



BRUNO BATISTA DE SOUZA

**“RASTREAMENTO DE MUTAÇÕES NO GENE ASB10 (GLC1F) EM
PACIENTES PORTADORES DE GLAUCOMA PRIMÁRIO DE
ÂNGULO ABERTO”**

CAMPINAS
2013



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

BRUNO BATISTA DE SOUZA

**“RASTREAMENTO DE MUTAÇÕES NO GENE ASB10 (GLC1F) EM
PACIENTES PORTADORES DE GLAUCOMA PRIMÁRIO DE
ÂNGULO ABERTO”**

Orientadora: Profa. Dra. Mônica Barbosa de Melo

Co-Orientador: Prof. Dr. José Paulo Cabral de Vasconcelos

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

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO/TESE DEFENDIDA PELO ALUNO BRUNO BATISTA DE SOUZA E ORIENTADO PELA PROFa. DRa. MÔNICA BARBOSA DE MELO.

Assinatura do Orientador

**CAMPINAS
2013**

iii

III

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

S729r Souza, Bruno Batista de, 1983-
Rastreamento de mutações no gene ASB10
(GLC1F) em pacientes portadores de glaucoma primário
de ângulo aberto / Bruno Batista de Souza. -- Campinas,
SP : [s.n.], 2013.

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

1. Reação em cadeia da polimerase. 3. Glaucoma.
4. Mutação. I. Melo, Mônica Barbosa de. II.
Vasconcellos, Jose Paulo Cabral de. III. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Screening of mutations in ASB10 gene in primary open angle
glaucoma patients.

Palavras-chave em inglês:

Polymerase chain reaction

Glaucoma

Mutation

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Mestre em Clínica Médica

Banca examinadora:

Mônica Barbosa de Melo [Orientador]

Cláudia Vianna Maurer Morelli

Marcelo Lima Ribeiro

Data da defesa: 27-05-2013

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

BRUNO BATISTA DE SOUZA

Orientador (a) PROF(A). DR(A). MÔNICA BARBOSA DE MELO

MEMBROS:

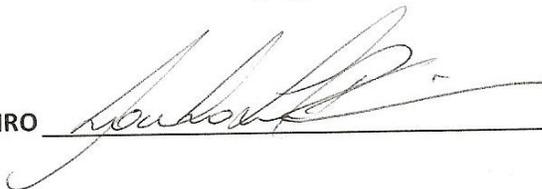
1. PROF(A). DR(A). MÔNICA BARBOSA DE MELO



2. PROF(A). DR(A). CLÁUDIA VIANNA MAURER MORELLI



3. PROF(A). DR(A). MARCELO LIMA RIBEIRO



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

Data: 27 de maio de 2013

DEDICATÓRIA

Aos meus pais **Rosalinda e Antônio** que sempre me apoiaram nas decisões que tomei em minha vida e me ensinaram a seguir o que acho correto.

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª. Dr^ª Mônica Barbosa de Melo, por ter aberto as portas de seu laboratório e confiado em meu trabalho.

À minha família pela confiança e apoio incondicional.

À minha namorada Dayane Amaro que teve que aguentar todos os meus períodos de estresse e mesmo assim esteve ao meu lado me apoiando.

Aos meus companheiros de moradia: meu padrinho José Maria e Francisco.

À todo o pessoal que passou pelo laboratório e ao pessoal que continua nele.

Ao Andrei do Hemocentro pela colaboração na parte experimental.

Às secretarias do CBMEG Sandra, Tânia e Gabriela, as quais sempre foram prestativas e atenciosas com todos.

À Adriana secretária da Clínica Médica por esclarecer minhas dúvidas quando necessário.

Ao CNPQ pelo importante apoio financeiro.

RESUMO

O glaucoma é uma das principais causas de cegueira irreversível no mundo, acometendo cerca de 70 milhões de indivíduos, com pelo menos 6,8 milhões de pessoas apresentando cegueira bilateral. Fisiopatologicamente, o glaucoma é uma doença degenerativa do nervo óptico, frequentemente associada a uma elevada pressão intra-ocular (PIO) e caracterizada pela escavação do disco óptico e alterações no campo visual. Diferentes genes associados ao glaucoma têm sido identificados por meio de estudos de ligação, mas alterações nesses genes representam uma pequena proporção dos genes envolvidos no desenvolvimento da doença. Os genes identificados até o momento são *TIGR/MYOC*, *OPTN*, *WDR36*, *NTF4* e *ASB10*, sendo que o último, identificado no ano de 2012, foi inicialmente mapeado em 1999 (lócus *GLC1F*) a partir do estudo de famílias com glaucoma primário de ângulo aberto (GPAA). O gene *ASB10* está localizado na região 7q36.1 (lócus *GLC1F*) e possui 6 éxons, sendo que sua região de leitura compreende os éxons 1 a 5. Pertencente à família de proteínas *ASB*, a proteína *ASB10* possui uma região central com sete repetições de anquirinas codificada pelos éxons 2 e 3 e uma região C-terminal *SOCS Box* codificada pelo éxon 5. Pasutto et al. 2012 observaram que a variante Thr255Thr segregava com o glaucoma em uma família, tornando-o candidato a gene causador do GPAA no lócus *GLC1F*. O objetivo deste estudo do tipo caso-controle, foi avaliar a presença de mutações no gene *ASB10* em 100 pacientes afetados por GPAA, e 100 indivíduos controle, por meio das técnicas de PCR e sequenciamento. A análise dos sequenciamentos permitiu a identificação de 13 mutações, sendo 8 do tipo “missense” e 5 sinônimas. Dentre as 13 variantes, quatro não haviam sido previamente reportadas ou encontram-se descritas em bases de dados. A análise estatística pelo teste qui-quadrado não mostrou associação entre alterações no gene *ASB10* e o desenvolvimento de GPAA ($p = 0.3377$). Alterações foram encontradas na mesma proporção entre indivíduos do grupo com GPAA e do grupo controle. As variantes do tipo “missense” foram submetidas a duas análises *in silico*, que sugerem que tais alterações não causam danos relacionados à estrutura ou à função protéica ou possuem relação com o desenvolvimento da doença. Não foi possível observar relação entre alterações no gene *ASB10* e níveis elevados de PIO. Em conclusão, sugere-se que alterações no gene *ASB10* possam não estar associadas à etiologia do GPAA na amostra da população estudada.

ABSTRACT

Glaucoma is an optic nerve degenerative disease, often associated with high intraocular pressure (IOP) and characterized by excavation of the optic disc and visual field loss. Some genes associated with glaucoma have been identified, but there is a small contribution of variants in these genes in disease development. The *ASB10* gene, identified in 2012, was first mapped in 1999 through the study of families with primary open angle glaucoma (POAG). *ASB10* is located at chromosome 7q36.1 (GLC1F locus) and has 6 exons, with an open reading frame region that comprises exons 1-5. Belonging to the family of ASB proteins, the ASB10 protein has a central region with seven ankyrin repeats encoded by exons 2 and 3 and a C-terminal SOCS Box region encoded by exon 5. The aim of this case-control study was to evaluate the presence of variations in the *ASB10* gene in 100 patients with POAG and 100 controls. Coding sequence and intron-exon boundaries were evaluated through PCR and direct sequencing. Sequencing analysis allowed the identification of 13 variants, 8 missense and 5 synonymous. Among the 13 variants, four had not been previously reported or are not described in databases. Variants were observed in the same proportion among individuals from the POAG group and the control group. The missense variants that were described for the first time were subjected to *in silico* analysis, which suggest that such changes might not cause damages related to protein structure or function. It is important to note that four missense variants were present only in the POAG group including, A75E, R222G, P387T, and R438C. No association was observed between alterations in the *ASB10* gene and high levels of IOP. Changes in the *ASB10* gene may not be associated with the etiology of POAG in this sample of the Brazilian population. Functional analysis and an extended cohort may help in the evaluation of the role of *ASB10* in relation to the etiology of POAG.

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

ASB1	<i>Ankyrin Repeat and SOCS Box Containing 1</i>
ASB2	<i>Ankyrin Repeat and SOCS Box Containing 2</i>
ASB5	<i>Ankyrin Repeat and SOCS Box Containing 5</i>
ASB6	<i>Ankyrin Repeat and SOCS Box Containing 6</i>
ASB8	<i>Ankyrin Repeat and SOCS Box Containing 8</i>
ASB10	<i>Ankyrin Repeat and SOCS Box Containing 10</i>
ASB11	<i>Ankyrin Repeat and SOCS Box Containing 11</i>
ASB15	<i>Ankyrin Repeat and SOCS Box Containing 15</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECS	<i>Elongin C-cullin-SOCS box</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ESE	<i>Exon splice enhancer</i>
GLC1A	Primeiro <i>locus</i> associado ao GPAA
GLC1B	Segundo <i>locus</i> associado ao GPAA
GLC1C	Terceiro <i>locus</i> associado ao GPAA
GLC1D	Quarto <i>locus</i> associado ao GPAA
GLC1E	Quinto <i>locus</i> associado ao GPAA
GLC1F	Sexto <i>locus</i> associado ao GPAA
GLC1G	Sétimo <i>locus</i> associado ao GPAA
GLC1H	Oitavo <i>locus</i> associado ao GPAA
GLC1I	Nono <i>locus</i> associado ao GPAA
GLC1J	Décimo <i>locus</i> associado ao GPAA

GLC1K	Décimo primeiro <i>locus</i> associado ao GPAA
GLC1L	Décimo segundo <i>locus</i> associado ao GPAA
GLC1M	Décimo terceiro <i>locus</i> associado ao GPAA
GLC1N	Décimo quarto <i>locus</i> associado ao GPAA
GLC1O	Décimo quinto <i>locus</i> associado ao GPAA
GLC1P	Décimo sexto <i>locus</i> associado ao GPAA
GLC1Q	Décimo sétimo <i>locus</i> associado ao GPAA
GPAA	Glaucoma Primário de Ângulo Aberto
GPAA-C	Glaucoma Primário de Ângulo Aberto Congênito
GPAA-J	Glaucoma Primário de Ângulo Aberto Juvenil
GPN	Glaucoma de Pressão Normal
μL	Microlitro
mL	Mililitro
mRNA	RNA mensageiro
MT	Malha trabecular
MYOC	<i>Myocilin</i>
NTF-4	<i>neurotrophin-4</i>
ηg	Nanograma
ηm	Nanômetro
OPTN	<i>Optneurin</i>
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i>
PIO	Pressão Intra-ocular
pmol	Picomol

