10,65) G: 177 (89,35)

\*genótipos homozigoto/heterozigoto/esperado

p (colocar o teste estatístico utilizado): análise entre os grupos GPAA e controle

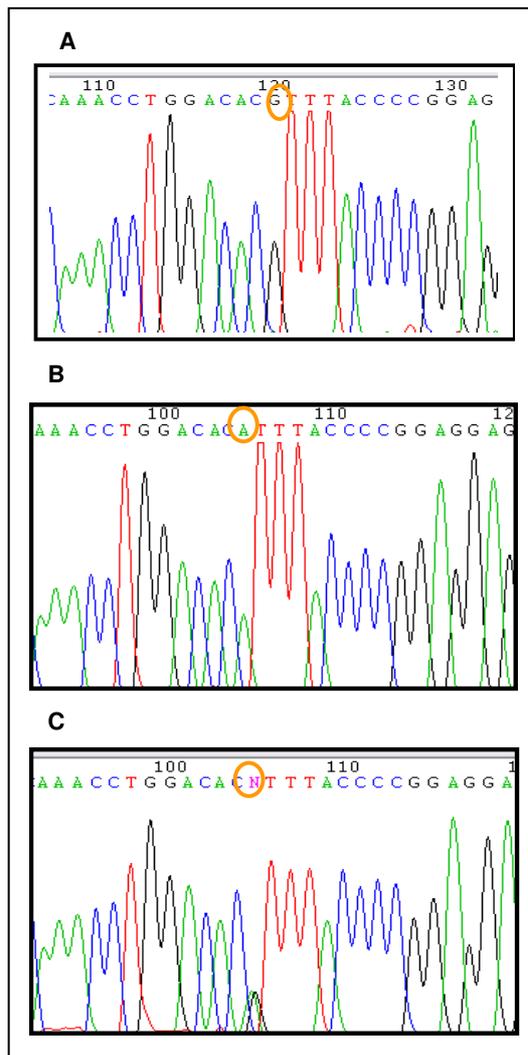


FIGURA 2: Representação dos padrões de genotipagem da mutação T34T, no exon 4 do gene *OPTN*, após seqüenciamento direto automatizado. (A) Controle, (B) Mutação T34T(412G→A) em homozigose, (c) Mutação T34T(412G→A) em heterozigose.

Na análise do exon 5, a mutação M98K (603T>A) foi encontrada em 1/99 (1,01%) pacientes portadores de glaucoma e em 2/100 (2,00%) indivíduos do grupo controle ( $p= 0,566$ ). A avaliação das freqüências dos genótipos e alelos da mutação M98K apresentou como genótipo mais freqüente no grupo

de estudo o “TT” em 98/99 (98,99%) casos, seguido por “TA” em 1/99 (1,01%) casos. No grupo controle encontrou-se “TT” em 98/100 (98,00%) indivíduos, seguido por “TA” em 2/100 (2,00%) indivíduos ( $p= 0,566$ ). O genótipo homozigoto “AA” não foi encontrado em nenhum dos grupos estudados. Os alelos mais comuns para esta mutação no grupo de estudo foram o “T” em 197/198 (99,50%) pacientes e “A” em 1/198 (0,50%) pacientes e para o grupo controle observou-se “T” em 198/200 (99,00%) indivíduos e “A” em 2/200 (1,00%) indivíduos. Os resultados não foram estatisticamente significantes quando comparamos os genótipos e alelos entre os grupos (Tabela 4). As representações dos padrões de genotipagem da mutação M98K, por seqüenciamento e restrição enzimática, encontram-se nas Figuras 3 e 4, respectivamente.

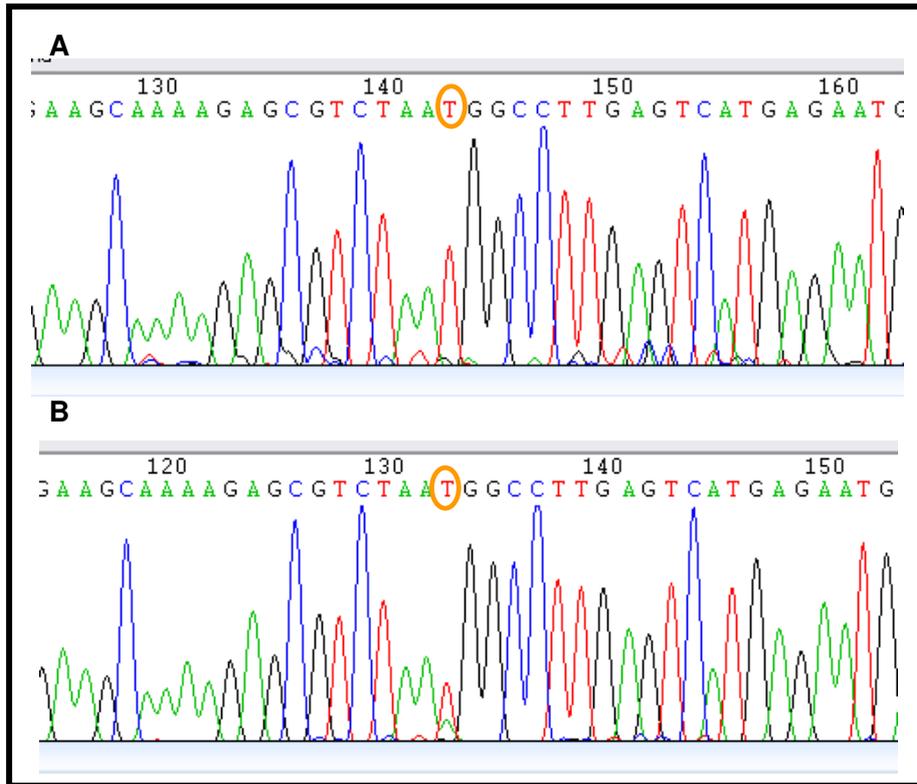


FIGURA 3: Representação dos padrões de genotipagem da mutação M98K, no exon 5 do gene *OPTN*, após seqüenciamento direto automatizado. (A) Controle, (B) Mutação M98K (603T>A) em heterozigose.

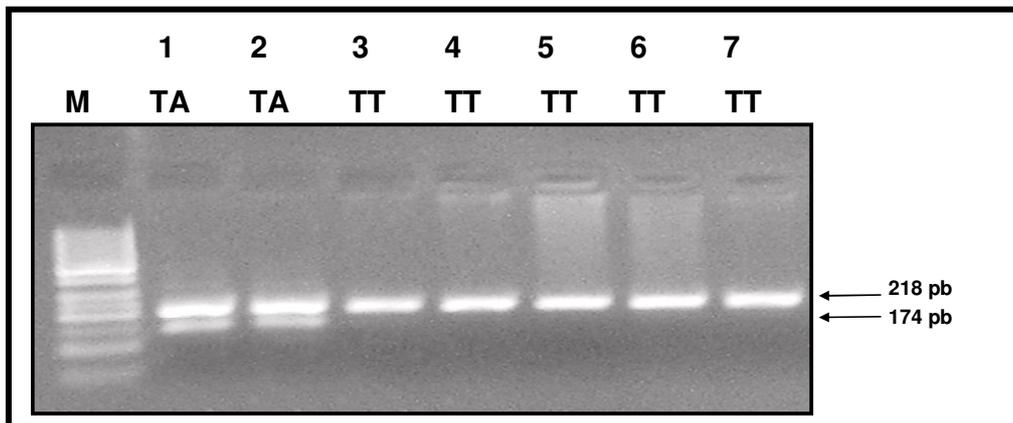


FIGURA 4: Representação da análise da mutação M98K, no exon 5, por meio de digestão com a enzima *StuI* em gel de agarose 3,0%.

M. Marcador de peso molecular ("Ladder 50pb");

1 e 2. Controle (+) para a mutação em heterozigose para o genótipo TA;

3,4, 5, 6 e 7. Pacientes homozigotos para o genótipo TT

Relacionado a mutação “códon de parada prematuro” (691\_692insAG) no exon 6, a frequência encontrada foi de 2/99 (2,02%) pacientes portadores de glaucoma e em 2/100 (2,00%) indivíduos do grupo controle ( $p = 0,991$ ). A avaliação das frequências dos genótipos e alelos da mutação 691\_692insAG, apresentou como genótipo mais freqüente tanto no grupo de estudo quanto no grupo controle a ausência da inserção “AG” entre as posições 691\_692 do exon 6, o qual denominamos “0\_0”. Este genótipo foi encontrado em 97/99 (97,97%) glaucomatosos e 98/100 (98,00%) indivíduos do grupo controle. A inserção “AG” entre as posições 691\_692 do exon 6 foi denominada genótipo “0\_AG” e foi encontrada em 2/99 (2,02%) pacientes portadores de glaucoma e em 2/100 (2,00%) indivíduos do grupo controle. O genótipo homozigoto “AG\_AG” não foi encontrado em nenhum dos grupos estudados. O padrão dos alelos para esta mutação foram, a ausência de inserção (alelo “0”) e a inserção (alelo “AG”). O alelo “0” foi encontrado em 196/198 (98,98%) glaucomatosos e em 198/200 (99,00%) controles. O alelo “AG” foi encontrado em 2/198 (1,02%) e 2/200 (1,00%) indivíduos dos grupos de estudo e controle, respectivamente. O valor estatístico da comparação entre grupos estudo e controle não foram significantes ( $p= 0,991$ ) (Tabela 4). As representações dos padrões de genotipagem da mutação 691\_692insAG, por seqüenciamento e restrição enzimática, encontram-se nas Figuras 5 e 6, respectivamente.

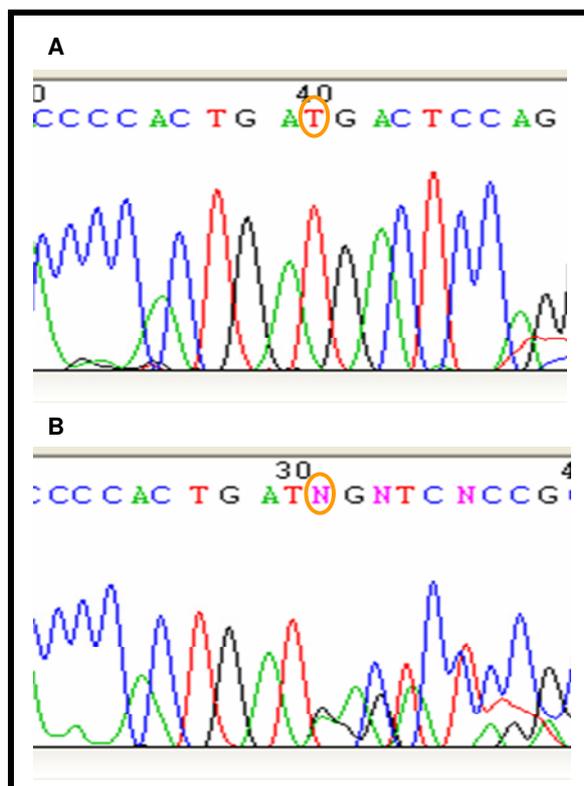


FIGURA 5: Representação dos padrões de genotipagem da mutação “códon de parada prematuro” (691\_692insAG), no exon 6 do gene *OPTN*, após seqüenciamento direto automatizado. (A) Controle (B) corresponde a mutação códon de parada prematuro (691\_692insAG) em heterozigose.

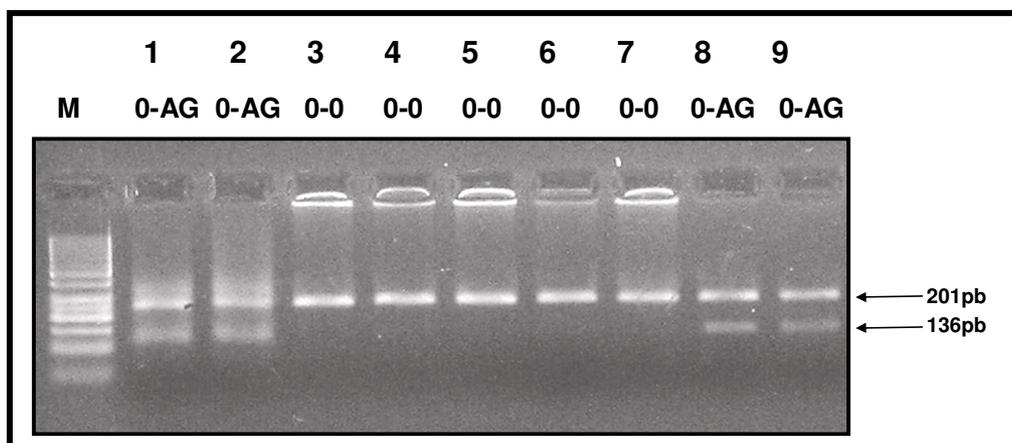


FIGURA 6: Representação da análise da mutação “códon de parada prematuro” (691\_692insAG), no exon 6, por meio de digestão com a enzima *BstI* em gel de agarose 3,0%.

M. Marcador de peso molecular (“Ladder 50pb”);

1, 2 Controles (+) para a mutação em heterozigose para o genótipo 0-AG;

8 e 9 Pacientes com mutação em heterozigose para o genótipo 0-AG;

3, 4, 5, 6 e 7 Pacientes homozigotos para o genótipo 0-0.

Na avaliação do exon 16, a mutação R545Q (1994G>A) foi encontrada em 10/99 (10,10%) pacientes portadores de glaucoma e em 23/100 (23,00%) indivíduos do grupo controle ( $p= 0,014$ ). Na avaliação das frequências dos genótipos e alelos da mutação R545Q, encontramos como genótipo mais freqüente no grupo de estudo o “GG” em 89/99 (89,89%) pacientes, seguido por “GA” em 10/99 (10,11%) pacientes. No grupo controle encontramos “GG” em 77/100 (77,00%) pacientes, seguido por “GA” em 23/100 (23,00%) pacientes ( $p= 0,011$ ) o genótipo homocigoto “AA” não foi encontrado em nenhum dos grupos estudados. Os alelos mais comuns para esta mutação no grupo de estudo foram o “G” em 188/198 (94,95%) pacientes e o “A” em 10/198 (5,05%) pacientes e para o grupo controle observou-se o alelo “G” em 177/200 (88,50%) indivíduos e o alelo “A” em 23/200 (11,50%) indivíduos. Os resultados foram estatisticamente significantes quando comparamos os genótipos ( $p= 0,011$ ) e alelos ( $p= 0,019$ ) entre os grupos (Tabela 4). As representações dos padrões de genotipagem referentes a mutação R545Q, por seqüenciamento e restrição enzimática e, encontram-se nas Figuras 7 e 8, respectivamente.

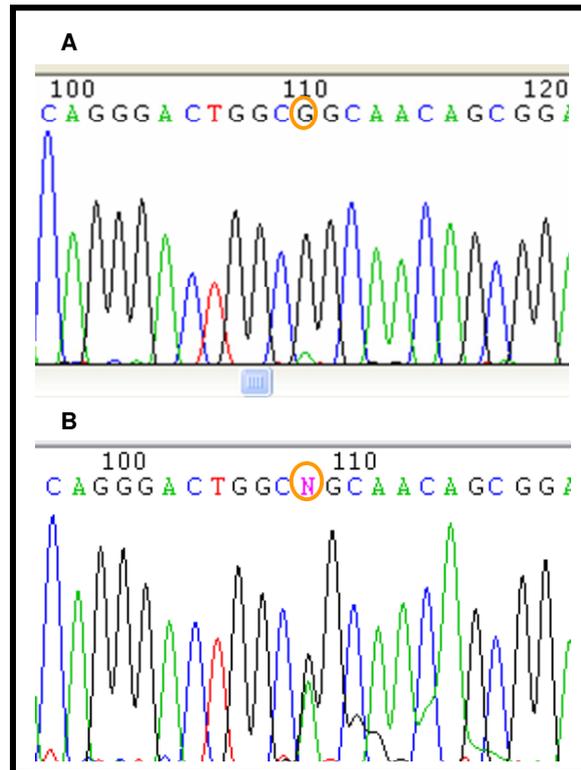


FIGURA 7: Representação dos padrões de genotipagem da mutação R545Q (1994G>A), no exon 16 do gene *OPTN*, após seqüenciamento direto automatizado. (A) Controle (B) Mutação R545Q (1994G>A) em heterozigose.

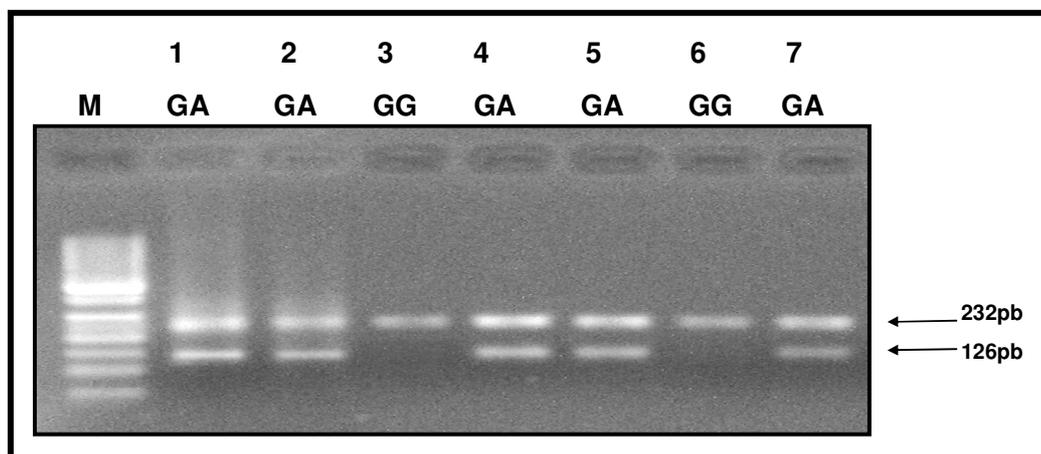


FIGURA 8:: Representação da análise da mutação R545Q, no exon 16, por meio de digestão com a enzima *BbvI* em gel de agarose 3,0%.

M. Marcador de peso molecular (“Ladder” 50pb);

1, 2, 4, 5 e 7. Pacientes com mutação em heterozigose para o genótipo GA;

3 e 6. Pacientes homozigotos para o genótipo GG.

## **5. DISCUSSÃO**

Ainda é cedo para afirmar que a presença de mutações no gene *OPTN* irá seguir a mesma distribuição mundial do gene *TIGR/MYOC* (3 a 5% em diversas populações avaliadas). Primeiro porque algumas mutações do gene *OPTN* parecem estar associado mais freqüentemente ao GPN, forma menos comum de glaucoma entre as populações caucasóides e negras, sendo mais predominante na população Japonesa; segundo, pela falta de mais estudos envolvendo diferentes populações; e, finalmente, porque este pode ser um gene de influência restrita a certos grupos populacionais. Em nossa população este gene apresentou características singulares, ora como fator protetor para a doença ora como fator causador da doença, fato descrito por apenas alguns estudos analisados.

### **5.1 Polimorfismo E50K (458 G>A)**

Neste estudo avaliou-se uma população de etnia variada, composta por 99 indivíduos portadores de GPAA (PIO > 21 mmHg) e por 100 voluntários, sem glaucoma, formando o grupo controle. Não encontramos a mutação E50K (458 G>A) nesse grupo estudado, resultado contrário ao descrito por Rezaie et al (2002). Esses autores avaliaram um total de 54 famílias com padrão de herança autossômica dominante para GPAA, e descreveram a presença da mutação E50K (458 G>A), no exon 4, em sete de 52 famílias estudadas (13,5%) para esta mutação. Não foi encontrada essa mutação nos 540 indivíduos que formaram o grupo controle o que conferiu a este resultado uma

forte significância estatística ( $p=2,74 \times 10^{-8}$ ). Nas sete famílias glaucomatosas com a mutação, 38 indivíduos apresentavam a mutação associada ao glaucoma, enquanto 16 indivíduos eram portadores assintomáticos do gene. Dos 38 indivíduos com glaucoma, sete (18,42%) tinham PIO elevada, entre 23 e 26 mmHg, e os outros 31 (81,58%) indivíduos apresentavam PIOs dentro dos valores considerados estatisticamente normais (PIO < 21 mmHg). Este dado mostrou uma maior incidência desta mutação entre os portadores de GPN.

O nosso trabalho analisou apenas indivíduos portadores de GPAA e não portadores de GPN e a história familiar para glaucoma não foi um critério necessário para a inclusão no estudo. Estes fatos podem ter contribuído para a não identificação desta mutação em nossa população. Entretanto, existem outros estudos, realizados com uma população com GPN, supostamente propícia ao encontro da mutação E50K (458 G>A), que apresentaram resultados semelhantes aos nossos. Entre estes estão os estudos de Fause et al (2004) e Toda et al (2004), que avaliaram indivíduos portadores de glaucoma na população japonesa. Fause et al (2004) avaliaram um grupo composto por 89 pacientes com GPAA, 65 pacientes com GPN e 100 indivíduos controle, sem glaucoma. Toda et al (2004) avaliaram um grupo composto por 165 pacientes com GPAA, 148 pacientes com GPN e 196 indivíduos controle, sem glaucoma. Nesses estudos não foi identificada a mutação E50K o que levou os autores a sugerirem que características populacionais específicas podem estar relacionadas à presença da mutação.

Outras populações foram estudadas quanto à incidência da mutação E50K. Baird et al (2004) publicaram resultados parciais de um estudo prospectivo realizado com a população australiana na região de Blue Mountain

em New South Wales. Analisaram 18 pacientes portadores de GPAA e 9 portadores de GPN de um grupo de 108 portadores de glaucoma do estudo inicial do Blue Mountains Eye Study, comparando a um grupo controle formado por 94 indivíduos e também não encontraram a mutação E50K (458 G>A) nos pacientes estudados. Weischuh et al (2005) em outro estudo com a população alemã avaliaram um grupo de 112 pacientes portadores de GPN e 100 indivíduos controles, sem a doença e assim como outros autores já citados não encontraram a mutação E50K (458 G>A). Diante desse resultado, os autores supõem ser rara a presença da mutação E50K (458 G>A) nessas populações estudadas.

Alguns estudos identificaram a mutação E50K (458 G>A) em diferentes populações, porém em frequência menor do que a descrita por Rezaie et al, em 2002.

Alward et al (2003) estudaram 1048 pacientes com glaucoma (GPN e GPAA) de diferentes etnias e 251 indivíduos controles. A mutação E50K (458 G>A) foi encontrada em apenas um indivíduo no grupo de GPAA (0,1%). Este paciente pertencia ao grupo de 29 indivíduos com GPN e história familiar para glaucoma (3,5%). A partir desses resultados os autores sugerem que, apesar de pouco frequente nessa população, a mutação E50K (458 G>A) tem correlação com a hereditariedade. Em nossa opinião esta afirmação deve ser melhor avaliada uma vez que existe a possibilidade deste paciente apresentar esta mutação ao acaso, ou mesmo não estar associada ao desenvolvimento do GPN. Uma forma de reforçar a sugestão dos autores em relação à mutação E50K seria avaliar o seu padrão de segregação com a doença nos outros familiares.

Avaliando a população britânica, Aung et al (2003) estudaram 315 indivíduos portadores de glaucoma (132 com GPN e 183 com GPAA), além de 95 indivíduos controles, sem glaucoma. Encontraram a mutação E50K (458 G>A) em dois dos 315 portadores de glaucoma (0,6%), e nenhuma alteração foi descrita no grupo controle. Os dois indivíduos com alteração apresentavam GPN (1,5%). Os autores descrevem a mutação E50K (458 G>A) como uma causa esporádica de GPN nessa população. Esses resultados se contrapõem à alta frequência da mutação E50K (458 G>A) encontrada por Rezaie et al (2002), descrita em sete das 52 famílias estudadas (13,5%). Essa alta prevalência pode estar relacionada à escolha da população estudada, onde todas as famílias apresentavam herança autossômica dominante para GPAA.

Em outro estudo, Hauser et al (2006), avaliando um grupo da população norte americana, de etnia variada, encontraram apenas 1 portador da mutação E50K (458 G>A) entre os 67 pacientes avaliados com GPN (1,49%). Os 86 indivíduos do grupo com GPAA e os 100 indivíduos do grupo controle não apresentaram a mutação. Os autores sugerem uma correlação entre a mutação E50K (458 G>A) e uma forma mais severa do GPN, usando como argumentos características como a precocidade e severidade do dano glaucomatoso apresentado pelo paciente com a mutação.