rpm	Rotações por minuto
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SOCS	<i>Supressors of cytokine signaling</i>
SSB	<i>SPRY-domain proteins with a SOCS box</i>
TAG	Tonometria de aplanção de Goldmann
TBE	Tris/Borato/EDTA
TIGR	<i>Trabecular meshwork glucocorticoid response</i>
TMUB1	<i>Transmembrane and ubiquitin-like domain containing 1</i>
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
WDR36	<i>WD-repeat domain</i>
WSB	<i>WD40 repeat proteins with a SOCS box</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Frequência dos tipos de Glaucoma no Hospital das Clínicas – Unicamp (Modificado de Urbano et al., 2003)..	24
Tabela 2. <i>Loci</i> gênicos associados ao GPAA (Modificado de Porter et al, 2011).....	26
Tabela 3. Mutações identificadas no gene <i>ASB10</i> (Modificado de Pasutto et al., 2012).	36
Tabela 4. Sequências dos primers Sense (S) e anti-sense (AS) com suas respectivas Tm's e tamanho do fragmento gerado pela amplificação.	53
Tabela 5. Variações no gene <i>ASB10</i> observadas no grupo GPAA e no grupo controle. Referência para a sequência do gene <i>ASB10</i> para isoforma 3 é NM_080871.3; variantes sinalizadas com * referem-se a isoforma 1: NM_001142459.1; ND = Não determinado; # = Variantes que estão sendo descritas pela primeira vez; AA = Troca de Aminoácido; DP = Domínio protéico.....	58
Tabela 6. Porcentagem de mutações presentes no gene <i>ASB10</i> (ASB10+) e ausentes (ASB10-) em pacientes e controles.	59
Tabela 7. Avaliação dos efeitos das mutações “missense” na função protéica, por meio da ferramenta SIFT.....	60
Tabela 8. Avaliação dos efeitos das mutações “missense” na função e estrutura protéica, por meio da ferramenta PolyPhen-2..	60
Tabela 9. Predição dos efeitos das mutações “missense” no desenvolvimento de doenças pela ferramenta SNPs&GO..	61
Tabela 10. Dados clínicos dos indivíduos pertencentes ao grupo GPAA que apresentaram variáveis do tipo “missense”. PIO OD = pressão intra-ocular olho direito; PIO OE = pressão intra-ocular olho esquerdo; FO OD = Fundoscopia olho direito; FO OE = Fundoscopia olho esquerdo ..	62
Tabela 11. Frequências, em outros estudos, das variantes encontradas apenas nos indivíduos pertencentes ao grupo GPAA.....	67

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Diferença entre nervo óptico normal e nervo óptico danificado (<http://www.infoescola.com/doencas/glaucoma/>).....19
- Figura 2.** Em **A** está a representação de um olho com ângulo (espaço entre a córnea e a íris) aberto. As setas azuis indicam o fluxo normal do humor aquoso, que é produzido no corpo ciliar, situado na câmara posterior, escoia pela pupila até a câmara anterior e é drenado pela malha trabecular, saindo do olho pelo canal de Schlemm e veias episclerais. Em **B** está representado um olho com ângulo fechado, onde o fluxo do humor aquoso torna-se impedido, devido á anatomia da câmara anterior, íris e cristalino (Modificado de <http://www.medrounds.org/glaucoma-guide/2006/06/section-4-d-angle-closure-glaucoma.html>).22
- Figura 3.** Representação esquemática dos domínios da proteína ASB10, mostrando 7 repetições ankyrins e a região C-terminal SOCS Box (Modificado de Pasutto et al., 2012).33
- Figura 4.** Desenho esquemático da estrutura do Gene *ASB10*. Em vermelho está a ORF do gene. Em verde estão representados os íntrons e em preto regiões não traduzidas.....33
- Figura 5.** Cromatogramas das quatro novas variantes observadas no gene *ASB10*, todas indicadas por uma seta. A. G68D; B. A75E; C. Q164R; D. E380E.....59

Sumário

RESUMO	IX
ABSTRACT	X
LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS	11
LISTA DE TABELAS	14
LISTA DE FIGURAS	15
1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Glaucoma	19
1.2. Classificação dos tipos de Glaucoma	20
1.3. Glaucoma Primário de Ângulo Aberto (GPAA) - Definição	23
1.4. Epidemiologia	23
1.5. Fatores de Risco	24
1.6. Genética do Glaucoma: <i>Loci</i>, genes e mutações relacionados ao GPAA	25
1.7. Gene <i>TIGR/MYOC</i>	27
1.8. Gene <i>OPTN</i>	28
1.9. Gene <i>WDR36</i>	29
1.10. Gene <i>NTF4</i>	29
1.11. Locus <i>GLC1F</i>: identificação e associação com o GPAA	30
1.12. Gene <i>ASB10</i>: Identificação e associação com o GPAA	31
1.13. Gene <i>ASB10</i>: Estrutura Gênica, Proteica e localização	32
1.14. Gene <i>ASB10</i>: Estudos populacionais	34
1.15. Família de proteínas <i>ASB</i>: Estrutura	37
1.16. Região <i>SOCS Box</i>: Estrutura e função	37
1.17. Região <i>Ankyrin Repeat</i>: Estrutura e função	38
1.18. Funções das proteínas <i>ASB</i>	40
2. JUSTIFICATIVA	42
3. OBJETIVOS	44
3.1. Geral	45
3.2. Específicos	45
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS	46

4.1. Casuística	47
4.1.1 Recrutamento De Pacientes Com GPAA (Grupo De Estudo)	47
4.1.2. Critérios De Inclusão	47
4.1.3. Critérios De Exclusão	48
4.1.4. Grupo Controle	48
4.2. Métodos	48
4.2.1. Tonometria (medida da pressão intra-ocular) e paquimetria (medida da espessura da córnea)	48
4.2.2. Gonioscopia: avaliação do ângulo	49
4.2.3. Fundoscopia: avaliação do disco óptico (relação escavação/disco)	49
4.3. Extração do DNA	50
4.4. Quantificação e verificação da integridade do DNA genômico	51
4.5. Reação em cadeia da Polimerase (PCR)	51
4.6. Reação de sequenciamento	53
4.7. Análise estatística	54
4.8. Avaliação <i>in silico</i> de mutações “missense”	55
5. RESULTADOS	56
6. DISCUSSÃO	63
7. CONCLUSÕES	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
ANEXOS	84

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Glaucoma

O termo Glaucoma envolve um grupo de doenças degenerativas do nervo óptico, que levam à perda correspondente de campo visual em decorrência da morte de células ganglionares da retina, e que estão frequentemente associadas a valores elevados (≥ 21 mmHg) de pressão intra-ocular (PIO) (Shields et al., 1996; Weston, 2000). Clinicamente, o nervo óptico afetado pelo glaucoma apresenta uma relação escavação/disco aumentada decorrente da perda de tecido neural (Figura 1).

A PIO, quando não tratada a tempo, seja por meio medicamentoso ou cirúrgico, pode levar a uma perda irreversível de campo visual e até mesmo à cegueira. Portanto, torna-se de grande importância o diagnóstico em estágios iniciais da doença (Bayat et al., 2008). De acordo com Quigley (1999) os efeitos da redução de acuidade visual em um indivíduo glaucomatoso se dão a partir de 40% de perda de axônios.

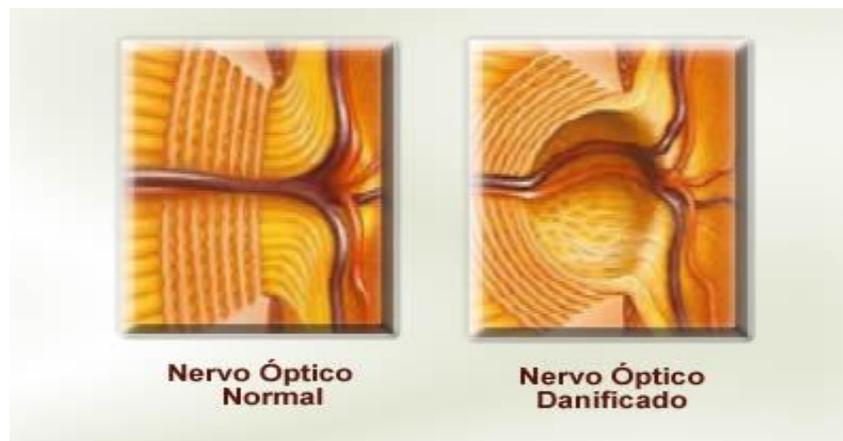


Figura 1. Diferença entre nervo óptico normal e nervo óptico danificado (<http://www.infoescola.com/doencas/glaucoma/>).

1.2 Classificação dos tipos de Glaucoma

Para a classificação dos glaucomas, considera-se o fator inicial que leva ao desenvolvimento da lesão glaucomatosa. Quando este é desconhecido o glaucoma é denominado primário (idiopático) ou secundário caso envolva condições oculares ou sistêmicas de causas conhecidas, como o uso de corticoesteróides tópico e/ou sistêmico, trauma ocular prévio ou catarata. Além disto, pode-se classificar o glaucoma segundo o aspecto anatômico do seio camerular dividindo-o em aberto ou fechado (Figura 2) ou ainda de acordo com a idade de instalação da moléstia em congênito, juvenil e adulto (Leske, 1983).

O glaucoma congênito primário (GCP) é uma forma rara porém grave da doença, que usualmente, se manifesta dentro do primeiro ano de vida (Sarfarazi & Stoilov, 2000). É caracterizada por uma elevada pressão intraocular resultante da obstrução do fluxo do humor aquoso no segmento anterior do olho e, acredita-se que ocorra devido á uma malformação anatômica na malha trabecular e no segmento anterior do globo ocular (Anderson, 1981).

A elevada pressão intraocular causa danos irreversíveis ao nervo óptico e pode levar à cegueira caso não seja tratada. Crianças afetadas comumente apresentam fotofobia, epífora e alargamento de globo e córnea. Essa forma de glaucoma é observada tanto em casos esporádicos como em casos familiares (Sarfarazi, Stoilov, Schenkman, 2003). Em casos familiares, a doença é transmitida sob padrão autossômico recessivo de herança. A incidência do glaucoma congênito varia geograficamente e etnicamente, com a menor incidência (1:10,000) em populações ocidentais e com maior incidência em populações endocruzadas, como por exemplo a subpopulação de ciganos na Eslováquia (1:1,250)

(Plásilová et al., 1999).

O glaucoma primário de ângulo aberto Juvenil (GPAA-J) manifesta-se em indivíduos com idade entre 10 e 35 anos, apresentando normalmente níveis elevados de PIO. Neste tipo de Glaucoma, existe um predomínio de miopia e, existe frequentemente a necessidade de intervenção cirúrgica (Jhonson et al., 1993; Wiggs et al., 1995).

O glaucoma primário de ângulo aberto adulto (GPAA-A) é a forma clínica mais comumente encontrada (Fraser, 2004). Possui aspectos clínicos semelhantes aos do GPAA-J, porém com níveis de PIO mais baixos e com o dano glaucomatoso sendo detectado em idade mais avançada (> 35 anos) (Jhonson et al., 1996).

Dentro da classificação de GPAA, existe um importante subtipo denominado *glaucoma de pressão normal (GPN)*, cujos pacientes portadores desta forma clínica apresentam valores de PIO dentro da distribuição normal do esperado para a população (Hitchings & Anderson, 1983; Hitchings, 1992; Werner, 1996). Este subtipo de GPAA é mais prevalente em populações asiáticas, mais especificamente, na população japonesa (Shiose et al., 1991; Iwase et al., 2004; Oku et al., 2009).

O glaucoma primário de ângulo fechado é caracterizado por altos valores de PIO devido ao bloqueio do fluxo do humor aquoso da câmara posterior para a câmara anterior. Este bloqueio ocorre devido ao aumento do contato entre a superfície posterior da íris e a superfície anterior do cristalino que leva ao abaulamento da íris periférica e consequente fechamento angular como consequência da aderência entre a malha trabecular e a íris (Ritch & Lowe, 1996) (Figura 2).

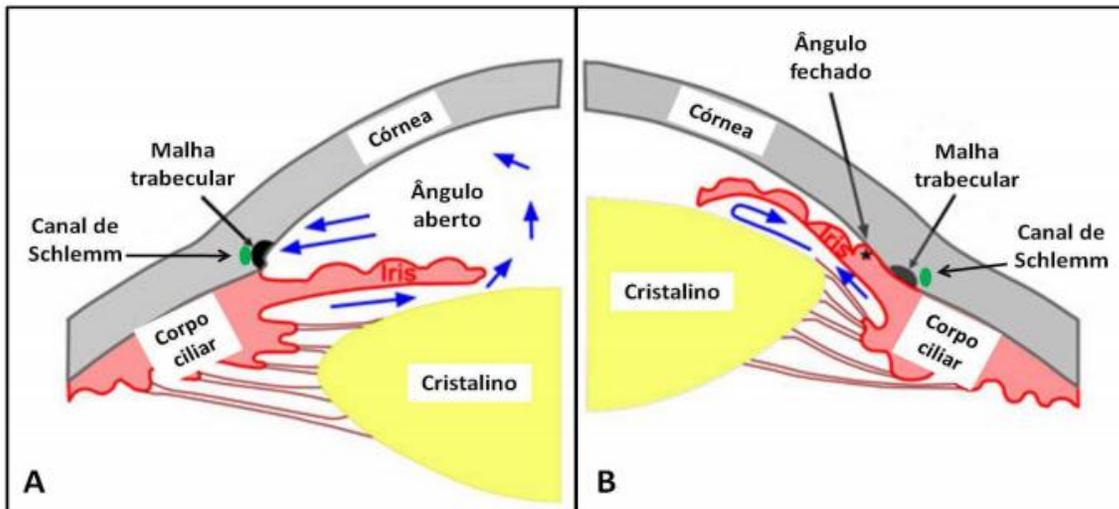


Figura 2. Em A está a representação de um olho com ângulo (espaço entre a córnea e a íris) aberto. As setas azuis indicam o fluxo normal do humor aquoso, que é produzido no corpo ciliar, situado na câmara posterior, escoo pela pupila até a câmara anterior e é drenado pela malha trabecular, saindo do olho pelo canal de Schlemm e veias episclerais. Em B está representado um olho com ângulo fechado, onde o fluxo do humor aquoso torna-se impedido, devido à anatomia da câmara anterior, íris e cristalino (Modificado de <http://www.medrounds.org/glaucoma-guide/2006/06/section-4-d-angle-closure-glaucoma.html>).

Dentre os glaucomas secundários, destacam-se o glaucoma pigmentar, o glaucoma cortisônico e o glaucoma pseudoexfoliativo.

O glaucoma pigmentar acomete preferencialmente indivíduos do sexo masculino entre os trinta e quarenta anos de idade, que apresentem quadro de miopia e caracteriza-se pela ocorrência de dispersão pigmentar e aumento da PIO, que potencialmente pode desencadear dano glaucomatoso ao nervo óptico. (Richter et al., 1986).

O glaucoma cortisônico possui como provável causa alterações funcionais e morfológicas das células da malha trabecular e da matriz extracelular que a circunda (Kimura & Honda, 1982; Wordinger & Clark, 1999). O aumento da PIO neste tipo de glaucoma ocorre devido ao uso de corticoesteróides tópicos e/ou sistêmicos (Skuta & Morgan, 1996).

O glaucoma pseudoexfoliativo desenvolve-se tardiamente (na sexta e sétima

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

1.3 Glaucoma Primário de Ângulo Aberto (GPAA) - Definição

O GPAA recebe esta denominação devido a sua etiologia desconhecida (glaucoma primário) e por serem visíveis ao exame gonioscópico todas as estruturas do seio cameral (ângulo aberto) (Leske, 1983).

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

1.4 Epidemiologia

Quigley & Broman (2006) previram que a incidência de glaucoma na população mundial em 2010 seria de 60,5 milhões de pessoas, aumentando para 79,6 milhões em 2020. Dentro desses valores, 8,4 milhões de pessoas apresentariam cegueira bilateral em

2010. Já para o ano de 2020 existe uma previsão de 11,2 milhões de pessoas apresentando cegueira bilateral. Esses valores colocam o glaucoma como a segunda maior causa de cegueira mundial, ficando atrás apenas da catarata e, como a primeira causa de cegueira irreversível.

De acordo com Rudnicka e cols (2006), a prevalência do GPAA, cresce mais rapidamente em caucasóides do que em negros e populações asiáticas, mas entre todas as idades, a população negra tem a maior prevalência estimada da doença. O GPAA sugere ser mais comum em homens do que em mulheres em todos os grupos raciais.

Em 2003, foi realizado um estudo no Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, a fim de se avaliar a frequência dos tipos de glaucoma no setor de Glaucoma. Os resultados (Tabela 1) mostraram que o tipo mais frequente foi o GPAA (56,2%), seguido pelo GPAF (20,4%) (Urbano et al., 2003).

Tabela 1. Frequência dos tipos de Glaucoma no Hospital das Clínicas – Unicamp (Modificado de Urbano et al., 2003).

	Geral		Bilateral		Unilateral	
	N	%	N	%	N	%
GLAUCOMAS PRIMÁRIOS						
GPAA	298	56,2	298	56,2	0	0
GPAF	108	20,4	108	20,4	0	0
GPC	19	3,6	18	3,4	1	0,2
GNP	16	3,0	16	3,0	0	0
GPAA-J	8	1,5	8	1,5	0	0

1.5 Fatores de Risco

O principal fator de risco associado ao desenvolvimento do GPAA é o aumento da

pressão intra-ocular. Entretanto, pode-se observar também a presença de GPAA entre indivíduos com PIO dentro de valores considerados estatisticamente normais (< 21 mmHg). O diagnóstico de glaucoma de pressão normal (GPN) é dado a este grupo de pacientes que representam de 20 a 50% dos casos de GPAA, segundo estudos envolvendo diferentes populações (Sommer, 1991; Tielsch, 1991, Quigley, 1993).

Se a PIO não é característica onipresente no desenvolvimento do GPAA, a apoptose parece ser o processo responsável pela perda de células ganglionares no glaucoma. Este processo seria desencadeado por uma série de fatores, incluindo a própria elevação da PIO, alterações do fluxo sanguíneo do disco óptico (Spaeth, 1998), processos de origem auto-imune (Wax, 2000), ou mesmo condições intrínsecas dos tecidos que compõem o disco óptico que o tornariam mais susceptível para a instalação do dano glaucomatoso (Nickells, 1999).

Além da elevação da PIO, outros fatores também estão relacionados com o GPAA, como etnia, quando indivíduos negros possuem maiores chances de desenvolverem a doença e idade visto que quanto maior a idade, maior a prevalência da doença. Além destes, a miopia e histórico familiar positivo, hipertensão sistêmica, diabetes e tabagismo também aparecem como fatores de risco (Shiose, 1991; Tielsch, 1991; Wolfs et al., 1998; Wu, 2000).

1.6 Genética do Glaucoma: *Loci*, genes e mutações relacionados ao GPAA

Para que haja uma adequada identificação e classificação de *loci* candidatos que possam estar associados ao desenvolvimento do glaucoma, a Organização Mundial do Genoma Humano propôs que genes associados ao glaucoma devem ser precedidos pela sigla “GLC”. Para se representar os tipos de glaucoma (ângulo aberto, fechado e congênito)

utilizam-se respectivamente os números “1”, “2” e “3”. Já as letras “A”, “B”, “...”, “Q” representam a ordem de identificação dos *loci* (Raymond, 1997).

Até o momento, foram descritos 17 *loci* cromossômicos que conferem susceptibilidade ao desenvolvimento do GPAA, que compreendem de GLC1A a GLC1Q e estão descritos na tabela 2 (Porter et al., 2011). Entretanto, apenas 5 genes foram associados ao desenvolvimento do GPAA, sendo eles: *myocilin* (*MYOC/GLC1A*), *optineurin* (*OPTN/GLC1E*), *WD-repeat domain 36* (*WDR36/GLC1G*), *neurotrophin-4* (*NTF4/GLC1O*) e *Ankyrin repeat and SOCS Box containing 10* (*ASB10/GLC1F*) (Stone et al., 1997; Rezaie et al., 2002; Monemi et al., 2005; Pasutto et al., 2009; Pasutto et al., 2012).

Tabela 2. *Loci* gênicos associados ao GPAA (Modificado de Porter et al, 2011)

Locus	Localização Cromossômica	Gene
GLC1A	1q23	<i>MYOC</i>
GLC1B	2cenq-13	
GLC1C	3q21-q24	
GLC1D	8q23	
GLC1E	10p15-p14	<i>OPTN</i>
GLC1F	7q35-36	<i>ASB10</i>
GLC1G	5q22	<i>WDR36</i>
GLC1H	2p16.3-p15	
GLC1I	15q11-q13	
GLC1J	9q22	
GLC1K	20p12	
GLC1L	3p22-p21	
GLC1M	5q	
GLC1N	15q22-q24	
GLC1O	19q13.33	<i>NTF4</i>
GLC1P	12q14	
GLC1Q	4q35.1-q35.2	

Existem diferentes tipos de glaucoma, e cada tipo parece ser geneticamente heterogêneo. Diferentes genes associados ao glaucoma têm sido identificados, mas alterações nesses genes justificam apenas uma pequena proporção da doença. A maioria dos casos de glaucoma parece ser de etiologia multifatorial, originados pela interação entre múltiplos *loci* e fatores ambientais. Vários fatores de susceptibilidade foram indicados para a progressão do dano glaucomatoso. Esses fatores se encaixam em dois grupos, aqueles que afetam a PIO e aqueles importantes na modulação da viabilidade das células ganglionares (Libby, 2005).

1.7 Gene *MYOC*

O gene *MYOC* (*locus* GLC1A) foi identificado em 1997 por Stone e cols. Mutações no gene *MYOC* existem em aproximadamente 2% a 4% de pacientes com GPAA e em 10% a 30% de pacientes com glaucoma primário de ângulo aberto juvenil (GPAA-J, uma forma mais precoce e grave de GPAA) (Shimizu, et al., 2000; Fan & Wiggs, 2010). O gene *MYOC* codifica uma glicoproteína de 504 aminoácidos (Karali, 2000; Swiderski, 2000) que é expressa em tecidos oculares relevantes para o glaucoma, incluindo o humor aquoso, malha trabecular, corpo ciliar e células ganglionares (Tamm, 2002).