A partir dos nossos resultados, comparados aos achados desses estudos anteriormente citados, supomos que a frequência variada da mutação E50K (458 G>A) pode estar associada às características genéticas de cada população. É importante que novos estudos sejam desenvolvidos, com o intuito de traçar melhor o perfil genético dessa mutação em cada grupo étnico. A reprodução desses achados em um maior número de pacientes poderá dar

respaldo às correlações com a mutação E50K (458 G>A) sugeridas por esses autores.

## **5.2 Mutação T34T (412 G> A)**

Nosso estudo identificou a mutação T34T (412 G> A) em 37 dos 99 pacientes portadores de GPPA estudados, numa freqüência de 37,37%, e em 23 dos 100 indivíduos que formavam o grupo controle, numa freqüência de 23,00% diferença estatisticamente significativa ( $p= 0,027$ ). Na análise dos genótipos nos grupos de pacientes com GPAA e controle, o genótipo mais freqüente foi o GG, (62,63% / 77,00%), seguido pelo genótipo GA, (28,28% / 17,00%), e pelo genótipo AA, (9,09% / 6,00%). Contudo na análise das freqüências dos genótipos não houve diferença entre os grupos ( $p= 0,086$ ). Entretanto na análise da freqüência dos alelos houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p= 0,012$ ).

No primeiro estudo de identificação do gene OPTN, publicado por Rezaie et al (2002), esta mutação não foi descrita. Entretanto vários estudos posteriores investigaram a presença da mutação T34T (412 G> A) em pacientes com glaucoma, encontrada em freqüência semelhante aos nossos resultados.

Funayama et al, (2004) avaliaram um grupo composto por 194 pacientes portadores de GPAA e 218 indivíduos controles, sem glaucoma, na população japonesa. Apresentaram como resultado uma prevalência da mutação T34T (412 G> A) em 69 dos 194 portadores de GPAA (35,6%) e em 52 dos 218 indivíduos controles (23,9%). A comparação dos grupos portadores de

glaucoma com o grupo controle foi estatisticamente significativa no grupo com GPAA ( $p= 0,009$ ). Na análise da frequência dos alelos no grupo controle o alelo G foi encontrado em 382/436 alelos (87,6%) e o alelo A em 54/436 alelos (12,4%) e nos portadores de GPAA, o alelo G foi encontrado em 311/388 alelos (80,2%) e o alelo A foi encontrado em 77/388 alelos (19,8%) apresentando  $p= 0,003$  na comparação com o grupo controle.

Forsman et al (2003) analisaram famílias com diagnóstico de glaucoma na Finlândia, e encontraram o polimorfismo T34T (412 G> A) em seis de 11 pacientes com glaucoma (54,5%).

Uma alta frequência da mutação T34T (412 G> A) também foi apresentada por Willoughby et al (2004), analisando pacientes portadores de GPAA na Inglaterra. Os autores obtiveram como resultado a incidência do T34T(412 G>A) em 23 dos 49 portadores de GPAA avaliados (46,9%) e em 42 dos 107 indivíduos controles (39,25%).

Um estudo envolvendo a população chinesa também evidenciou a presença da mutação T34T(412 G>A), numa frequência menor do que a identificada no trabalho anterior. A mutação foi identificada em 19 dos 119 portadores de GPAA (16,0%) e em 12 dos 126 indivíduos do grupo controle (9,5%), porém a diferença não foi estatisticamente significativa entre os grupos (Leung et al,2003). Outro estudo, também envolvendo a população chinesa, identificou essa mutação em 76 dos 294 portadores de GPAA analisados, numa frequência de 25,85% e em 59 dos 281 indivíduos controles (20,99%). Nesses vários estudos a frequência da mutação T34T(412 G>A) é significativamente maior no grupo de pacientes com glaucoma, quando

comparados ao grupo controle. Entretanto, existem outros trabalhos onde esta diferença não ocorre.

A mutação T34T(412 G>A) foi pesquisada nos trabalhos de Tang et al (2003) e Fause et al (2004), com a população japonesa, e posteriormente Rezaie, Sarfarazi et al (2005) avaliando um grupo de indivíduo da Suécia, sem diferença estatística quanto à presença da mutação nos grupos com glaucoma em relação aos grupos controles estudados. Da mesma forma Mukhopadhyay et al (2005), avaliando pacientes de várias partes da Índia, e Hauser et al (2006), estudando indivíduos nos Estados Unidos da América do Norte, também identificaram a mutação numa frequência semelhante entre os grupos.

Nossos resultados são concordantes com os achados de Forsman et al, 2003, Funayama et al, 2004, Fan et al, 2005 e Weischuh et al, 2005 e discordantes dos estudos de Tang et al, 2003, Fause et al, 2004, Rezaie, Sarfarazi et al, 2005, Mukhopadhyay et al, 2005 e Hauser et al, 2006.

Apesar de não apresentar uma diferença estatisticamente entre a frequência do T34T no grupo de doentes e controle, os resultados de Mukhopadhyay et al (2005) sugerem um papel protetor deste gene em relação à doença. Seu resultados apresentam uma frequência do gene em 47% do grupo controle contra 33% do grupo de estudo. Este resultado é totalmente discordante dos nossos achados, uma vez que a mutação T34T em nossa população demonstrou-se causador da doença sendo encontrado em 37,37% dos pacientes com GPAA e em 23,00% dos controles ( $p=0,027$ ).

A diversidade étnica entre as populações estudadas pode ser o fator que explique a grande variação de resultados. A melhor definição do perfil genético de cada população poderia auxiliar na busca, caso haja, de um denominador

comum entre os grupos das diferentes etnias. O glaucoma é uma doença multifatorial, sendo vários os polimorfismos e mutações que podem estar envolvidos na gênese desta doença, seja como fator protetor ou deletério ao seu portador.

### **5.3 Mutação M98K (603 T>A)**

Encontramos a mutação M98K (603 T>A) em apenas um dos 99 indivíduos do grupo portador de GPAA (1,01%), e em dois dos 100 indivíduos do grupo controle (2,00%), diferença não significativa entre os grupos ( $p=0,566$ ).

Nossos resultados são contrários aos apresentados por Rezaie et al (2002), que encontraram a mutação em oito (17,8%) das 45 famílias portadoras de GPAA analisadas para esta mutação. A frequência da mutação foi de 13,6% no grupo de pacientes glaucomatosos (23 pacientes com a mutação em 169 pacientes), onde 20 dos 23 portadores da mutação apresentavam GPN (87%). No grupo controle esta alteração foi encontrada em nove dos 422 indivíduos controle (2,1%). A diferença da frequência da mutação entre os dois grupos apresentou-se significativa, com o valor de  $p=2,18 \times 10^{-7}$ .

A discordância dos nossos achados em relação ao estudo de Rezaie et al (2002) pode estar relacionada ao grupo avaliado, já que nosso estudo avaliou pacientes portadores de GPAA, e Rezaie et al avaliaram pacientes com GPN. Outro fator citado pelo próprio autor que deve ser analisado é a idade média do grupo controle, que em seu estudo foi de 54,3 anos não apresentando o desvio padrão. É sabido que o glaucoma tem uma maior

incidência em idades mais avançadas, ou seja, existe a possibilidade de algum dos indivíduos do grupo controle (422 indivíduos) vir a desenvolver esta doença ao longo dos anos, o que mudaria o resultado do estudo. Buscamos em nosso estudo um grupo controle com idade avançada, apresentando média de 69,08 anos  $\pm$  6,57, tentando minimizar este possível erro.

Contrapondo a hipótese, apresentada por Rezaie et al em 2002 ,de que a mutação M98K teria um papel causador da doença em indivíduos com GPN existem estudos que avaliaram pacientes portadores de GPN, encontramos uma frequência da mutação M98K (603 T>A) variando entre 6,3%, na população alemã (Weisschuh et al, 2005) e 36,7%, na população chinesa (Fan et al, 2005), outros estudos nas populações japonesa (Tang et al, 2003; Toda et al, 2004; Funayama et al, 2004) e australiana (Baird et al, 2004), também descrevem a presença da mutação M98K (603 T>A), porém todos sem diferença estatisticamente significativa entre o grupo com GPN e o grupo controle.

Os estudos que analisaram a mutação M98K (603 T>A) em portadores de GPAA, como o nosso, encontraram a mutação numa frequência que variou entre 4,5% (Rezaie, Sarfarazi, 2005), na população da Suécia e 30,6% (Fan et al, 2005), na população chinesa. Entretanto, nesses dois estudos, também não houve significância estatística na comparação com o grupo controle. Leung et al (2003), também avaliando a população chinesa, encontraram uma frequência de 24,6% da mutação nos portadores de GPAA e de 28,6% no grupo controle. Wiggs et al (2003), avaliando um grupo de indivíduos da Inglaterra e do sudeste dos Estados Unidos da América, identificaram a mutação numa frequência de 9% nos portadores de GPAA e de 10% no grupo

controle. Nesses últimos dois estudos também não houve diferença significativa entre os grupos.

Melki et al (2003) estudaram 237 franceses e 56 marroquinos portadores de GPAA e um grupo controle formado por 110 e 60 indivíduos, respectivamente. Encontraram a mutação M98K (603 T>A), na população francesa, na frequência de 11 entre 237 pacientes portadores de GPAA (4,64%) e de cinco entre 110 indivíduos controles (4,54%). Na população marroquina a frequência foi de seis entre 56 portadores de GPAA (10,7%) e de cinco entre 60 indivíduos controles (8,33%). Este dado levou o autor a sugerir que a mutação M98K (603 T>A) seja mais freqüente na população marroquina quando comparada à população francesa, entretanto sem diferença quando analisada a frequência entre doentes e controles para cada população.

Willoughby et al, em 2004, avaliando GPAA e indivíduos controles, sem glaucoma, em uma população miscigenada, composta por indivíduos predominantemente descendentes de europeus e canadenses (57,5%), porém também formada por chineses (4,5%), descendentes africanos oriundos do Caribe (12%), filipinos, indianos do leste da Índia e indivíduos oriundos da Malásia (26%). Seu trabalho relata a presença da mutação M98K (603 T>A) principalmente nos indivíduos de etnia européia, descendentes africanos oriundos do Caribe e oriundos da Malásia, na frequência de oito entre 49 portadores de GPAA (16,3%) e quatro entre 101 indivíduos controles (3,9%), apresentando  $p= 0,02$  na comparação do grupo controle com o grupo portador de GPAA. Diante destes resultados, o autor observa que a mutação M98K (603 T>A) também está presente nos portadores de GPAA, como já apresentado

por outros autores. A diversidade étnica entre as populações pode estar relacionada à frequência variada nas mutações do gene OPTN.

Mukhopadhyay et al, 2005 em trabalho realizado na Índia com 200 portadores de GPAA e 200 controles encontraram a mutação em 22/200 (11,0%) e 11/200 (5,5%), respectivamente não sendo estatisticamente significativa a diferença porém sugerindo um efeito causador da doença nesta população.

Alward et al, 2003 analisaram 1048 pacientes de etnia variada portadores de GPAA, GPN, glaucoma exfoliativo, glaucoma pigmentar e 251 controles. No resultado geral, a mutação M98K (603 T>A) não foi estatisticamente significativa na análise dos grupo doentes e não doentes onde a incidência foi de 109/1048 (10,4%) e 18/251 (7,2%), respectivamente. Porém, ao avaliar o sub- grupo dos japoneses portadores de GPN a incidência nos doentes foi de 51 / 247 (20,7%) comparada a 8 / 89 (9,0%) nos controle com um valor de  $p=0,01$ . Este fato reforça a hipótese de que fatores étnicos influenciam na presença das mutações.

#### ***5.4 Mutação códon de parada prematuro (691\_692insAG)***

Em relação à mutação “códon de parada prematuro” (691\_692insAG) no exon 6, no presente estudo encontramos na população estudada uma frequência baixa nos dois grupos analisados, 2/99 (2,02%) nos pacientes portadores de glaucoma e em 2/100 (2,00%) dos indivíduos do grupo controle, dados estes que não foram significantes estatisticamente ( $p= 0,929$ ).

A baixa frequência da mutação códon de parada prematuro (691\_692insAG) no exon 6 foi também descrita por Rezaie et al em 2002 que encontraram esta mutação em apenas 1 / 46 (2,2%) indivíduos portadores de glaucoma e em nenhum indivíduo no grupo controle obtendo em sua análise estatística um valor de  $p=0,187$ .

Desde então alguns autores avaliaram diferentes populações e constataram que a presença desta mutação é pouco frequente. Toda et al, (2004) e Fuse et al, 2004 avaliaram a população japonesa com um grupo de portadores de GPAA e controle sem a doença e não encontraram a mutação “códon de parada prematuro” (691\_692insAG) em nenhum de seus grupos de estudos.

Baird et al, (2004) na análise do estudo “Blue Mountains Eye Study” com a população caucasiana da Austrália também não encontraram esta mutação, assim como os autores Weisschuh et al (2005) realizaram estudo avaliando 112 pacientes com glaucoma provenientes de dois hospitais na Alemanha e 100 voluntários normais e não encontraram a mutação.

Baseado nestes estudos, concluímos que a mutação “códon de parada prematuro” (691\_692insAG) apesar de ter sido citada por Rezaie et al, (2002) como alteração causadora da doença, não apresenta uma frequência significativa entre estas populações e nem pôde ser correlacionada à doença.

### **5.5 Mutação R545Q (1994G>A)**

Nosso estudo detectou a mutação R545Q (1994G>A) do exon 16 numa frequência de 10/99 (10,10%) no GPAA e 23/100 (23,00%) nos controles,

caracterizando uma diferença na análise entre os grupos ( $p= 0,014$ ). A determinação desta alteração também foi descrita por outros autores em diferentes populações.

No estudo de Rezaie et al em 2002 a mutação R545Q (1994G>A) foi descrita numa frequência de 1/46 (2,2%) nos pacientes portadores de glaucoma e em nenhum indivíduo do grupo controle, na análise estatística o valor de  $p= 0,315$  foi determinado.

Posteriormente à publicação de Rezaie et al, 2002 vários autores desenvolveram estudos avaliando a presença da mutação R545Q (1994G>A). Autores como Fuse et al em 2004 estudando a população japonesa em um grupo de 89 GPAA e 100 controles, Baird et al, também em 2004 na análise do estudo “Blue Mountains Eye Study” com a população caucasiana da Austrália, assim como Weisschuh et al em 2005 que avaliaram 112 pacientes alemães com glaucoma e 100 voluntários normais, não encontraram a mutação R545Q (1994G>A) em nenhum dos indivíduos analisados em seus estudos.

Tang et al em 2003, Toda et al em 2004 e Funayama et al, 2004 realizaram três estudos com portadores de GPAA e controles normais na população japonesa e encontraram a mutação R545Q (1994G>A) em todos os grupos analisados, numa frequência de aproximadamente 5,5% no GPAA e de aproximadamente 5,0% no grupo controle o que não caracterizou diferença estatisticamente significativa. No que diz respeito aos seus resultados Funayama et al, (2004) sugerem que esta mutação R545Q (1994G>A) seja mais freqüente na população japonesa quando comparada à população caucasóide.

Leung et al em 2003 estudaram 119 portadores de GPAA e 126 controles na população chinesa, assim como, Fan et al que em 2005 avaliaram a mesma população com um grupo de 294 GPAA e 281 controles e encontraram a mutação R545Q (1994G>A) em uma frequência semelhante entre os grupos. Leung et al (2003) apresentam a alteração em 6,7% dos GPAA e 8,7% dos os controles e Fan et al (2005) relatam uma frequência de 6,8% para o GPAA e 6,7% para os controles.

Alward et al, 2003 analisaram 1048 pacientes de etnia variada portadores de glaucoma e 251 controles. No resultado geral a mutação R545Q (1994G>A) não foi estatisticamente significativa na análise dos grupos doentes e não doentes, onde a incidência foi de 12/1048 (1,2%) e 3/251 (1,2%) respectivamente com valor de  $p=1,00$ .

Willoughby et al, 2004 avaliaram uma população miscigenada composta por indivíduos predominantemente europeus e canadenses (57,5%), porém também composta por chineses (4,5%), descendentes africanos oriundos do Caribe (12,0%), filipinos e indianos do leste e indivíduos oriundos da Malásia (26,0%) e também portadores de glaucoma e controles normais (101). Determinaram a mutação R545Q (1994G>A) neste grupo de estudo na frequência de 0/48 (0%) no GPAA e 3/184 (1,63%) nos controles. Contudo é importante relatar que os indivíduos que apresentaram a mutação R545Q (1994G>A) eram de etnia chinesa. A variabilidade na frequência de aparecimento das mutações pode ter forte correlação com a diversidade de características étnicas de populações específicas.

Em 2005, Mukhopadhyay et al, realizaram um estudo na Índia com 200 portadores de GPAA e 200 controles, encontrando a mutação R545Q

(1994G>A) em 6/200 (3,0%) GPAA e 0/200 (0%) controles sendo a diferença estatisticamente significativa ( $p<0,05$ ). Este dado conferiu a esta mutação um característica de causador da doença para esta população.

Contudo nossos resultados apresenta características completamente divergente às apresentadas por Mukhopadhyay et al, 2005 uma vez que para nossa população a mutação R545Q apresentou-se como fator protetor para a doença já a freqüência foi de 23,00% nos controle contra 10,105 nos GPAA ( $p=0,014$ ).

É interessante ressaltar que a análise de três mutações T34T, M98K e R545Q na população Indiana (Mukhopadhyay et al, 2005) encontramos características divergentes de nossa população. A primeira quanto a freqüência da mutação T34T que foi de 47% do grupo controle contra 33% do grupo de estudo sugerindo um papel protetor deste gene em relação à doença. A segunda quanto à mutação M98K onde a freqüência foi de 22/200 (11,0%) no GPAA e 11/200 (5,5%) nos controles, mesmo que a diferença não seja estatisticamente significativa sugeri um efeito causador da doença nesta população. E no terceira mutação a R545Q a freqüência foi de 6/200 (3,0%) GPAA e 0/200 (0%) controles ( $p<0,05$ ) o que conferiu a esta mutação um característica de causador da doença. Nestas três situações os nossos resultados mostraram-se contraditório deixando evidente a necessidade da realização de novos estudos em busca de dados mais sólidos diante desta adversidade étnica.

## **6. CONCLUSÕES**

1- A mutação T34T (412 G>A) no exon 4 do gene OPTN foi encontrado em 37,37% pacientes portadores de GPAA e em 23,00% indivíduos do grupo controle ( $p = 0,027$ ) o que confere a esta mutação um efeito causador da doença nesta população.

2- A mutação E50K (458 G>A) no exon 4 do gene OPTN esteve ausente em nosso grupo de estudo.

3- A mutação M98K (603 T>A) no exon 4, e a mutação códon de parada prematuro (691\_692insAG) no exon 6 do gene OPTN, foram encontradas em baixa frequência o M98K em 1,01% nos GPAA e 2,00% nos controles e o 691\_692insAG em 2,02% nos GPAA e 2,00% nos controles. Não houve diferença estatisticamente significativa na comparação entre o grupo de GPAA e o grupo controle para as duas mutações. Neste estudo concluímos que estas mutações não são freqüentes em nossa população.

4- Detectamos a mutação R545Q (1994G>A) do exon 16 numa frequência de 10,10% nos GPAA e 21,29% nos controles, caracterizando uma diferença estatisticamente significativa na análise entre os dois grupos ( $p= 0,027$ ). Para nossa população a mutação R545Q apresentou-se como fator protetor para a doença.

## **7. ANEXOS**

### **ANEXO 1: Extração do DNA genômico por fenol clorofórmio**

#### **Protocolo Primeira Etapa:**

- 1- Coleta de sangue em tubo contendo EDTA ou ACD;
- 2- Centrifugação por 10 minutos a 2500rpm;
- 3- Descarte do plasma com pipeta Pasteur descartável, em descarte com solução de hipoclorito, num Becker.;
- 4- Remoção dos glóbulos brancos (leucócitos) com pipeta Pasteur;
- 5- Transferência dos leucócitos para um tubo de polipropileno do tipo “Falcon”de 15ml;
- 6- Adição de tampão RSB 1X até completar o volume final de 11ml no tubo;
- 7- Adição de 60µl de NONIDET - P40 (TRITON ou IGEFAL) e homogeneização por 10 minutos;
- 8- Centrifugação a 2500rpm por 10 min e descarte do sobrenadante no descarte;
- 9- Ressuspensão do “pellet” em 0,5ml de tampão RSB 1X seguida de homogeneização;
- 10- Lise das hemácias com 3,0ml de sabão SDS;
- 11- Adição de 40 µL de proteinase K;
- 12- Levar à estufa por 2 - 3 horas à 37°C ou overnight;

#### **Protocolo Segunda Etapa:**

- 1- Adicionar 3,0 mL de fenol no tubo falcon.;

- 2- Homogeneização por 10 minutos, seguida de centrifugação a 2500 rpm por 10 min;
- 3- Remoção da porção superior do tubo (transparente), com pipeta Pasteur para outro tubo “Falcon”;
- 4- Adição de clorofórmio-álcool iso-amílico com fenol saturado (1:1) (1,5ml de clorofórmio e 1,5ml de fenol.saturado);
- 5- Homogeneização por 10 minutos e centrifugação por mais 10 minutos a 2500 rpm;
- 6- Remoção da porção inferior do tubo (fenol), com pipeta Pasteur, seguida de adição de 3.0ml de clorofórmio-álcool iso-amílico;
- 7- Homogeneização por 10 minutos e centrifugação por mais 10 minutos a 2500 rpm seguida de remoção completa da porção inferior do tubo;
- 8- Adição de 6.0ml de etanol absoluto gelado, para que haja a precipitação do DNA;
- 9- Manutenção do DNA precipitado a 4°C por 16 horas, seguida da remoção do DNA com uma pipeta e ressuspensão em 200 a 250µl de tampão TE;

### **Soluções empregadas**

Para a realização das técnicas previamente descritas, foram utilizadas algumas soluções cujos protocolos encontram-se a seguir:

#### Para extração de DNA:

##### **RSB 10X (500,0 mL):**

Tris HCl pH 7,6; 0,1M	50,0 mL
KCl 0,1M	25,0 mL
MgCl 0,1M	50,0 mL

H<sub>2</sub>O qsp                      500,0 mL

**RSB 1X (500,0 mL):**

RSB 10X                      50,0 mL

H<sub>2</sub>O qsp                      500,0 mL

**SDS (solução para sangue) (500,0 mL):**

RSB 1X                      500,0 mL de RSB 10X

NaCl 0,4 M                      40,0 mL de NaCl 5 M

SDS 0,5 %                      12,5 mL de SDS 20 %

EDTA 20 mM                      2,0 mL de EDTA 0,5 M

H<sub>2</sub>O qsp                      500,0 mL

**TE 10X (200,0 mL):**

Tris HCl pH 8,0                      1,0mL

EDTA 0,2M                      1,0 mL

H<sub>2</sub>O qsp                      200,0 mL

Autoclavar

**Clorofórmio Álcool Isoamílico (25,0 mL):**

Clorofórmio                      24,0 mL

Álcool isoamílico                      1,0 mL

Não autoclavar (guardar em geladeira)

**EDTA pH 8 0,2M (100,0 mL):**

PM = 372,24

EDTA                      7,44 g

H<sub>2</sub>O qsp                      100,0 mL

Autoclavar

**Tris/HCl 2M pH 7,5 < 8,0 (500,0 mL):**

PM Tris = 121,1g V= volume em litros

$M = m \cdot V \cdot PM$  PM = peso molecular

$M = 2 \cdot 0,5 \cdot 121,1$  M = quantidade final

M = 121,1g

Tris 121,1 g

H<sub>2</sub>O qsp 500,0 mL

HCl 35,0 a 40,0 mL

Autoclavar

**Tris/Hcl 0.5 M (500,0mL):**

$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$

$2 \cdot V_1 = 0,5 \cdot 500$

$V_1 = 125$  ml de Tris/HCl 2M

**EDTA 0,5M (500,0 mL):**

$M = m \cdot V(e) \cdot PM$

$M = 0,5 \cdot 0,5 \cdot 372,24g/mL$

M = 93,6g de EDTA

EDTA=93,06 g

H<sub>2</sub>O qsp=500,0 mL

Autoclavar, pH 8,7.

Molaridade da solução (M): É a quantidade de mol do soluto dissolvido em 1 litro de solução.