Alterações na sequência do gene *MYOC* associadas ao desenvolvimento do GPAA (adulto e juvenil) foram observadas em diversas populações (americana, francesa, espanhola, alemã, suíça, australiana, canadense, japonesa, chinesa, coreana, indiana, haitiana, colombiana) com uma frequência que varia de 2 a 5% (Adam, 1997; Suzuki, 1997; Alward, 1998; Michels-Rautenstrauss, 1998; Mansergh, 1998; Fingert, 1999; Yoon, 1999; Lam, 2000; Kubota, 2000; Mataftisi, 2001; Faucher, 2002; Mukhopadhyay, 2002; Fredette, 2002; Ayala-Lugo, 2002). No Brasil, a frequência de mutações no gene *MYOC* em

pacientes com GPAA-J e GPAA-A foi de 35, 7% e 3,85% respectivamente. Além disto, uma nova alteração foi identificada exclusivamente em nossa população (Cys433Arg); tal mutação está associada a uma instalação precoce do glaucoma com PIOs elevadas e necessidade frequente de procedimento cirúrgico para controle da mesma (Vasconcellos, 2002; Vasconcellos et al., 2003).

1.8 Gene *OPTN*

Em 2002, Rezaie e cols identificaram o gene *Optineurin (optic neuropathy induced protein – OPTN)* associado ao GPAA. O mesmo estudo constatou alterações na seqüência deste gene em 16,7% das famílias com GPAA e história familiar positiva, incluindo indivíduos glaucomatosos com PIO normal (glaucoma de pressão normal). Tal aspecto, adicionado ao fato do gene *OPTN* poder participar da via de sinalização do fator de necrose tumoral α (*TNF- α*), que está relacionada ao processo de apoptose do nervo óptico, abre novas perspectivas para o entendimento do mecanismo do dano glaucomatoso. Posteriormente, observou-se que a expressão do gene *OPTN* no seio cameral (malha trabecular) estava aumentada após exposição à dexametasona, ao *TNF- α* e ao aumento da PIO, sugerindo que a proteína codificada por este gene poderia exercer função protetora neste tecido (Vittitow & Borrás, 2002).

No mesmo estudo, ao avaliarem uma população britânica, os autores identificaram a mutação M98K no gene *OPTN* entre indivíduos glaucomatosos e controles. A mutação encontrou-se mais prevalente em pacientes do que em controles, conferindo possivelmente, maior susceptibilidade ao desenvolvimento do GPAA.

Na população brasileira a avaliação das variantes alélicas T34T, E50K, M98K, códon de parada (691_692insAG) e R545Q não mostraram associação com GPAA

(Caixeta-Umbelino et al., 2009).

Uma análise combinada de vários estudos sugere um papel do gene *OPTN* na etiologia do glaucoma, porém, este papel não está claro para todos os alelos identificados. Uma possibilidade é de que as mutações no gene *OPTN* não induzam ao glaucoma, a menos que o contexto genético permita, isto explica o porquê de mutações também terem sido encontradas nos indivíduos controle (Libby et al., 2005).

1.9 Gene *WDR36*

Em pesquisa realizada por Monemi e cols (2005), o gene *WD repeat domain 36* (*WDR36*, cromossomo 5q22.1, *locus* GLC1G) foi associado ao desenvolvimento do GPAA, devido à identificação de alelos autossômicos dominantes neste gene em pacientes glaucomatosos. Porém, no estudo realizado por Hewitt e cols (2006), utilizando 249 pacientes glaucomatosos e 217 pacientes controles, todos australianos e no estudo realizado por Fingert e cols (2007) utilizando 223 pacientes glaucomatosos e 245 pacientes controles, todos do estado americano de Iowa, não foram encontradas associações entre o gene *WDR36* e pacientes glaucomatosos não aparentados.

Allingham e cols (2009) em seu trabalho sugeriram que alterações estruturais neste gene não agiriam como causadoras da doença, mas aumentariam a suscetibilidade para o desenvolvimento do glaucoma.

1.10 Gene *NTF4*

Pasutto e cols (2009) em seu estudo mostraram que mutações no gene *NTF4* prejudicam a sinalização de neurotrofinas no GPAA. Além disso, o gene foi associado à doença após mutações serem encontradas em 1,7% dos pacientes glaucomatosos, todos de

origem europeia. Porém, estudos posteriores nas populações indiana (Rao et al., 2010), americana com ancestralidade européia (Liu et al., 2010) e chinesa (Chen et al., 2012) não mostraram associação entre mutações no gene *NTF4* com o desenvolvimento de GPAA.

1.11 Locus GLC1F: identificação e associação com o GPAA

O locus GLC1F foi inicialmente mapeado por Wirtz et al. (1999) a partir do estudo de 25 membros de uma família européia não-hispânica com GPAA. Nesta família, o GPAA estava presente em ao menos quatro gerações, transmitido sob forma de herança autossômica dominante.

Neste estudo, os membros da família e seus cônjuges foram avaliados clinicamente quanto à presença de GPAA com base na PIO, escavação do disco óptico e campo visual. Amostras de DNA foram usadas para análise utilizando marcadores microssatélites.

Após as análises clínicas, 10 membros afetados em 4 gerações mostraram evidências de GPAA incluindo $PIO \geq 22$ mmHg e/ou taxa de escavação do disco ≥ 0.6 e/ou alterações de campo visual consistentes com dano glaucomatoso.

Para a análise de ligação, inicialmente foram excluídos outros *loci* relacionados ao GPAA, incluindo GLC1A, GLC1B e GLC1C. Foi realizada uma busca do tipo *genome-wide* utilizando 570 marcadores micro-satélites com distância média de 5 a 10 cM entre os mesmos. Algumas regiões apresentaram LOD scores positivos, mas quando outros marcadores eram adicionados, essas regiões eram excluídas. Após a exclusão de uma grande região do genoma, os autores identificaram ligação ao marcador D7S636 e, subsequentemente, a vários marcadores micro-satélite adjacentes.

A análise haplotípica também mostrou que a doença segregava com padrão autossômico dominante, juntamente com o locus mapeado na região 7q35-q36 entre os

marcadores D7S2442 e D7S483, o que compreende uma região de 5.3-cM na região distal do braço longo do cromossomo 7, associando assim, o *locus* à doença.

1.12 Gene *ASB10*: Identificação e associação com o GPAA

Para a identificação do gene *ASB10*, os autores refinaram a região *GLCIF*, de 5.3cM, compreendida entre os marcadores D7S2442 e D7S483, a uma região de 2.24Mb através da identificação de *crossovers* no haplótipo que segregava com a doença em familiares dos membros afetados entre os marcadores *rs4401760* (porção proximal) e *rs73161885* (porção telomérica). O sequenciamento dos 42 genes contidos na região refinada (2.24Mb) identificou oito variantes do tipo “missense”, sendo que todas já estavam previamente descritas como SNPs na base de dados *HapMap* (www.hapmap.org), excluindo então essas variantes presentes na região *GLCIF* como causadores de GPAA nesta família (Pasutto et al., 2012).

Duas variantes sinônimas não previamente reportadas foram identificadas, sendo c.765C>T (p.Thr255Thr) no gene *ASB10* e c.204G>A (p.Gly68Gly) no gene *TMUB1* (*transmembrane and ubiquitin-like domain containing protein-1*). A variação no gene *TMUB1* também estava presente em dois indivíduos controle que não apresentavam sinais clínicos de glaucoma, excluindo este gene como provável causador da doença. Já a variante no gene *ASB10* segregava com o glaucoma na família. Esta nova variante não havia sido previamente reportada em bases de dados de SNPs, no banco de dados *1000 Genomes database* (www.1000genomes.org) ou nos 195 pacientes e 85 controles originados dos Estados Unidos. Desta forma, o *ASB10* se tornou um grande candidato como causador da doença no *locus GLCIF* (Pasutto et al., 2012).

Todo o gene *ASB10*, incluindo íntrons, éxons e 3400 bp à montante da região

codificante foram sequenciados em dois familiares afetados, dois familiares não portadores do haplótipo da doença, um indivíduo controle e dois pacientes não relacionados portadores de GPAA. Nenhuma variante rara adicional foi encontrada nos membros da família afetada (Pasutto et al., 2012).

A análise *in silico* mostrou que a variante c.765C>T (p.Thr255Thr) reduz a ligação do *exon splice enhancer* (ESE) a proteínas ricas em arginina/serina que modulam o *splicing* do mRNA. A mutação encontra-se no centro de um sítio ESE no exon 3, o que resulta na perda de um sítio SF2/ASF e causa redução de um sítio SF2/ASF (IgM-BRCA1) (Pasutto et al., 2012).

Ao se fazer a comparação de variantes de *splice* do mRNA *ASB10* entre 4 membros afetados, um não afetado da mesma família e um indivíduo controle não relacionado, observou-se um produto de PCR de 885 pb em todos os indivíduos, enquanto que um produto menor foi observado nos membros afetados. A análise do menor produto revelou que o exon 3 estava ausente no transcrito do *ASB10*. Como consequência dessa perda, o quadro de leitura foi alterado, introduzindo um stop códon no exon 4. A predição da proteína mostrou que esta apresentava apenas duas repetições do tipo anquirina ao invés de sete e a região *SOCS Box* estava completamente ausente.

1.13 Gene *ASB10*: Estrutura Gênica, Proteica e localização

Pertencente à família de proteínas *ASB*, a proteína *ASB10* possui uma região central com sete repetições de anquirinas e uma região C-terminal *SOCS Box* (Figura 3). O gene *ASB10* está localizado na região 7q36.1 (*locus* GLC1F) e possui 6 éxons entre os quais os éxons 2 e 3 codificam a região de repetição de anquirinas e o éxon 5 codifica a região *SOCS Box* da proteína (Figura 4) (Pasutto et al., 2012).

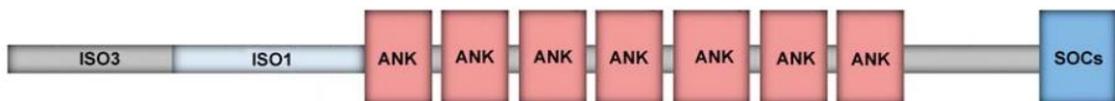


Figura 3. Representação esquemática dos domínios da proteína *ASB10*, mostrando 7 repetições de anquirinas e a região C-terminal SOCS Box (Modificado de Pasutto et al., 2012).

De acordo com a base de dados do Centro Nacional para Informação Biotecnológica (NCBI), o gene *ASB10* sofre *splicing* alternativo para formar três transcritos diferentes. A isoforma 1 (NM_001142459.1) é a maior, a isoforma 2 (NM_001142460.1) não possui o éxon 4 e a isoforma 3 (NM_080871.3) utiliza um exon alternativo 5' e codifica uma região N-terminal de menor tamanho (Pasutto et al., 2012).



Figura 4. Desenho esquemático da estrutura do Gene *ASB10*. Em vermelho está a ORF do gene. Em verde estão representados os íntrons e em preto regiões não traduzidas.

Com relação à expressão do gene *ASB10*, Pasutto et al. (2012) relataram que os maiores níveis de expressão encontravam-se na íris, com níveis moderados na malha trabecular, lâmina e nervo óptico, níveis baixos no corpo ciliar, retina e coróide e expressão mínima na lente ocular.

Para identificar a localização da proteína, Pasutto et al. (2012) através de análise imunohistoquímica, demonstraram que a proteína estava presente nas células da malha trabecular (MT), feixes externos da MT e região justacanalicular, além das células endoteliais das paredes interna e externa do canal de Schlemm.

1.14 Gene *ASB10*: Estudos populacionais

Para a identificação de variantes no gene, Pasutto et al. (2012) utilizaram pacientes de duas coortes diferentes: A primeira consistiu de pacientes do estado de Oregon, sendo 140 pacientes do *Kaiser Permanent Northwest* (Portland, OR, USA) e 55 do *Casey Eye Institute*, OHSU (Portland, OR, USA). Os pacientes possuíam idade entre 34 a 93 anos, com idade média de 72,5 +/- 11.5 anos. Dentre estes pacientes, 60% eram mulheres e 43% possuíam histórico familiar positivo para GPAA. O grupo controle consistiu de 85 indivíduos recrutados no *Casey Eye Institute* (Portland, OR, USA), sendo que destes, 62% eram mulheres. A idade dos indivíduos controle variou de 50 a 85 anos, com idade média de 70 +/- 10,3 anos. Todos os indivíduos do grupo controle foram examinados por um oftalmologista para determinar se estes não possuíam qualquer sinal de glaucoma, incluindo PIO > 21mmHg.

A segunda coorte de pacientes e controles consistiu de indivíduos de origem alemã. O grupo de pacientes consistiu de 977 indivíduos: 440 apresentaram GPAA com PIO > 21 mmHg, 52 GPAA-J e 485 GPN. Os 376 indivíduos controle foram recrutados na mesma região geográfica que os pacientes. Todos os indivíduos passaram por exames oftalmológicos no *University Eye Hospital* em Erlangen, Tübingen e Würzburg.

Ao todo, a idade dos pacientes variou de 14 a 96 anos, com idade média de 66,5 +/- 14,1 anos, sendo 61% mulheres e 37% apresentando histórico familiar positivo para glaucoma. A idade dos controles variou de 34 a 97 anos, com idade média de 72,1 +/- 6,9 anos, sendo 58,9% mulheres. A PIO apresentou variação entre 11 e 65 mmHg com média de 28,3 +/- 9,3 em pacientes com GPAA. Nos indivíduos controle e com GPN, a PIO foi < 21 mmHg com média de 19,2 +/- 2,1.

Após análises nas duas coortes, foram identificadas 30 substituições de aminoácidos na proteína *ASB10*, incluindo uma mutação do tipo *nonsense* (Tabela 3). Entre as 30 variantes, duas trocas de aminoácidos (previamente reportadas como SNPs) c.1069C>T (p.Arg357Cys) e c.1159C>A (p.Pro387Thr), foram observadas em pacientes e controles em frequência similar, sendo então excluídas de outras análises. Duas trocas de aminoácidos foram observadas apenas em controles: c.271G>T (p.Asp91Tyr) e c.470C>T (p.Ala157Val). Após a exclusão de variantes comuns, 26 trocas de aminoácidos foram identificadas em 70 pacientes, o que resulta em 6,0% (70 de 1171) do total de pacientes (Tabela 3). Em controles, foram identificadas 9 substituições de aminoácidos em 13 indivíduos, resultando em 2,8% (13 de 461) do total de controles, o que resulta em uma diferença significativa entre pacientes e controles. Além do mais, os autores identificaram 12 variantes sinônimas (Tabela 3). A variante c.765C>T (p.Thr255THR) identificada previamente em uma família no locus *GLCIF*, foi encontrada em um paciente da coorte alemã.

Fingert et al. (2012) realizaram uma busca por mutações no gene *ASB10*, através de PCR e sequenciamento, utilizando uma coorte de pacientes originários do estado de Iowa (USA). Foram avaliados neste estudo, 158 pacientes e 82 indivíduos controle. Foram identificadas 20 variantes das quais 11 eram não sinônimas, 5 sinônimas e 4 intrônicas. Das 11 variantes não sinônimas, 5 não haviam sido previamente reportadas no estudo realizado por Pasutto et al. (2012).

Dentre as 5 novas variantes encontradas, uma (Ala142Val) estava presente em 4 pacientes (2,5%), sendo apenas um homozigoto e não foi encontrada em indivíduos controle. Apesar do número de mutações encontradas, a análise estatística (χ^2) não mostrou

associação das variantes com o desenvolvimento de GPAA, tanto por meio de análise individual como pela análise em grupo (p-valor > 0.05).

Tabela 3. Mutações identificadas no gene *ASB10* (Modificado de Pasutto et al., 2012)

Exon	Alteração de base	db SNP	Substituição de aminoácido	Domínio Protéico	Coorte I (USA)		Coorte II (Alemanha)	
					Pacientes (n=195)	Controles (n=85)	Pacientes (n=977)	Controles (n=376)
Não Sinônimas								
1	c.55C>T	rs104886462	p.Pro19Ser	<i>N-Terminal</i>	1	0	5	0
1	c.94C>A		p.Arg32Ser	<i>N-Terminal</i>	1	0	0	0
1	c.116G>A		p.Arg39Gln	<i>N-Terminal</i>	1	0	0	0
1	c.143C>G		p.Thr48Ser*	<i>N-Terminal</i> *	0	0	1	0
1	c.194G>A		p.Gly65Glu*	<i>N-Terminal</i> *	1	0	0	0
1	c.199G>A		p.Val67Met*	<i>N-Terminal</i> *	0	0	1	0
1	c.215G>A		p.Arg72His*	<i>N-Terminal</i> *	0	1	10	0
1	c.263A>T		p.Asp88Val*	<i>N-Terminal</i> *	0	0	1	1
1	c.271G>T		p.Asp91Tyr*	<i>N-Terminal</i> *	0	1	0	0
1	c.281G>A		p.Arg94Gln*	<i>N-Terminal</i> *	0	0	1	0
1	c.291T>A		p.Arg97Glu*	<i>N-Terminal</i> *	0	0	1	0
2	c.470C>T		p.Ala157Val	<i>Ankyrin</i>	0	0	0	1
2	c.502C>T		p.Arg168Cys	<i>Ankyrin</i>	0	0	1	0
2	c.519C>A		Cys173X	<i>Ankyrin</i>	0	0	1	0
2	c.520C>T	rs104886472	p.Arg174Trp	<i>Ankyrin</i>	2	0	1	1
3	c.545C>T		p.Ala182Val	<i>Ankyrin</i>	0	0	1	0
3	c.574G>C	rs104886474	p.Val192Leu	<i>Ankyrin</i>	1	0	5	0
3	c.664C>G	rs61735708	p.Arg222Gly	<i>Ankyrin</i>	2	1	10	3
3	c.770G>A		p.Arg157His	<i>Ankyrin</i>	0	0	1	0
3	c.839A>T		p.Gln180Leu	<i>Ankyrin</i>	0	0	1	0
3	c.865C>T	rs104886480	p.Arg289Cys	<i>Ankyrin</i>	3	0	6	2
3	c.913G>A		p.Ala305Thr	<i>Ankyrin</i>	0	0	1	0
3	c.941C>T	rs104886481	p.Thr314Met	<i>Ankyrin</i>	0	1	1	0
3	c.951C>G		p.His317Gln	<i>Ankyrin</i>	1	0	0	0
3	c.1021C>T		p.His341Tyr	<i>Ankyrin</i>	0	0	1	0
3	c.1034G>A		p.Arg345His	<i>Ankyrin</i>	0	0	2	0
4	c.1069C>T	rs62489646	p.Arg357Cys	<i>ND</i>	23	9	23	19
4	c.1159C>A	rs919533	p.Pro387Thr	<i>ND</i>	13	4	24	16
5	c.1273A>G	rs104886487	p.Ser425Gly	<i>SOCS box</i>	1	0	0	0
5	c.1312C>T	rs3800791	p.Arg438Cys	<i>SOCS box</i>	0	1	4	0
Sinônimas								
1	c.204G>A	rs104886469	p.Pro68Pro	<i>N-Terminal</i>	0	0	1	2
1	c.105T>G		p.Ser35Ser*	<i>N-Terminal</i> *	0	0	1	0
1	c.204C>G		p.Gly68Gly*	<i>N-Terminal</i> *	0	0	1	0
1	c.225G>A		p.Ala75Ala*	<i>N-Terminal</i> *	0	0	1	0
3	c.583C>A		p.Arg195Arg	<i>Ankyrin</i>	0	0	1	0
3	c.669G>A	rs104886475	p.Gly223Gly	<i>Ankyrin</i>	0	0	2	0
3	c.753C>T	rs61743170	p.Ala251Ala	<i>Ankyrin</i>	22	9	29	5
3	c.765C>T	rs104886478	p.Thr255Thr	<i>Ankyrin</i>	0	0	1	0
3	c.825G>C~	rs2253592	p.Ala275Ala	<i>Ankyrin</i>	88/31	39/12	460/134	215/33
3	c.981C>T	rs61734407	p.Leu327Leu	<i>Ankyrin</i>	0	0	5	2
3	c.1047G>T		p.Gly349Gly	<i>ND</i>	0	0	1	0
5	c.1227G>A		p.Ser409Ser	<i>SOCS box</i>	6	2	20	4

1.15 Família de proteínas ASB: Estrutura

Dentre a superfamília de proteínas *SOCS box-containing*, a maior delas é a das proteínas *Ankyrin repeat* e *SOCS box containing* (Asbs; ASBs em humanos). Apesar de 18 membros da família Asb terem sido identificados em ratos e humanos, estas ainda não possuem função claramente definida (Kile et al., 2002).

Todas as proteínas Asb possuem dois domínios funcionais, sendo uma região *SOCS box* C-terminal de aproximadamente 40 aminoácidos e uma região à montante denominada *ankyrin repeat* (Kile et al., 2002). A região *ankyrin repeat* direciona especificamente a interação proteína-proteína enquanto que a região *SOCS box* funciona como um adaptador para mediar a degradação de proteínas alvo da região *ankyrin repeat* (Wilcox et al., 2004; Kohroki et al., 2005; Debrincat et al., 2007). As 18 proteínas Asb variam em número de repetições de anquirinas e contêm outras novas regiões, correspondentes a diferentes proteínas alvo com as quais elas interagem (Kile et al., 2000).

1.16 Região SOCS Box: Estrutura e função

A região *SOCS box* das proteínas Asb possuem dois sub-domínios: um *box BC* e um *box Cul2/Cul5*. A sequência de aminoácidos altamente conservada dos *box BC* e *Cul5*, essenciais para garantir que a interação com elonguinas B/C e *Cullin5-Rbx2* formem o complexo ubiquitina (Ub) E3 ligase, são importantes para uma via de proteólise mediada por ubiquitinação (Kamura et al., 1998; Nicholson et al., 1999; Chung et al., 2005; Heuze et al., 2005; Kohroki et al., 2005).

A região *SOCS box* foi primariamente identificada nas proteínas SOCS (*Supressors of Citokine Signaling*) e desde então foi encontrada em mais de 50 proteínas através de uma gama de espécies. Essas proteínas foram subdivididas em nove famílias diferentes, baseado

no domínio ou sítio que possuem na região à montante da região *SOCS box* e incluem: oito proteínas SOCS, 18 proteínas Asb (*ankyrin repeat* e *SOCS box containing*), quatro SSBs (*SPRY-domain proteins with a SOCS box*) e duas WSBs (*WD40 repeat proteins with a SOCS box*) (Hilton et al., 1998; Kile et al., 2002).