$M = n_1/V$  ou  $M = m_1/mg_1 \cdot V$

Para acertar o pH das soluções:

NaOH: deixa a solução básica (maior ou igual a 7,0)

HCl: Deixa a solução ácida (menor ou igual a 4,0)

**Fenol Saturado:**

- Descristalizar o fenol em banho maria a 68° C;
- Em um becker de 2000mL, despejar o fenol já descristalizado e adicionar a solução Tris/Hcl 0,5M num volume final de 500mL;
- Agitar por 15 minutos no agitar magnético e esperar a separação das fases;
- Descartar a fase superior (Tris/Hcl);
- Adicionar Tris/Hcl 1M;
- Agitar por 15 minutos no agitar magnético e esperar a separação das fases;
- Verificar o pH da solução (7.8) com fita medidora;
- Se não obtiver o pH desejado, repetir o passo 5 em diante;
- Após obtido o pH adicionar 10% do volume total da solução de Tris/Hcl 1M;
- No frasco do fenol adicionar 0,1g de BME hidroxiquinolina para evitar oxidação da solução;
- Despejar o fenol de volta ao frasco e armazená-lo em geladeira 4°C.

## ANEXO 2: Dados referentes à avaliação oftalmológica do grupo com GPAA

Identificação	IDADE (anos)	PIO OD (mm Hg)	PIO OE (mm Hg)	FO OD*	FO OE*	Número de Cirurgias	Número de Medicções	História Familiar
2	56	26	25	0,8	0,7	3	2	-
3	55	0	24	1,0	1,0	4	2	-
5	79	28	28	0,9	0,9	2	2	+
8	80	20	23	0,8	1,0	2	3	-
10	69	16	16	1,0	1,0	3	3	-
11	70	25	32	1,0	0,9	3	3	-
15	76	42	46	0,9	0,9	3	3	-
18	69	20	21	0,6	0,6	1	1	+
19	77	28	24	0,7	0,5	2	1	+
20	52	20	20	0,9	0,9	1	1	-
25	49	22	32	0,4	0,9	1	3	-
26	73	42	38	1,0	1,0	4	4	-
27	60	26	27	0,8	0,8	1	1	-
28	83	30	44	0,7	0,9	2	3	-
33	49	14	21	1,0	0,9	3	3	+
34	70	14	22	1,0	1,0	3	3	-
35	70	30	51	0,8	1,0	4	4	+
36	70	29	27	1,0	1,0	3	3	-
37	60	20	20	0,5	0,5	1	1	-
38	70	35	29	0,8	0,8	2	2	-
40	49	25	26	0,9	1,0	2	3	+
42	83	22	22	0,6	0,7	1	1	-
45	54	54	44	1,0	1,0	2	3	-
53	68	24	30	0,9	0,8	3	3	+
56	70	28	25	0,3	0,1	1	1	-
57	68	46	34	1,0	1,0	3	3	+
58	79	20	32	0,7	1,0	2	3	-
59	84	26	26	0,8	0,7	2	3	-
61	57	18	18	0,7	0,6	1	1	-
62	68	22	28	0,9	0,9	3	3	-
63	45	20	19	0,7	0,8	2	2	-
65	73	32	22	0,9	0,9	3	3	-
66	68	18	18	1,0	1,0	3	3	-
69	70	31	28	1,0	1,0	3	3	-
72	70	16	23	0,9	1,0	3	3	-
73	87	19	22	0,9	0,9	2	2	-
76	45	28	32	0,8	0,8	1	1	-
77	72	26	24	0,7	0,8	1	2	-
78	84	23	33	0,9	1,0	3	3	-
79	68	32	32	1,0	1,0	3	3	+
80	65	20	20	0,6	0,4	1	1	+
83	52	18	18	0,5	0,5	1	1	-
87	80	23	26	0,8	0,9	2	2	+
91	74	35	35	0,9	1,0	3	3	+
95	63	28	26	0,6	0,6	1	1	-

Identificação	IDADE (anos)	PIO OD (mm Hg)	PIO OE (mm Hg)	FO OD*	FO OE*	Número de Cirurgias	Número de Medicações	História Familiar
96	82	24	22	1,0	1,0	3	3	-
99	82	17	22	0,6	0,7	1	1	-
98	76	20	20	0,7	0,6	2	2	-
100	70	50	50	1,0	1,0	3	3	-
101	70	23	33	0,8	0,8	2	2	-
102	52	28	56	0,6	1,0	1	3	-
156	62	24	24	0,9	0,9	1	0	-
157	69	15	20	0,6	0,8	1	2	-
210	56	20	18	0,9	0,8	0	3	+
245	77	23	23	1,0	1,0	1	1	-
305	79	9	12	0,7	0,6	0	4	-
309	54	27	24	0,7	0,8	0	2	-
311	67	26	28	0,5	0,5	0	3	-
312	65	23	23	1,0	1,0	0	1	-
340	37	26	28	0,5	0,5	0	3	+
341	53	24	20	0,7	0,8	1	0	-
342	54	20	20	0,4	0,6	0	3	+
351	62	23	21	0,7	0,6	0	3	-
353	54	32	32	0,9	0,9	0	4	-
359	56	23	21	0,7	0,7	0	2	-
381	72	20	20	0,7	0,7	0	2	-
383	35	23	16	0,8	0,6	1	3	-
384	61	22	23	0,6	0,8	0	3	-
386	66	17	21	0,9	0,8	0	0	-
387	76	22	22	0,7	0,7	0	1	-
388	63	23	25	0,9	1,0	0	3	+
394	67	20	18	0,5	0,6	0	1	+
395	45	36	36	1,0	1,0	1	4	+
396	57	18	18	0,9	0,9	0	4	-
397	47	24	20	0,9	1,0	1	3	-
398	40	20	17	1,0	1,0	1	4	-
400	57	20	24	0,8	1,0	1	3	-
401	68	28	30	0,8	0,9	1	4	-
402	41	15	16	0,5	0,7	0	3	+
403	43	20	20	0,8	0,8	0	3	-
404	38	35	35	0,9	0,9	1	3	+
406	79	18	16	0,9	0,8	0	3	-
408	52	13	14	1,0	1,0	0	3	-
409	64	14	14	1,0	1,0	1	3	+
412	35	28	29	0,7	0,4	0	3	+
453	65	23	23	1,0	1,0	1	1	-
454	44	26	30	0,8	1,0	1	3	+
484	43	27	20	0,5	0,6	1	1	+
485	73	22	32	0,9	0,9	0	4	-
486	60	20	20	0,6	0,8	0	3	-
490	65	16	16	0,8	0,8	1	1	-
491	87	19	15	0,8	0,5	0	3	-
492	87	17	17	0,9	0,9	0	2	-
493	62	14	14	1,0	0,9	0	2	-

Identificação	IDADE (anos)	PIO OD (mm Hg)	PIO OE (mm Hg)	FO OD*	FO OE*	Número de Cirurgias	Número de Medicções	História Familiar
591	61	45	15	0,9	0,9	1	2	-
672	48	14	12	1,0	0,8	1	1	+
906	55	2	19	0,6	0,6	0	3	+
1545	69	23	26	0,8	0,9	0	3	-
1714	68	18	18	0,9	0,9	0	4	-
<b>Média</b>	<b>63,67</b>	<b>24</b>	<b>25</b>	<b>0,8</b>	<b>0,8</b>	<b>1,31</b>	<b>2,41</b>	
<b>Desvio Padrão</b>	<b>12,95</b>	<b>8,52</b>	<b>8,42</b>	<b>0,17</b>	<b>0,18</b>	<b>1,18</b>	<b>1,03</b>	
<b>Máximo</b>	<b>87,00</b>	<b>54</b>	<b>56</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	
<b>Mínimo</b>	<b>35,00</b>	<b>9</b>	<b>12</b>	<b>0,4</b>	<b>0,4</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	

\* Relação escavação / disco óptico; + história familiar presente; - história familiar ausente

**ANEXO 3: Dados referentes à avaliação oftalmológica no grupo controle**

Identificação	IDADE (anos)	PIO OD (mm Hg)	PIO OE (mm Hg)	FO OD*	FO OE*	Número de Cirurgias	Número de Medicções	História Familiar
607	67	11	12	0,2	0,2	0	0	-
608	66	12	12	0,4	0,4	0	0	-
612	69	12	11	0,3	0,3	0	0	-
615	78	11	12	0,3	0,3	0	0	-
622	63	10	12	0,4	0,4	0	0	-
623	74	12	12	0,3	0,4	0	0	-
625	73	10	10	0,3	0,3	0	0	-
626	79	12	12	0,2	0,2	0	0	-
627	84	00	09	0,3	0,3	0	0	-
628	60	10	10	0,2	0,2	0	0	-
631	72	11	10	0,2	0,2	0	0	-
633	72	09	11	0,4	0,4	0	0	-
634	62	13	12	0,3	0,4	0	0	-
636	73	13	12	0,4	0,4	0	0	-
637	94	12	12	0,4	0,4	0	0	-
638	63	10	11	0,3	0,3	0	0	-
641	69	10	14	0,2	0,3	0	0	-
646	74	12	15	0,2	0,2	0	0	-
649	73	09	11	0,2	0,2	0	0	-
650	84	12	12	0,3	0,3	0	0	-
651	63	14	12	0,3	0,3	0	0	-
654	69	08	08	0,4	0,4	0	0	-
656	72	10	09	0,4	0,4	0	0	-
659	69	14	10	0,4	0,4	0	0	-
668	66	13	13	0,2	0,2	0	0	-
669	54	12	12	0,4	0,4	0	0	-
1060	62	10	10	0,2	0,2	0	0	-
1061	68	10	10	0,4	0,4	0	0	-
1062	70	10	10	0,3	0,3	0	0	-
1063	70	14	12	0,3	0,3	0	0	-
1064	62	12	12	0,4	0,4	0	0	-
1065	68	10	11	0,3	0,4	0	0	-
1066	69	10	10	0,3	0,3	0	0	-
1067	73	10	10	0,2	0,2	0	0	-
1068	67	13	13	0,3	0,3	0	0	-
1070	75	14	14	0,2	0,2	0	0	-
1071	64	14	14	0,2	0,2	0	0	-
1072	76	14	14	0,4	0,4	0	0	-
1073	67	12	12	0,3	0,4	0	0	-
1074	60	12	10	0,4	0,4	0	0	-
1075	72	14	12	0,4	0,4	0	0	-
1076	73	12	12	0,3	0,3	0	0	-
1077	70	15	16	0,3	0,3	0	0	-
1448	83	10	10	0,2	0,3	0	0	-
1450	66	10	10	0,4	0,4	0	0	-
1451	83	12	12	0,2	0,2	0	0	-
1452	69	13	11	0,3	0,3	0	0	-

Identificação	IDADE (anos)	PIO OD (mm Hg)	PIO OE (mm Hg)	FO OD*	FO OE*	Número de Cirurgias	Número de Medicções	História Familiar
1453	63	13	14	0,2	0,2	0	0	-
1454	64	14	14	0,3	0,3	0	0	-
1456	68	14	14	0,3	0,3	0	0	-
1458	67	10	10	0,4	0,4	0	0	-
1459	74	13	14	0,4	0,4	0	0	-
1461	71	10	12	0,4	0,4	0	0	-
1462	64	11	11	0,2	0,2	0	0	-
1540	86	14	14	0,3	0,3	0	0	-
1794	75	14	14	0,4	0,4	0	0	-
1795	63	12	12	0,3	0,4	0	0	-
1796	69	12	12	0,2	0,2	0	0	-
1798	72	14	14	0,4	0,4	0	0	-
1800	70	12	12	0,4	0,4	0	0	-
1801	72	14	14	0,0	0,4	0	0	-
1805	78	14	14	0,3	0,3	0	0	-
1806	63	10	10	0,3	0,3	0	0	-
1807	67	10	11	0,4	0,4	0	0	-
1808	73	10	10	0,3	0,3	0	0	-
1810	70	14	14	0,4	0,4	0	0	-
1811	63	11	12	0,3	0,4	0	0	-
1812	60	12	12	0,3	0,3	0	0	-
657	72	14	10	0,4	0,4	0	0	-
658	60	12	12	0,4	0,4	0	0	-
661	52	10	10	0,4	0,4	0	0	-
667	67	9	9	0,3	0,3	0	0	-
671	62	10	14	0,2	0,2	0	0	-
713	62	13	13	0,4	0,4	0	0	-
716	68	13	15	0,4	0,4	0	0	-
727	66	15	15	0,0	0,4	0	0	-
729	63	13	12	0,3	0,3	0	0	-
754	73	13	12	0,3	0,3	0	0	-
755	73	12	13	0,3	0,3	0	0	-
759	67	12	11	0,4	0,4	0	0	-
844	68	10	12	0,3	0,3	0	0	-
1457	64	14	14	0,4	0,4	0	0	-
1460	70	15	15	0,4	0,4	0	0	-
1463	63	14	14	0,4	0,4	0	0	-
1799	63	14	14	0,3	0,3	0	0	-
1803	71	13	13	0,2	0,2	0	0	-
2563	74	15	15	0,4	0,4	0	0	-
2564	73	13	13	0,4	0,4	0	0	-
2566	66	14	14	0,3	0,3	0	0	-
2568	67	13	14	0,2	0,2	0	0	-
2570	63	14	14	0,4	0,4	0	0	-
2571	68	14	13	0,4	0,4	0	0	-
2573	69	13	13	0,0	0,4	0	0	-
2574	81	13	13	0,3	0,3	0	0	-
2577	72	15	15	0,3	0,3	0	0	-
2580	66	12	10	0,3	0,3	0	0	-

Identificação	IDADE (anos)	PIO OD (mm Hg)	PIO OE (mm Hg)	FO OD*	FO OE*	Número de Cirurgias	Número de Medicamentos	História Familiar
2586	74	13	15	0,4	0,4	0	0	-
2588	68	15	14	0,3	0,3	0	0	-
2592	69	14	14	0,4	0,4	0	0	-
2597	75	15	15	0,4	0,4	0	0	-
<b>média</b>	69,30	12	12	0,3	0,3			
<b>desvio padrão</b>	6,57	2,11	1,73	0,09	0,07			
<b>máximo</b>	94,00	15	16	0,4	0,4			
<b>minimo</b>	52,00	8	8	0,2	0,2			

\* Relação escavação / disco óptico; - história familiar ausente

## **8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Adam MF, Belmouden A, Binisti P, Brezin AP, Valtot F, Bechetoille A, et al. Recurrent mutations in a single exon encoding the evolutionarily conserved olfactomedin-homology domain of TIGR in familial open-angle glaucoma. *Hum Mol Genet.* 1997 Nov;6(12):2091-7.

Allingham RR, Wiggs JL, Hauser ER, Larocque-Abramson KR, Santiago-Turla C, Broomer B, et al. Early adult-onset POAG linked to 15q11-13 using ordered subset analysis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005 Jun;46(6):2002-5.

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 Apr 9;338(15):1022-7.

Alward WL, Kwon YH, Kawase K, Craig JE, Hareh SS, et al. Evaluation of optineurin sequence variations in 1048 patients with open angle glaucoma. *Am. J. Ophthalmol.* 2003 nov; 136(5):904-10.

Armaly MF. Genetic factors related to glaucoma. *Ann N Y Acad Sci.* 1968 Jul 31;151(2):861-75.

Armaly MF. Inheritance of dexamethasone hypertension and glaucoma. *Arch Ophthalmol.* 1967 Jun;77(6):747-51.

Armaly MF. The genetic determination of ocular pressure in the normal eye. *Arch Ophthalmol.* 1967 Aug;78(2):187-92.

Aung T, Ebenezer ND, Brice G, Child AH, Prescott Q, et al. Prevalence of optineurin sequence variants in adult primary open angle glaucoma: implications for diagnostic testing. *J Med Genet.* 2003; 40: 101-4

Aung T, Rezaie T, Okada K, Viswanathan AC, Child AH, et al. Clinical features and course of patients with glaucoma with the E50K mutation in the optineurin gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005 Aug; 46 (8): 2816-22.

Ayala- Lugo RM, Aledavood A, Moroi SE, al e. A novel mutations in TIGR/MYOC gene in Colombian individuals with juvenile glaucoma. *Arvo Abstract book - anual meeting. Ford Lauderdale; 2002.*

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

Baird PN, Foote SJ, Mackey DA, Craig J, Speed TP, Bureau A. Evidence for a novel glaucoma locus at chromosome 3p21-22. *Hum Genet.* 2005 Jul;117(2-3):249-57.

Baird PN, Richardson AJ, Craig JE, Mackey DA, Rohtchina E, Mitchell P. Analysis of optineurin (OPTN) gene mutations in subjects with and without glaucoma: the Blue Mountains Eye Study. *Clin Experiment Ophthalmol*. 2004 Oct;32(5):518-22.

Bengtsson B. The prevalence of glaucoma. *Br J Ophthalmol*. 1981 Jan;65(1):46-9.

Child A.H., Aung T., Ebenezer N.D.; et al – Optineurin sequence variants in British glaucoma subjects. Arvo abstract book (Annual Meeting – Fort Lauderdale, Florida – 5-10 de maio de 2002).

Coffey M, Reidy A, Wormald R, Xian WX, Wright L, Courtney P. Prevalence of glaucoma in the west of Ireland. *Br J Ophthalmol*. 1993 Jan;77(1):17-21.

Damji KF, Allingham RR. Molecular genetics is revolutionizing our understanding of ophthalmic disease. *Am J Ophthalmol*. 1997 Oct;124(4):530-43.

De Luise VP, Anderson DR. Primary infantile glaucoma (congenital glaucoma). *Surv Ophthalmol*. 1983 Jul-Aug;28(1):1-19.

Dielemans I, Vingerling JR, Wolfs RC, Hofman 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 Nov;101(11):1851-5.

Fan BJ, Wang DY, Fan DS, Tam PO, Lam DS, Tham CC, et al. SNPs and interaction analyses of myocilin, optineurin, and apolipoprotein E in primary open angle glaucoma patients. *Mol Vis*. 2005;11:625-31.

Fan BJ, Wang DY, Lam DS, Pang CP. Gene mapping for primary open angle glaucoma. *Clin Biochem*. 2006 Mar;39(3):249-58.

Forsman E, Lemmela S, Varilo T, Kristo P, Forsius H, Sankila EM, et al. The role of TIGR and OPTN in Finnish glaucoma families: a clinical and molecular genetic study. *Mol Vis*. 2003 May 30;9:217-22.

Funayama T, Ishikawa K, Ohtake Y, Tanino T, Kurosaka D, Kimura I, et al. Variants in optineurin gene and their association with tumor necrosis factor-alpha polymorphisms in Japanese patients with glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004 Dec;45(12):4359-67.

Fuse N, Takahashi K, Akiyama H, Nakazawa T, Seimiya M, Kuwahara S, et al. Molecular genetic analysis of optineurin gene for primary open-angle and normal tension glaucoma in the Japanese population. *J Glaucoma*. 2004 Aug;13(4):299-303.

Gencik A, Gencikova A, Ferak V. Population genetical aspects of primary congenital glaucoma. I. Incidence, prevalence, gene frequency, and age of onset. *Hum Genet.* 1982;61(3):193-7.

Gencik A. Epidemiology and genetics of primary congenital glaucoma in Slovakia. Description of a form of primary congenital glaucoma in gypsies with autosomal-recessive inheritance and complete penetrance. *Dev Ophthalmol.* 1989;16:76-115.

Hattenhauer MG, Johnson DH, Ing HH, Herman DC, Hodge DO, Yawn BP, et al. The probability of blindness from open-angle glaucoma. *Ophthalmology.* 1998 Nov;105(11):2099-104.

Hauser MA, Sena DF, Flor J, Walter J, Auguste J, Larocque-Abramson K, et al. Distribution of optineurin sequence variations in an ethnically diverse population of low-tension glaucoma patients from the United States. *J Glaucoma.* 2006 Oct;15(5):358-63.

Javitt JC. Preventing blindness in Americans: the need for eye health education. *Surv Ophthalmol.* 1995 Jul-Aug;40(1):41-4.

Jay B, Paterson G. The genetics of simple glaucoma. *Trans Ophthalmol Soc U K.* 1970;90:161-71.

Johnson AT, Drack AV, Kwitek AE, Cannon RL, Stone EM, Alward WL. Clinical features and linkage analysis of a family with autosomal dominant juvenile glaucoma. *Ophthalmology.* 1993 Apr;100(4):524-9.

Johnson AT, Richards JE, Boehnke M, Stringham HM, Herman SB, Wong DJ, et al. Clinical phenotype of juvenile-onset primary open-angle glaucoma linked to chromosome 1q. *Ophthalmology.* 1996 May;103(5):808-14.

Klein BE, Klein R, Sponsel WE, Franke T, Cantor LB, Martone J, et al. Prevalence of glaucoma. The Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology.* 1992 Oct;99(10):1499-504.

Leske MC, Connell AM, Schachat AP, Hyman L. The Barbados Eye Study. Prevalence of open angle glaucoma. *Arch Ophthalmol.* 1994 Jun;112(6):821-9.

Leske MC, Connell AM, Wu SY, Hyman LG, Schachat AP. Risk factors for open-angle glaucoma. The Barbados Eye Study. *Arch Ophthalmol.* 1995 Jul;113(7):918-24.

Leske MC. The epidemiology of open-angle glaucoma: a review. *Am J Epidemiol.* 1983 Aug;118(2):166-91.

Leung YF, Fan BJ, Lam DS, Lee WS, Tam PO, Chua JK, et al. Different optineurin mutation pattern in primary open-angle glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003 Sep;44(9):3880-4.

Li Y, Kang J, Howitz M. Interaction of an adenovirus E3 14.7 – kilodalton protein with a novel tumor necrosis factor alpha-inducible cellular protein containing leucine leucine zipper domains. *Molec. And Cell. Biol.* 1998 Mar; 18(3):1601-10.

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

Melki R, Belmouden A, Akhayat O, Brezin A, Garchon HJ. The M98K variant of the OPTINEURIN (OPTN) gene modifies initial intraocular pressure in patients with primary open angle glaucoma. *J Med Genet.* 2003 Nov;40(11):842-4.

Mitchell P, Hourihan F, Sandbach J, Wang JJ. The relationship between glaucoma and myopia: the Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology.* 1999 Oct;106(10):2010-5.

Mitchell P, Smith W, Attebo K, Healey PR. Prevalence of open-angle glaucoma in Australia. The Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology.* 1996 Oct;103(10):1661-9.

Monemi S, Spaeth G, DaSilva A, Popinchalk S, Ilitchev E, Liebmann J, et al. Identification of a novel adult-onset primary open-angle glaucoma (POAG) gene on 5q22.1. *Hum Mol Genet.* 2005 Mar 15;14(6):725-33.

Mukhopadhyay A, Komatireddy S, Acharya M, Bhattacharjee A, Mandal AK, Thakur SK, et al. Evaluation of Optineurin as a candidate gene in Indian patients with primary open angle glaucoma. *Mol Vis.* 2005;11:792-7.

Musarella MA. Gene mapping of ocular diseases. *Surv Ophthalmol.* 1992 Jan-Feb;36(4):285-312.

Nemesure B, Jiao X, He Q, Leske MC, Wu SY, Hennis A, et al. A genome-wide scan for primary open-angle glaucoma (POAG): the Barbados Family Study of Open-Angle Glaucoma. *Hum Genet.* 2003 May;112(5-6):600-9.

Netland PA, Wiggs JL, Dreyer EB. Inheritance of glaucoma and genetic counseling of glaucoma patients. *Int Ophthalmol Clin.* 1993 Spring;33(2):101-20.

Perkins ES. Blindness from glaucoma and the economics of prevention. *Trans Ophthalmol Soc U K.* 1978;98(2):293-5.

Quigley HA, Vitale S. Models of open-angle glaucoma prevalence and incidence in the United States. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997 Jan;38(1):83-91.

Quigley HA. Open-angle glaucoma. *N Engl J Med.* 1993 Apr 15;328(15):1097-106.

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

Raymond V., Dubois S., Anctil J.L., et al – Large scale screening of Optineurin (OPTN) glaucoma-causing mutations in the French-Canadian population of Quebec. Arvo abstract book (Annual Meeting – Fort Lauderdale, Florida – 5-10 de maio de 2002).

Resnikoff S, Pascolini D, Etya'ale D, Kocur I, Pararajasegaram R, Pokharel GP, et al. Global data on visual impairment in the year 2002. Bull World Health Organ. 2004 Nov;82(11):844-51.

Rezaie 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. 2002 Feb 8;295(5557):1077-9.

Rezaie T, Sarfarazi M. Molecular cloning, genomic structure, and protein characterization of mouse optineurin. Genomics. 2005 Jan;85(1):131-8.

Rezaie T, Sarfarazi M. Analysis of rare variants and common haplotypes in the optineurin gene in Swedish glaucoma cases. Ophthalmol. Genet. 2005 26: 85-9.