A *SOCS box* de várias dessas famílias se liga à Elonguina C, que por sua vez se associa à um complexo que consiste de Elonguina B, um membro da família *cullin* (Cullin-2 ou Cullin-5) e uma proteína *RING finger* denominada Roc1 ou Rbx1 (Zhang et al., 1999; Kamura et al., 2001; Kile et al., 2002). Este complexo protéico constitui uma ubiquitina E3 ligase denominada ECS (*Elongin C-cullin-SOCS box*) que, juntamente com uma enzima ubiquitina de ativação (E1) e uma enzima ubiquitina de conjugação (E2), facilitam a poliubiquitinação e degradação proteossômica de proteínas ligadas, regulando então os níveis proteicos dentro da célula (De Sepulveda, Ilangumaran, Rottapel, 2000; Kamizono et al., 2001). Outros estudos sugerem um papel adicional para a *SOCS box*, em particular que a interação *SOCS box*-Elongin B/C possa agir estabilizando as proteínas SOCS, protegendo-as contra a degradação (Kamura et al., 1998; Kaelin, 2002; Haan et al., 2003).

1.17 Região *Ankyrin Repeat*: Estrutura e função

A ocorrência mais comum de repetições é a repetição *ankyrin repeat*, um sítio que possui uma sequência de 33 resíduos de aminoácidos encontrada em proteínas com diversas funções, como iniciadores de transcrição, reguladores do ciclo celular, manutenção da integridade do citoesqueleto, transporte de íons e sinalização célula-célula (Bork, 1993). As *ankyrin repeats* foram primariamente identificadas como sítios de sequências repetidas em dois fatores de transcrição – *yeast Swi6/Cdc10* e *Drosophila Notch* (Breedon & Nasmith, 1987) – e adquiriram tal nome quando foi descoberto que a proteína do citoesqueleto

ankyrin possui 24 de tais repetições (Lux, John, Bennet, 1990). De todas as *ankyrin repeats* que foram caracterizadas, um traço unificador é que todas possuem função na mediação de interações específicas proteína-proteína. De fato, não foi detectada nenhuma função enzimática para qualquer domínio *ankyrin repeat* (Mosavi et al., 2004).

A região *ankyrin repeat* possui uma estrutura bem definida. Com exceção de inserções encontradas principalmente em regiões de *loop*, este sítio raramente foge do padrão de dobra hélice-*loop*-hélice- β -*hairpin/loop*. As hélices são arranjadas de maneira anti-paralela seguida por uma região de *loop* que aponta para o exterior em um ângulo aproximado de 90° e forma um β -*hairpin* em algumas estruturas conhecidas *ankyrin repeat*. A hélice de uma repetição se dobra contra a hélice da repetição adjacente, enquanto que a região β -*hairpin/loop* em alguns casos, forma uma folha β contínua. A interface entre repetições consiste principalmente de interações hidrofóbicas estabilizando a hélice em adição a uma rede de ligações de hidrogênio conectando a região β -*hairpin/loop*. A hélice externa possui um tamanho de nove resíduos, compreendendo o intervalo entre as posições 15 – 24 da sequência canônica, enquanto que a hélice interna possui tamanho de sete resíduos, estendendo-se da posição 5 até 12. A pilha geral exibe uma pequena curvatura resultante da diferença no tamanho das hélices assim como as interações entre as regiões inter-repetição entre as duas hélices. Próximo à menor volta da estrutura hélice-*loop*-hélice, a presença de uma pequena cadeia lateral de resíduos na posição 10 permite que as menores hélices internas se empacotem de maneira mais próxima uma contra a outra enquanto que as hélices externas são mais espaçadas uma da outra devido ao tamanho médio dos resíduos nas posições 17 e 18. Próximo à junção β -*hairpin/loop*, as posições 6, 21 e 22 tipicamente contêm resíduos com longas cadeias laterais, como a leucina. Cada repetição é rotacionada

2-3° no sentido anti-horário em relação à repetição que a precede e contribui com aproximadamente 13° no giro da molécula (Michaely et al., 2002). Um giro completo da molécula requer 32 repetições e possui um raio de 35 Å (Michel et al., 2001).

1.18 Funções das proteínas ASB

Uma pequena fração das proteínas ASB foram associadas a diferentes processos biológicos, porém, grande parte destas proteínas, ainda permanece sem função definida; a Asb-2 possivelmente tem papel na regulação da proliferação e/ou diferenciação de células mielóides (Kohroki et al., 2001; Guibal et al., 2002), a ASB-5 têm um possível papel no início do processo de arteriogênese (Boengler et al., 2003), a ASB-11 pode ter um papel na regulação da proliferação e diferenciação do sistema nervoso em desenvolvimento (Diks et al., 2006), enquanto que a ASB-15 foi reportada como tendo papel na regulação do crescimento muscular, agindo como regulador negativo da proliferação de células musculares e aumentando a taxa de síntese protéica em mioblastos diferenciados (McDanel, Hancock, Moody, 2004; McDanel, Hannon, Moody, 2006). A ASB-8 foi associada ao câncer, com sua expressão indetectável em tecidos pulmonares de adultos saudáveis, mas esteve presente em várias linhagens de células de carcinoma pulmonar. A transfecção de uma possível forma dominante negativa da ASB-8 (ASB-8 humana com ausência da região *SOCS box*) *in vitro*, causou supressão de células de adenocarcinoma de pulmão, implicando na associação da ASB-8 com o desenvolvimento de câncer pulmonar (Liu et al., 2003). A função da ASB-1 foi estudada utilizando ratos geneticamente modificados. Apesar de ratos *knockout* para a ASB-1 apresentarem algumas anomalias testiculares, foi concluído que a deleção ou super-expressão da ASB-1 não possui efeito óbvio no desenvolvimento do rato (Kile et al., 2001). Para a ASB-6, foi observada interação

com a proteína adaptadora APS, que se liga ao receptor da insulina e a componentes da via de transporte de glicose. Seguindo um estímulo prolongado de insulina, a APS estava degradada quando havia uma super-expressão de ASB-6 (Wilcox et al., 2004).

Debrincat et al (2009) demonstraram que a creatina kinase B (CKB) interage com a ASB-9 de uma maneira independente da *SOCS box*. Essa interação aumenta a poliubiquitinação de CKB, o que causa diminuição dos níveis de CKB dentro da célula.

Até o momento, não existe na literatura artigos relacionados à expressão ou função da *ASB10*. Tanto a interação com proteína(s) como a função da *ASB10* ainda necessitam ser elucidadas (Pasutto et al., 2012). Kile et al (2001) demonstraram que em camundongos deficientes de *ASB1*, o mRNA do gene *ASB10* estava presente no coração e músculo esquelético.

Outros estudos propõem que as proteínas ASB possuem papel análogo ao das proteínas SOCS, regulando várias vias de sinalização através de uma interação entre o sítio *SOCS box* e o complexo Elonguina B/C para iniciar a ubiquitinação e degradação proteossômica de proteínas ligadas à região *ankyrin repeat* (Heuze et al., 2005).

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

O gene *ASB10* foi descrito como associado ao GPAA em 2012, porém, ainda é necessário saber se suas variantes alélicas exercem uma maior influência no desenvolvimento da doença ou se atuam como alelos modificadores, ou seja, alelos que aumentam a susceptibilidade ao desenvolvimento da doença.

Inicialmente mapeado em uma população européia, dados de outras populações, incluindo a brasileira ainda não estão disponíveis. Por ser uma descoberta recente, existem até o momento apenas dois artigos publicados sobre o gene (Fingert et al., 2012; Pasutto et al., 2012). Um estudo avaliando aspectos estruturais de um novo gene associado ao GPAA, como o gene *ASB10*, poderia auxiliar na melhor compreensão das bases genéticas do glaucoma, particularmente na população brasileira.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Gerais

Avaliar alterações na sequência do gene *ASB10* em pacientes que apresentam GPAA com o intuito de melhor compreender as bases moleculares da doença.

3.2 Específicos

1. Avaliar a presença de mutações, no gene *ASB10*, em pacientes portadores de GPAA, por meio das técnicas de PCR e sequenciamento.

2. Avaliar a associação entre eventuais alterações estruturais e a presença do GPAA, bem como com características clínicas da doença.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

4. CASUÍSTICA E METODOLOGIA

4.1 Casuística

4.1.1 Recrutamento De Pacientes Com GPAA (Grupo De Estudo)

Neste estudo, uma amostra aleatória de 100 pacientes portadores de GPAA proveniente do Serviço de Glaucoma do Ambulatório de Oftalmologia do Hospital das Clínicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) foi incluída no estudo.

O protocolo de pesquisa segue os princípios enunciados na Declaração de Helsinque, assim como as determinações do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP. Os pacientes selecionados para o estudo foram informados sobre os objetivos e métodos da pesquisa, podendo ou não aceitar participar da mesma, sem constrangimento ou modificação de sua assistência médica. O projeto possui aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (Anexo I). Todos os indivíduos participantes do estudo assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo II).

4.1.2 Critérios De Inclusão

Foram incluídos no estudo, 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 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

$p < 5\%$, sendo que um deles com $p < 1\%$ pertencentes ao gráfico de probabilidades do “pattern deviation”; “corrected pattern standard deviation” com $p < 5\%$ e “glaucoma hemifield test” apresentando o resultado “borderline” ou “outside normal limits”.

4.1.3 Critérios De Exclusão

Foram excluídos do estudo pacientes que apresentaram alterações de segmento anterior compatíveis com glaucomas secundários (ou de desenvolvimento) e/ou alterações de disco óptico e campo visual que mimetizem lesões glaucomatosas.

4.1.4 Grupo Controle

O grupo controle foi composto por 100 indivíduos atendidos no Ambulatório de Oftalmologia do Hospital das Clínicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) que não apresentaram nenhuma forma de glaucoma. Os indivíduos pertencentes a este grupo apresentaram idade superior a 60 anos, ausência de antecedente familiar de glaucoma ou cegueira ocular de causa desconhecida, PIOs menores do que 15 mmHg e escavações do disco óptico menores do que 0,4.

4.2 Métodos

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

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

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

4.2.2 Gonioscopia: avaliação do ângulo

A gonioscopia é o exame que avalia a amplitude e as características do seio camerular, ou seja, o ângulo formado entre a face anterior da íris e o endotélio da córnea. Nesta região do olho encontram-se as estruturas que formam o sistema de drenagem do humor aquoso. O exame gonioscópico é fundamental para diferenciar os glaucomas de ângulo aberto dos glaucomas de ângulo fechado. Os tecidos observáveis à gonioscopia em um seio camerular aberto e normal são a linha de Schwalbe, o trabeculado pigmentado, o esporão escleral, a sombra do músculo ciliar e a raiz da íris (Allingham et al., 2005).

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

4.2.3 Fundoscopia: avaliação do disco óptico (relação escavação/disco)

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

padrão normal.

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

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

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

4.3 Extração do DNA

Foram colhidos de 6 - 18 mL de sangue periférico de todos os indivíduos submetidos ao estudo, em frasco estéril VACUETTE® 6 mL, contendo EDTA 10% como anticoagulante. A extração de DNA genômico procedeu segundo a metodologia fenol/clorofórmio, cujo protocolo está descrito em Maniatis (1982).