Sarfarazi M, Child A, Stoilova D, Brice Glen, Desai T, et al. Localization of the fourth locus (GLCE) for adult-onset primary open angle glaucoma to the 10p15-p14 region. Am. J. Hum. Genet. 1998; 62:641-52.

Sarfarazi M, Rezaie T. Optineurin in primary open angle glaucoma. Ophthalmol Clin North Am. 2003 Dec;16(4):529-41.

Shields MB, Ritch R, Kruping T. The glaucomas. 2a. ed; 1996.

Shiose Y, Kitazawa Y, Tsukahara S, Akamatsu T, Mizokami K, Futa R, et al. Epidemiology of glaucoma in Japan--a nationwide glaucoma survey. Jpn J Ophthalmol. 1991;35(2):133-55.

Smith AF, Smith JG. The economic burden of global blindness: a price too high! Br J Ophthalmol. 1996 Apr;80(4):276-7.

Sommer A, Tielsch JM, Katz J, Quigley HA, Gottsch JD, Javitt JC, et al. Racial differences in the cause-specific prevalence of blindness in east Baltimore. N Engl J Med. 1991 Nov 14;325(20):1412-7.

Stoilova D, Child A, Brice G, Desai T, Barsoum-Homsy M, Ozdemir N, et al. Novel TIGR/MYOC mutations in families with juvenile onset primary open angle glaucoma. J Med Genet. 1998 Dec;35(12):989-92.

Stoilova D, Child A, Trifan OC, Crick RP, Coakes RL, Sarfarazi M. Localization of a locus (GLC1B) for adult-onset primary open angle glaucoma to the 2cen-q13 region. Genomics. 1996 Aug 15;36(1):142-50.

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 Jan 31;275(5300):668-70.

Tang S, Toda Y, Kashiwagi K, Mabuchi F, Iijima H, Tsukahara S, et al. The association between Japanese primary open-angle glaucoma and normal tension glaucoma patients and the optineurin gene. *Hum Genet*. 2003 Aug;113(3):276-9.

Teikari JM. Genetic factors in open-angle (simple and capsular) glaucoma. A population-based twin study. *Acta Ophthalmol (Copenh)*. 1987 Dec;65(6):715-20.

Teikari JM. Genetic influences in open-angle glaucoma. *Int Ophthalmol Clin*. 1990 Summer;30(3):161-8.

Thylefors B. The role of international ophthalmology in blindness prevention. *Am J Ophthalmol*. 1995 Feb;119(2):229-30.

Tielsch JM, Katz J, Sommer A, Quigley HA, Javitt JC. Family history and risk of primary open angle glaucoma. The Baltimore Eye Survey. *Arch Ophthalmol*. 1994 Jan;112(1):69-73.

Tielsch JM, Sommer A, Katz J, Royall RM, Quigley HA, Javitt J. Racial variations in the prevalence of primary open-angle glaucoma. The Baltimore Eye Survey. *Jama*. 1991 Jul 17;266(3):369-74.

Toda Y, Tang S, Kashiwagi K, Mabuchi F, Iijima H, Tsukahara S, et al. Mutations in the optineurin gene in Japanese patients with primary open angle glaucoma and normal tension glaucoma. *Am. J. of Med. Genet*. 2004; 125A:1-4

Traverso CE, Walt JG, Kelly SP, Hommer AH, Bron AM, et al. Direct costs of glaucoma and severity of the disease: a multinational long term study of resource utilization in Europe. *Brit. J. Ophthal*. 2005; 89: 1245-49.

Trifan OC, Traboulsi EI, Stoilova D, Alozie I, Nguyen R, Raja S, et al. A third locus (GLC1D) for adult-onset primary open-angle glaucoma maps to the 8q23 region. *Am J Ophthalmol*. 1998 Jul;126(1):17-28.

Umeda T., Matsuo T.; Tanabe Y.; et al – Optineurin gene polymorphisms in Japanese glaucoma patients and normal individuals. Arvo abstract book (Annual Meeting – Fort Lauderdale, Florida – 5-10 de maio de 2002).

Vasconcellos J. P. C.; Melo M. B.; Schimiti R.; et al. - Penetrance and phenotype of the CYS433ARG Myocilin Mutation in a Family Pedigree with Primary Open-Angle Glaucoma. *Journal of Glaucoma* 12:104-107, 2003.

Vasconcellos J.P.C. – Avaliação da frequência e do tipo de mutações no gene TIGR/MYOC em uma população Brasileira com glaucoma primário de ângulo

aberto do tipo juvenil. Tese de Doutorado: "Doutor em Ciências Médicas, na Área de Oftalmologia" defendida em 28/11/2001 e homologada em 07/03/2002.

Vittitow J, Borrás T. Expression of optineurin, a glaucoma-linked gene, is influenced by elevated intraocular pressure. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 Oct 18;298(1):67-74.

Wagner RS. Glaucoma in children. *Pediatr Clin North Am*. 1993 Aug;40(4):855-67.

Walter J.W., Allingham R.R., Flor J.D.; et al –Optineurin sequence variants do not predispose to primary open-angle glaucoma. *Arvo abstract book (Annual Meeting – Fort Lauderdale, Florida – 5-10 de maio de 2002)*.

Wang DY, Fan BJ, Canlas O, Tam PO, Ritch R, Lam DS, et al. Absence of myocilin and optineurin mutations in a large Philippine family with juvenile onset primary open angle glaucoma. *Mol Vis*. 2004 Nov 9;10:851-6.

Weisschuh N, Neumann D, Wolf C, Wissinger B, Gramer E. Prevalence of myocilin and optineurin sequence variants in German normal tension glaucoma patients. *Mol Vis*. 2005;11:284-7.

Wiggs JL, Allingham RR, Hossain A, Kern J, Auguste J, DelBono EA, et al. Genome-wide scan for adult onset primary open angle glaucoma. *Hum Mol Genet*. 2000 Apr 12;9(7):1109-17.

Wiggs JL, Auguste J, Allingham RR, Flor JD, Pericak-Vance MA, Rogers K, et al. Lack of association of mutations in optineurin with disease in patients with adult-onset primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol*. 2003 Aug;121(8):1181-3.

Wiggs JL, Damji KF, Haines JL, Pericak-Vance MA, Allingham RR. The distinction between juvenile and adult-onset primary open-angle glaucoma. *Am J Hum Genet*. 1996 Jan;58(1):243-4.

Wiggs JL, Del Bono EA, Schuman JS, Hutchinson BT, Walton DS. Clinical features of five pedigrees genetically linked to the juvenile glaucoma locus on chromosome 1q21-q31. *Ophthalmology*. 1995 Dec;102(12):1782-9.

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

Willoughby CE, Chan LL, Herd S, Billingsley G, Noordeh N, Levin AV, et al. Defining the pathogenicity of optineurin in juvenile open-angle glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004 Sep;45(9):3122-30.

Wirtz MK, Samples JR, Kramer PL, Rust K, Topinka JR, Yount J, et al. Mapping a gene for adult-onset primary open-angle glaucoma to chromosome 3q. *Am J Hum Genet*. 1997 Feb;60(2):296-304.

Wirtz MK, Samples JR, Rust K, Lie J, Nordling L, Schilling K, et al. GLC1F, a new primary open-angle glaucoma locus, maps to 7q35-q36. *Arch Ophthalmol.* 1999 Feb;117(2):237-41.

Wu SY, Leske MC. Associations with intraocular pressure in the Barbados Eye Study. *Arch Ophthalmol.* 1997 Dec;115(12):1572-6.

Wu SY, Nemesure B, Leske MC. Glaucoma and myopia. *Ophthalmology.* 2000 Jun;107(6):1026-7.

## **FONTES CONSULTADAS**

1. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo. Pós-Graduação – Normatização para apresentação de dissertações e teses. São Paulo, Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, 2004. 26p.
2. Ferreira ABH. Aurélio século XXI: o dicionário da língua portuguesa. 3.ed. Rio de Janeiro, Nova Fronteira, 1999. 2128p.
3. National Library of Medicine Index Medicus – List of journals indexed in Index Medicus. Maryland, National Library of Medicine, 2006. Disponível from Internet <<ftp://nlmpubs.nlm.nih.gov/online/journals/ljiweb.pdf>>.
4. Shields MB, Ritch R, Kruping T. The glaucomas. 2a. ed; 1996.
5. Vasconcellos J.P.C. – Tese de Doutorado: Avaliação da frequência e do tipo de mutações no gene TIGR/MYOC em uma população Brasileira com glaucoma primário de ângulo aberto do tipo juvenil. “Doutor em Ciências Médicas, na Área de Oftalmologia” defendida em 28/11/2001 e homologada em 07/03/2002.

## **RESUMO**

O glaucoma é uma das principais causas de cegueira irreversível no mundo. Recentemente, estudos de ligação em famílias com glaucoma primário de ângulo aberto (GPAA) permitiram identificar os dois primeiros genes associados a esta forma de glaucoma, tendo sido o primeiro, o gene *TIGR/MYOC* identificado em 1997 por Stone e cols. Em 2002 Rezaie e cols identificaram o gene *OPTN*, também associado ao GPAA. Mutações neste gene já foram descritas nas populações caucasóides Americana, Canadense e Britânica e entre Japoneses. OBJETIVO: Determinar a freqüência das mutações E50K, T34T, M98K, 691\_692insAG e R545Q no gene *OPTN* em uma população brasileira de indivíduos com GPAA e grupo controle. MÉTODO: Foram incluídos neste estudo 99 pacientes com GPAA, independentemente do nível de PIO e 100 indivíduos sem glaucoma da mesma faixa etária. A freqüência das mutações na seqüência do gene *OPTN* foram analisadas por meio de seqüenciamento direto e digestão enzimática do produto da PCR. RESULTADO: Cinco mutações foram avaliadas em nosso estudo, as mutações T34T e R545Q apresentaram diferença estaticamente significativa na comparação entre a freqüência nos grupo GPAA e controle, sendo a T34T mais freqüente no grupo com glaucoma e a R545Q mais freqüente no grupo controle. As mutações M98K e 691\_692insAG foram encontradas em freqüência baixa e similar nos grupos estudados. A mutação E50K não foi observada. CONCLUSÕES: A freqüência das mutações no gene *OPTN* é variável entre as diferentes etnias. É necessária a realização de novos estudos com intuito de melhor determinar e caracterizar o perfil de cada população para

que no futuro possamos atuar de maneira mais efetiva na prevenção do glaucoma.

## **ABSTRACT**

Glaucoma is one of the leading causes of irreversible blindness in the world. Recently, research involving families with primary open angle glaucoma (POAG) have identified the first two genes related to the disease. The *TIGR/MYOC* was the first gene and was identified by Stone et al in 1997. The *OPTN* was described in 2002 by Rezaie et al. Mutations in this gene have already been described in the white population of the USA and Canada, and also in japaneses. PURPOSE: To verify the frequency of E50K, T34T, M98K, 691\_692insAG e R545Q mutations on the *OPTN* gene in Brazilian subjects with POAG. METHODS: 99 patients with POAG and 100 normal age-matched subjects enrolled in this study. The frequency of mutations in the *OPTN* gene sequences ere analyzed by direct sequencing and enzymatic digestion of PCR products. RESULTS: Four different mutations were evaluated; T34T and R545Q mutations were statistically significant when compared to controls, seing T34T more frequent in POAG patients and R545Q in controls. The M98K and 691\_692insAG presented with low frequency and were similar between groups. The E50K substitution was not observed. CONCLUSION: The frequency of mutations in the *OPTN* gene is variable among different ethnic groups. It is necessary to prepare other studies with POAG patients in order to better understand the profile of each population, and effectively act in the prevention of glaucoma.

## LISTA E APÊNDICES

### APÊNDICE 1: Aprovação do Comitê de Ética em pesquisa em seres humanos da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo



IRMANDADE DA SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE SÃO PAULO  
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS  
 APROVADO PELA CONEP/MS EM 30/04/97-REF: CNS/CARTA 32 DOC.  
 Rua Dr. Cesário Mota Júnior, 112 Santa Cecília CEP 01277900 São Paulo -SP  
 PABX (11) 32240122 Ramal: 5502 - Fax- Ramal: 5710 E-mail: [eticamer@scamsp.org.br](mailto:eticamer@scamsp.org.br)

São Paulo, 1 de junho de 2004.

Projeto nº 038/04  
 Informe este número para identificar  
 seu projeto no CEP

Ilmo.(a).Sr.(a).