4.4 Quantificação e verificação da integridade do DNA genômico

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

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

A amostra foi aplicada no gel juntamente com tampão de corrida (0,25% de azul de bromofenol; 50% glicose) na razão de 3:1. As condições de eletroforese variaram entre 95 e 110 V. O marcador de peso molecular utilizado foi o DNA ladder de 100 pb (Invitrogen Corporation, Calrsbad, CA, EUA), em concentração de 0,15 µg/µL. Após a eletroforese, o gel foi visualizado e fotografado em transluminador de luz ultravioleta com câmera integrada (Molecular Imaging, L-PIX, Loccus Biotecnologia, São Paulo, SP, Brasil).

4.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR para todos os éxons foi padronizada utilizando-se os seguintes reagentes, no mínimo: 20 pmol de cada primer sense e anti-sense para cada região determinada a partir da sequência do gene *ASB10*, (NM_080871.3 para isoforma 3 e NM_001142459.1 para isoforma 1), tampão da enzima 1X (Tampão 10X: Tris-HCl 200 mM, pH 8,4, KCl 50 mM), MgCl₂ 50 mM, 10 pmol de cada desoxinucleotídeo (dNTP) e 0,5 unidade de Taq DNA polimerase (Invitrogen TM Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), somados a 40 - 100 ng de DNA genômico. O volume final de reação de 25µl foi completado com H₂O

Mili-Q.

A seguir as amostras foram amplificadas por meio de aparelho termociclador Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystem-Applera Corporation, Foster City, CA, EUA).

As condições de amplificação foram as mesmas para todos os éxons, com exceção das temperaturas de anelamento que encontram-se especificadas na Tabela 4: desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos a 94 °C por 1 minuto, anelamento dos iniciadores em temperaturas específicas para cada região por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto, finalizando com extensão adicional a 72 °C por 7 minutos. Finalmente, os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo e examinados sob luz ultravioleta (UV).

Os *primers* foram desenhados utilizando-se o programa Primer3, disponível em: <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>, juntamente com o programa GeneRunner[®] (Hasting Software, Inc.) (Tabela 4).

No caso dos éxons 4 e 5, devido ao pequeno tamanho dos mesmos e também ao pequeno tamanho da região intrônica entre eles, foi possível o desenho de apenas um par de *primers* abrangendo ambos os éxons.

Tabela 4: Sequências dos primers Sense (S) e anti-sense (AS) com suas respectivas temperaturas de anelamento (TA) e tamanho do fragmento gerado pela amplificação.

ÉXON	SEQUÊNCIAS DOS PRIMERS (5'-3')	PRODUTO (pb)	TA (°C)
Éxon 1	S – TTCCTTTAATGCCGAGATG AS – AGGGGGTGTCTGTCATCGAG	397	64.5
Éxon 2	S – GGGATTTCCGCTTCAACATC AS – GGCTTGGAAGTAATTGCAC	600	60
Éxon 3	S - GCCAGGATGACCAGTGATG AS - TGAAAGACAGACAGAAGGAACC	772	60
Éxons 4 e 5	S – TTCATAGGTACAGGGGGATAGG AS - TGGACATCTGGAAGGAGAGG	849	63

4.6 Reação de sequenciamento

Após confirmação da amplificação, o produto da PCR foi purificado utilizando-se os seguintes reagentes: 5,0 µl do produto de PCR e 2,0 µl da mistura de enzimas exonuclease I e fosfatase alcalina de camarão “ExoSAP-IT” (Amersham Life Sciences, Uppsala, Sweden). As amostras foram levadas ao aparelho termociclador por 15 minutos a 37°C e 15 minutos a 80°C para inativação da enzima.

A reação de sequenciamento foi realizada segundo a metodologia de Sanger et al. (1975), utilizando para um volume final de reação de 10 µL: 1µL do produto purificado, 0,5 µL de “Big Dye Terminator Ready Reaction v3.0” (*ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit*, Applied Biosystems Foster City, CA, USA), 2µL do tampão de sequenciamento 5X (Applied Biosystems Foster City, CA, USA) e 1µl de um dos iniciadores à 5 pmol (“sense” ou “antisense”) utilizados na PCR, sendo o volume final completado com 5,5µl água Milli-Q. As condições das reações de sequenciamento foram: 25 ciclos a 96°C por 15 segundos, 56°C por 15 segundos e 60°C por 4 minutos.

Após a reação de sequenciamento as amostras foram submetidas a uma nova purificação para a eliminação de nucleotídeos não incorporados: inicialmente, foram

adicionados 80 µL de etanol 80% e as amostras centrifugadas a 4000 rpm por 45 minutos. O sobrenadante foi descartado, seguido da adição de 150 µl de etanol 70%. Uma nova centrifugação foi realizada, desta vez por 10 minutos a 4000 rpm. Para finalizar, o sobrenadante foi descartado e as amostras foram submetidas a secagem em termociclador por 3 minutos a 64 °C e armazenadas a -20 °C. O produto da reação de sequenciamento purificado foi ressuspendido em 10 µL de Formamida *Hi-Di* (Applied Biosystem-Applera Corporation, Foster City, CA, EUA), sendo em seguida vigorosamente agitado e posteriormente desnaturado a 94 °C por 5 minutos. As leituras das sequências de bases nitrogenadas dos fragmentos foram realizadas em sequenciador automático ABI PRISM 3730XL ou ABI PRISM 3130 DNA *Analyzers* (Applied Biosystem-Applera Corporation, Foster City, CA, EUA).

As sequências obtidas foram analisadas com o auxílio do programa FinchTV (Geospiza) e para confirmação da região genômica analisada, as sequências foram submetidas a buscas por similaridade, utilizando-se o “algoritmo de buscas” *Blast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

4.7 Análise estatística

Para variáveis quantitativas foi utilizado o teste T de Student não pareado e para variáveis qualitativas, o teste qui-quadrado ou o teste exato de Fisher. Foram considerados estatisticamente significantes valores de p inferiores a 0,05. A coorte de indivíduos GPAA (n = 100) e indivíduos controles (n = 100) possui um poder de 80% para detectar diferenças em um nível de significância de $\alpha = 0.05$ quando a frequência de mutações é de 0.1% e no grupo GPAA é maior que 8%. O poder amostral foi calculado utilizando-se a calculadora OpenEPI (www.openepi.com).

4.8 Avaliação *in silico* de mutações “missense”

Para se avaliar o impacto das mutações do tipo “missense” na função e estrutura protéica, foram utilizadas as ferramentas SIFT (<http://sift.jcvi.org/>) e PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>). Para que haja uma classificação da variante como neutra ou relacionada à doença, foi utilizada a ferramenta SNPs&GO (<http://snps.biofold.org/snps-and-go/index.html>).

RESULTADOS

5. RESULTADOS

A análise dos sequenciamentos permitiu a identificação de 13 variantes diferentes, destas 8 (61,5%) foram do tipo “missense” e 5 (38,5%) do tipo sinônimas. Quatro variantes (G68D, A75E, Q164R e E380E) não foram previamente descritas por Pasutto et al. (2012) ou Fingert et al. (2012) (Figura 5). As variantes 203 G>A e 491 A>G foram observadas apenas no grupo controle. Os resultados encontram-se descritos na Tabela 5. Não foi possível observar diferença estatisticamente significativa quando comparamos cada variante separada entre casos e controles.

A realização da análise estatística pelo teste de chi-quadrado não evidenciou associação significativa entre a presença de variantes não sinônimas no gene *ASB10* e o desenvolvimento do GPAA, mesmo quando comparando cada variante entre casos e controles (Tabela 5), uma vez que a distribuição destas variantes mostra-se equilibrada entre os grupos controle e estudo ($p = 0.3377$) (Tabela 6).

Além disso, observou-se que 9% dos indivíduos pertencentes ao grupo GPAA apresentaram as mutações 753 C>T e 825 G>C concomitantemente, enquanto que no grupo controle, a frequência destas variantes foi de 3%. Apenas um indivíduo pertencente ao grupo GPAA apresentou concomitantemente as variantes 664 C>G e 825 G>C. A mutação sinônima Thr255Thr reportada no trabalho de Pasutto et al (2012) como sendo causadora de GPAA não foi encontrada em nenhum dos indivíduos de nossa coorte. Os sequenciamentos das variantes descritas pela primeira vez na literatura estão dispostos na Figura 5.

Tabela 5. Variações no gene *ASB10* observadas no grupo GPAA e no grupo controle. A referência para a sequência do gene *ASB10* para a isoforma 3 é NM_080871.3; variantes sinalizadas com * referem-se à isoforma 1: NM_001142459.1; ND = Não determinado; # = Variantes que estão sendo descritas pela primeira vez; AA = Troca de Aminoácido; DP = Domínio protéico.

Exon	Variação	Casos (%) (n=100)	Controles (%) (n=100)	Total (%) (n=200)	AA	DP	P-valor
<i>Não-sinônimas</i>							
1	203 G -> A*	0	1	1 (0.5)	G68D#*	<i>N-terminal*</i>	>0.99
1	224 C -> A*	2	0	2 (1)	A75E#*	<i>N-terminal*</i>	0.4976
2	425 C -> T	3	2	5 (2.5)	A142V	<i>Ankyrin</i>	>0.99
2	491 A -> G	0	2	2 (1)	Q164R#	<i>Ankyrin</i>	0.4976
3	664 C -> G	1	0	1 (0.5)	R222G	<i>Ankyrin</i>	>0.99
4	1069 C -> T	1	2	3 (1.5)	R357C	<i>ND</i>	>0.99
4	1159 C -> A	2	0	2 (1)	P387T	<i>ND</i>	0.4976
5	1312 C -> T	2	0	2 (1)	R438C	<i>SOCS box</i>	0.4976
<i>Sinônimas</i>							
2	405 C-> T	1	0	1 (0.5)	T135T	<i>Ankyrin</i>	>0.99
3	753 C -> T	10	3	13 (6.5)	A251A	<i>Ankyrin</i>	0.084
3	825 G -> C	48	62	110 (55)	A275A	<i>Ankyrin</i>	0.2881
4	1140 G -> A	6	2	8 (4)	E380E#	<i>ND</i>	0.2802
5	1227 G-> A	2	0	2 (1)	S409S	<i>SOCS box</i>	0.4976

Tabela 6. Porcentagem de mutações presentes no gene *ASB10* (ASB10+) e ausentes (ASB10-) em pacientes e controles.