**Dr.(a).Cristiano Caixeta Umbelino**  
 Departamento de Oftalmologia

O Comitê de Ética em Pesquisa da ISCMSP, reunido no dia **31/03/2004** e no cumprimento de suas atribuições, após revisão do seu projeto de pesquisa:

**"Rastreamento de mutações no gene OPTN em pacientes com glaucoma primário de ângulo aberto"**, emitiu enquadrando-o na seguinte categoria:

- Aprovado inclusive o TCLE ;**
- Com pendência** modificações ou informação relevante a serem atendidas em 60 dias (enviar as alterações em duas cópias);
- Retirado**, por não ser reapresentado no prazo determinado;
- Não aprovado:** e
- Aprovado** inclusive o TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido versão ) e encaminhado para apreciação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – MS -CONEP, a qual deverá emitir parecer no prazo de 60 dias. **Informamos, outrossim, que, segundo os termos da Resolução 196/96 do Ministério da Saúde a pesquisa só poderá ser iniciada após o recebimento do parecer de aprovação da CONEP.**

Prof. Dr. Daniel R. Muñoz  
 Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa  
 ISCMSP

**APÊNDICE 2: Aprovação do Comissão Nacional de Ética em Pesquisa**

MINISTÉRIO DA SAÚDE  
Conselho Nacional de Saúde  
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

**PARECER Nº 1277/2005**

**Registro CONEP:** 10442 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

**Registro CEP:** 038/04

**Processo nº** 25000.084003/2004-51

**Projeto de Pesquisa:** "Rastreamento de mutações no gene OPTN em pacientes com glaucoma primário de ângulo aberto".

**Pesquisador Responsável:** Dr. Cristiano Caixeta Umbelino

**Instituição:** Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo

**Área Temática Especial:** Genética Humana

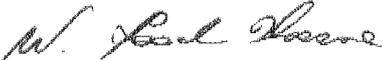
Ao se proceder à análise do projeto de pesquisa em questão, em resposta ao Parecer CONEP nº 527/2005, cabem as seguintes considerações:

- a) Uma nova versão do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido com as adequações solicitadas foi apresentada.
- b) As informações enviadas atendem aos aspectos fundamentais da Res. CNS 196/96 sobre diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos.
- c) O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP da instituição supracitada.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

**Situação:** Protocolo aprovado.

Brasília, 11 de julho de 2005.

  
WILLIAM SAAD HOSSNE  
Coordenador da CONEP/CNS/MS

### APÊNDICE 3: Termo de consentimento e livre esclarecimento

#### TERMO DE CONSENTIMENTO E LIVRE ESCLARECIMENTO

Título do projeto:

#### RASTREAMENTO DE MUTAÇÕES NO GENE OPTN EM PACIENTES COM GLAUCOMA PRIMÁRIO DE ÂNGULO ABERTO

Investigador principal:

**Dr. Cristiano Caixeta Umbelino** CRM:96458 - CIC: 561069471-04 - RG:1740890

Eu, Cristiano Caixeta Umbelino convido o Sr(a) \_\_\_\_\_ a participar de um projeto de pesquisa envolvendo pacientes com e sem glaucoma.

#### OBJETIVO DA PESQUISA:

Identificar em um grupo de pessoas, regiões no DNA humano associados ao glaucoma. Posteriormente, procurar identificar alterações (mutações) no gene que correspondam ao gene "Optineurim" (OPTN), relacionado ao do desenvolvimento do glaucoma. Esse estudo poderá levantar dados que possibilitaram um conhecimento mais aprofundado sobre o glaucoma, doença que representa uma das principais causas de cegueira no mundo.

As amostras de DNA, e as informação médica obtidas neste estudo poderão ser compartilhadas com outros pesquisadores, sempre com aprovação prévia do Comitê de Ética em Pesquisa da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de São Paulo e Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP e com a obtenção de novo "termo de consentimento e livre esclarecimento" (TCLE), sempre que possível.

O sigilo será mantido em todos os estudos colaborativos através da utilização de um código para a identificação dos indivíduos participantes.

O senhor(a) deve entender que neste estudo o objetivo não é a realização de aconselhamento genético e nem alterar qualquer forma de tratamento ou acompanhamento prévio do participante, seja ele portador ou não de glaucoma. O estudo tem finalidade de realizar triagem de mutações genéticas que podem ou não aumentar a predisposição de desenvolver glaucoma.

Portanto desejo ser informado dos resultados dos exames:

## RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO

Sua participação é voluntária e o senhor(a) poderá recusar a participar ou retirar seu consentimento interrompendo a sua participação no estudo a qualquer momento (incluindo a retirada da amostra de sangue) sem comprometer os cuidados médicos que está recebendo atualmente ou receberá no futuro nas instituições participantes.

Sua participação nesse estudo poderá ser interrompida a qualquer momento pela equipe responsável pelo estudo, caso julguem necessário, porém com prévia autorização do comitê de ética em pesquisa (CEP) da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo.

## PROCEDIMENTO:

Caso o senhor(a) concorde em participar desse estudo, os pesquisadores participantes farão perguntas a respeito dos seus antecedentes médicos e de seus familiares. A única vantagem que o senhor(a) poderá ter é saber sobre a presença do gene OPTN e de suas alterações (mutações), que por ventura possam ser encontradas na análise do DNA obtido com a amostra de sangue coletada.

No entanto, o senhor(a) deve saber que essa análise pode não detectar a presença do gene OPTN ou de suas alterações (mutações).

O senhor(a) será submetido a um exame oftalmológico para confirmar seu estado clínico. O exame oftalmológico tem o objetivo de observar se há alterações no olho que lembrem aquelas que vemos no glaucoma. Além disso, sua pressão ocular será medida, o que pode causar um leve ardor ocular ou embaçamento transitório da visão, exame de campo visual e do fundo do olho também serão realizados. Estes procedimentos são normalmente realizados em qualquer exame oftalmológico, são seguros e não apresentam riscos a sua vista. Finalmente, uma amostra de sangue será colhida (15 a 20 ml, equivalente a 1,5 colher de sopa) para pesquisa de gene OPTN relacionado ao glaucoma. Hospitalização não será necessária.

Neste estudo haverá um grupo de pessoas voluntárias que não possuem glaucoma e ou qualquer doença oftalmológica, chamados de "grupo controle". Este grupo será convidado a participar do estudo através de palestras sobre o que é glaucoma e qual a finalidade do estudo, entre o público leigo que acompanham os pacientes que fazem acompanhamento ambulatorial no departamento de Oftalmologia da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo.

Neste grupo serão realizados procedimentos que são normalmente realizados em qualquer exame oftalmológico como: medida da acuidade visual e da pressão ocular, realização de fundo de olho e campo visual com aparelho perimetria de frequência dupla (FDT). A finalidade destes exames é excluir a possibilidade de haver no grupo controle algum indivíduo portador de glaucoma. Também será colhida uma amostra de sangue (15 a 20 ml, equivalente a 1,5 colher de sopa) para pesquisa de gene OPTN relacionado ao glaucoma.

Os procedimentos mencionados acima serão realizados após o seu consentimento em participar do estudo. Com exceção da coleta de amostra de sangue, todos os procedimentos realizados fazem parte dos cuidados médicos de rotina de um exame oftalmológico. Portanto serão realizados apenas em uma das suas visitas ao hospital. A pesquisa laboratorial utilizando as amostras de sangue coletadas precisam de um tempo maior para sua realização e será feita durante um período máximo de 5 anos após a coleta.

O senhor(a) deve saber que o material genético, extraído da amostra de sangue coletada, será guardado e que qualquer outro projeto que pretenda utilizá-lo, deverá ser aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de São Paulo e Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP e com a obtenção de novo “termo de consentimento e livre esclarecimento” (TCLE), sempre que possível.

- Concordo que o material genético seja guardado.
- Não concordo que o material genético seja guardado.

#### RISCO E DESCONFORTO

Considerando que os procedimentos propostos como o exame oftalmológico e a coleta de sangue são realizados de maneira rotineira no hospital, a indenização em caso de qualquer dano será o total e irrestrito apoio ético e profissional na área da saúde neste hospital. É assegurado ao voluntário o direito de recorrer aos órgãos competentes, caso considere necessário.

A coleta de 15 a 20 ml de sangue será efetuada. Os riscos associados a esse procedimento são mínimos, podendo ocorrer dor e manchas roxas (equimoses) no local da coleta de sangue. O desconforto será mínimo pois trata-se de uma coleta de sangue geralmente da veia do braço e será realizada por profissional da área da saúde deste hospital, devidamente habilitado para realizar esse procedimento.

### VANTAGENS

O senhor(a) não obterá nenhuma vantagem direta com a participação neste estudo e que o diagnóstico e o tratamento provavelmente não serão modificados. Os resultados dos testes moleculares que por ventura forem obtidos estarão disponíveis através do acompanhamento no ambulatório de origem.

Não está previsto nenhum tipo de ressarcimento ao senhor(a), uma vez que o senhor(a) não terá nenhum gasto gerado pelo estudo, já que todos os procedimentos serão realizados aproveitando uma de suas visitas de rotina ao hospital.

### SIGILO

Toda a informação médica, assim como o resultados dos testes genéticos decorrentes desse projeto de pesquisa, farão parte do prontuário médico e serão submetidos aos regulamentos das instituições participantes.

Quanto ao sigilo da informação médica, somente terão acesso aos resultados os pesquisadores envolvidos e não será permitido o acesso aos prontuários a terceiros (seguradoras, empregadores, supervisores hierárquicos, etc.).

Se os resultados ou informações fornecidas forem utilizados para fins de publicação científica, nenhum nome será citado.

### FORNECIMENTO DE INFORMAÇÃO ADICIONAL

O senhor(a) poderá requisitar informações adicionais relativas ao estudo a qualquer momento. O Dr Cristiano Caixeta Umbelino, estará disponível para responder suas questões e preocupações no telefone (11) 32267000 Ramal 5888 (ambulatório do Departamento de Oftalmologia da Santa Casa de São Paulo no Prédio Conde de Lara, toda terça e quarta-feira pela manhã). Em caso de recurso, dúvidas ou reclamações contatar a diretoria do Departamento de Oftalmologia da Santa Casa de São Paulo, locado no Prédio Conde de Lara, na rua Cesário Motta Júnior nº 112, bairro de Santa Cecília São Paulo – SP.

**IRMANDADE DA SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA SANTA CASA DE SÃO PAULO  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP**

**RASTREAMENTO DE MUTAÇÕES NO GENE OPTN EM PACIENTES COM GLAUCOMA  
PRIMÁRIO DE ÂNGULO ABERTO**

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

NOME DO PACIENTE: \_\_\_\_\_  
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : \_\_\_\_\_ SEXO M ( ) F ( )  
Nº REGISTRO: \_\_\_\_\_ DATA NASCIMENTO: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
ENDEREÇO: \_\_\_\_\_ Nº \_\_\_\_\_ Apto: \_\_\_\_\_  
BAIRRO: \_\_\_\_\_ CIDADE: \_\_\_\_\_  
CEP: \_\_\_\_\_ - \_\_\_\_\_ TELEFONE: DDD ( ) \_\_\_\_\_

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Eu, \_\_\_\_\_, recebi explicações do Dr Cristiano Caixeta Umbelino, sobre a realização de campimetria automatizada com Perimetria de Dupla Frequência (FDT) e coleta de 20 ml de sangue, para exame de laboratório, para pesquisa de gene relacionado a glaucoma. Fui informado (a) que esta coleta não vai proporcionar nenhum desconforto adicional e que meu nome não será divulgado. Fui também informado que as amostras de sangue serão armazenadas e que a pesquisa laboratorial poderá ser realizada por um período máximo de 5 anos após coleta e qualquer outro projeto utilizando as amostras só será realizado mediante aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) após obtenção de novo consentimento. No caso de qualquer dúvida, poderei entrar em contato com Dr Cristiano no telefone 32267000 ramal: 5888, ambulatório da Oftalmologia no Prédio Conde de Lara, toda segunda e quarta-feira pela manhã. Caso eu não concorde com a coleta, não ocorrerá nenhum prejuízo ao meu tratamento.

Eu declaro que, após convenientemente esclarecido pelo Dr Cristiano e ter entendido o que me foi explicado, consinto em realizar este exame.

Assinatura do paciente ou responsável: \_\_\_\_\_

Dr Cristiano Caixeta Umbelino CRM 96458: \_\_\_\_\_

São Paulo, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

# 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](#)