	CASOS (%)	CONTROLES (%)	TOTAL
ASB10 ⁺	11	7	18
ASB10 ⁻	89	93	182
TOTAL	100	100	200

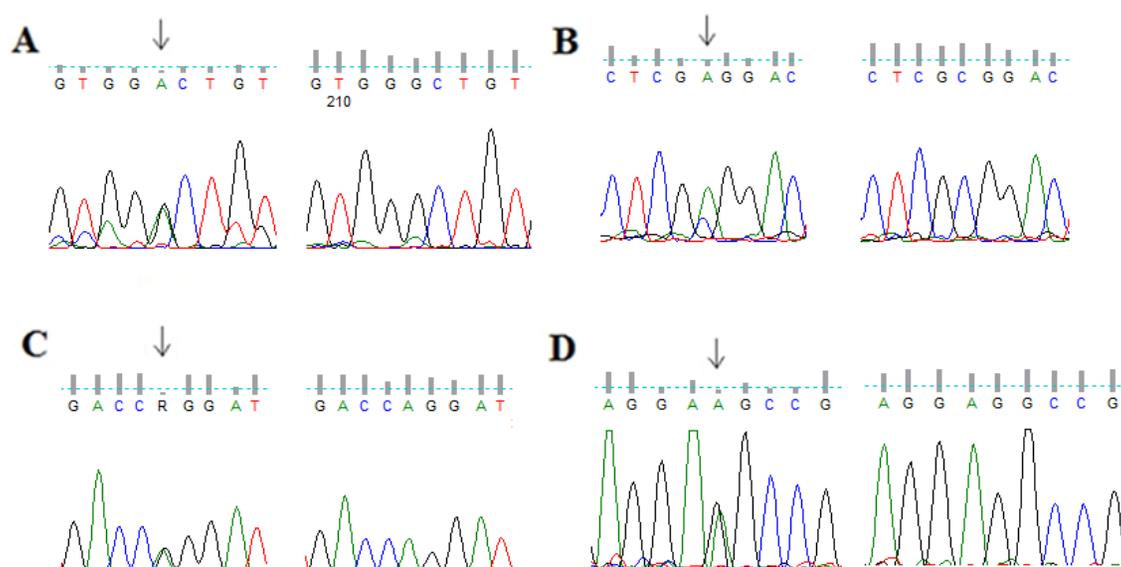


Figura 5: Cromatogramas das quatro novas variantes observadas no gene *ASB10*. A base alterada esta indicada pela seta. À direita de cada cromatograma alterado encontra-se o cromatograma selvagem. Em A. G68D (GGC > GAC); B. A75E (GCG > GAG); C. Q164R (CAG > CGG); D. E380E (GAG > GAA).

Todas as variantes do tipo “missense” foram submetidas à avaliação *in silico* a fim de se avaliar possível efeito na função ou estrutura protéica.

A ferramenta SIFT prediz que a substituição de aminoácido é considerada danosa à função proteica se esta possuir *score* menor ou igual à 0,05, ao passo que *scores* acima deste são considerados toleráveis. A avaliação das mutações “missense” encontradas mostra que estas não possuem maior influência em alterar a função da proteína (Tabela 7).

Tabela 7: Avaliação dos efeitos das mutações “missense” na função protéica, por meio da ferramenta SIFT.

Protein ID (Ensembl)	Posição	W.T	Mutante	Predição	SIFT Score
ENSP00000391137 [#]	68	G	D	TOLERADO	0.99
ENSP00000391137 [#]	75	A	E	TOLERADO	0.23
ENSP00000367098	142	A	V	TOLERADO	0.52
ENSP00000367098 [#]	164	Q	R	TOLERADO	0.28
ENSP00000367098	222	R	G	TOLERADO	0.12
ENSP00000367098	357	R	C	TOLERADO	0.13
ENSP00000367098	387	P	T	TOLERADO	0.11
ENSP00000367098	438	R	C	TOLERADO	0.13

A ferramenta *PolyPhen-2* prediz o possível impacto da substituição de um aminoácido na função e na estrutura de uma proteína, classificando a alteração qualitativamente em: benigno, possivelmente danoso e provavelmente danoso. A predição da ferramenta *PolyPhen-2* mostra que a maioria das mutações “missense” não causam alteração em função ou estrutura da proteína, porém, observa-se que as variantes R357C e P387T parecem exercer alguma alteração na estrutura protéica (Tabela 8).

Tabela 8: Avaliação dos efeitos das mutações “missense” na função e estrutura protéica, por meio da ferramenta PolyPhen-2.

Alteração	Score	Predição
G68D [#]	0.234	Benigno
A75E [#]	0.378	Benigno
A142V	0.001	Benigno
Q164R [#]	0.043	Benigno
R222G	0.415	Benigno
R357C	0.492	Possivelmente Danoso
P387T	0.510	Possivelmente Danoso
R438C	0.001	Benigno

Estes resultados, em conjunto, mostram que as variáveis do tipo “missense” (G68D, A75E, Q164R) não causam qualquer dano à estrutura ou função da proteína *ASB10*. Vale observar que as variáveis G68D e Q164R foram encontradas apenas em indivíduos pertencentes ao grupo controle.

A ferramenta SNPs&GO avalia se determinada variante está ou não relacionada ao desenvolvimento de doenças. Todas as variantes do tipo “missense” foram submetidas à análise pela ferramenta SNPs&GO, sendo classificadas como neutras (Tabela 9).

Tabela 9: Predição dos efeitos das mutações “missense” no desenvolvimento de doenças pela ferramenta SNPs&GO.

Alteração	Score	Predição
G68D [#]	0.221	Neutra
A75E [#]	0.178	Neutra
A142V	0.108	Neutra
Q164R [#]	0.167	Neutra
R222G	0.157	Neutra
R357C	0.205	Neutra
P387T	0.070	Neutra
R438C	0.226	Neutra

Com relação às variáveis clínicas, não houve relação entre a presença de mutações do tipo “missense” e a presença de níveis elevados de PIO, sendo que todos os indivíduos do grupo GPAA apresentaram níveis de PIO igual ou abaixo de 28 mmHg (Tabela 10).

Tabela 10: Dados clínicos dos indivíduos pertencentes ao grupo GPAA que apresentaram variantes do tipo “missense”. PIO OD = pressão intra-ocular olho direito; PIO OE = pressão intra-ocular olho esquerdo; FO OD = Fundoscopia olho direito; FO OE = Fundoscopia olho esquerdo.

Polimorfismo	Idade	Sexo	PIO OD	PIO OE	FO OD	FO OE
224 C -> A	52	F	13	14	1	1
224 C -> A	69	F	23	26	0,8	0,9
425 C -> T	65	F	23	23	1,0	1,0
425 C -> T	72	F	21	15	0,8	0,8
425 C -> T	85	M	20	19	0,7	0,8
664 C -> G	77	M	23	23	1,0	1,0
1069 C -> T	62	M	23	21	0,7	0,6
1159 C -> A	68	M	19	18	0,9	RN
1159 C -> A	46	M	18	16	0,7	1,0
1312 C -> T	73	F	20	28	0,6	0,85
1312 C -> T	76	F	28	22	1,0	0,9

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Apesar de cinco genes identificados estarem associados ao GPAA (*MYOC*, *OPTN*, *WDR36*, *NTF4* e *ASB10*), outros doze *loci*, cujos genes não foram ainda definidos, já foram descritos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>). Uma das dificuldades na identificação de genes é a característica desta doença, que se desenvolve em idade avançada dificultando o acesso a famílias informativas para a análise de ligação, o padrão complexo de herança e a possível diversidade de fenótipos embutidos no grupo de pacientes com GPAA.

Recentemente Pasutto e cols (2012) reportaram que o *ASB10* é o gene responsável pelo desenvolvimento de glaucoma no *locus GLC1F* através da identificação de variantes não sinônimas. Estudos de expressão e cultura celular do segmento ocular anterior forneceram grande suporte para tal papel do *ASB10*. O ponto de partida do trabalho foi a identificação da mutação Thr255Thr que encontrava-se segregando em pacientes glaucomatosos de uma mesma família. Estudo subsequente do mesmo autor, observou a mesma variante em apenas 1 indivíduo (0.085%) de um total de 1172 pacientes e em nenhum dos 461 indivíduos dos grupos controle pertencentes às coortes de Oregon e da Alemanha.

Em 2012, Fingert e cols realizaram um estudo caso-controle buscando associação entre mutações no gene *ASB10* e o desenvolvimento de GPAA. Não foram encontradas associações significativas entre variantes no gene *ASB10* e a etiologia do GPAA. Em nenhum dos indivíduos participantes do estudo (n = 240) a mutação Thr255Thr reportada previamente por Pasutto e cols (2012) foi observada.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar se mutações no gene *ASB10* possuem qualquer associação com o desenvolvimento de GPAA na população brasileira. Entretanto,

neste estudo do tipo caso-controle, o teste de chi-quadrado não mostrou evidência entre a presença de mutações no gene *ASB10* e o desenvolvimento da doença na nossa amostra da população brasileira ($p > 0,05$). Os resultados estão em concordância com os apresentados por Fingert e cols (2012). É importante salientar que o tamanho da amostra de nosso estudo não é grande o bastante para detectar pequenas diferenças entre os grupos caso e controle. Realizando-se a análise de cada variante dentro de cada grupo, não foi possível observar diferença significativa entre os grupos (Tabela 5).

Neste estudo, a mutação Thr255Thr também não foi observada em nenhum indivíduo pertencente a ambos os grupos. Estes resultados, juntamente com os dados dos estudos anteriores sugerem que a variante Thr255Thr seja rara entre pacientes com GPAA.

Uma comparação entre o estudo realizado por Pasutto e cols (2012) e o estudo realizado por Fingert e cols (2012) mostra que no primeiro, a análise estatística revelou uma frequência significativamente mais alta de mutações no grupo de pacientes do que no grupo controle, enquanto que o segundo estudo mostrou que variantes não sinônimas no gene *ASB10* estavam presentes na mesma frequência em pacientes e em controles. Esta diferença entre os estudos, de acordo com Fingert e cols, se deve em parte a uma subestimação da frequência de variantes no *ASB10* nos indivíduos controle, devido à diferença de tamanho dos grupos estudo e controle e pela exclusão de variantes “missense” comuns do trabalho realizado por Pasutto.

Neste estudo, não foi totalmente conclusiva a influência do gene *ASB10* no desenvolvimento do GPAA e, na análise de variantes não sinônimas, independentemente do tipo de mutação, as alterações foram encontradas nas mesmas proporções entre o grupo de afetados e o grupo controle, o que é corroborado pelos dados descritos por Fingert.

Ainda sem dados de outras populações, estes três estudos em conjunto evidenciam que o gene *ASB10* possui pouca ou quase nenhuma influência no desenvolvimento do GPAA nas populações estudadas.

A variante mais frequentemente observada em nossa amostra, a A275A estava presente em quase 50% dos indivíduos pertencentes ao grupo GPAA e em 62% dos indivíduos pertencentes ao grupo controle. Fingert e cols (2012) observaram a frequência da mesma mutação em 41% no grupo GPAA e 31,7% no grupo controle, enquanto que Pasutto e cols (2012), na coorte americana, reportou 61,02% no grupo GPAA e 60% no grupo controle. Na coorte alemã a frequência observada foi de 60,79% no grupo GPAA e 65,95% no grupo controle. A análise destes resultados sugere que esta variante é comum entre diferentes populações e não possui influência na etiologia do GPAA.

As variantes do tipo “missense” A75E, R222G, P387T, R438C e as sinônimas, T135T e S409S, neste estudo, foram observadas apenas em indivíduos pertencentes ao grupo GPAA, todas com frequência de 1% ou 2%. Comparando-se as frequências destas variantes (Tabela 11) com as encontradas por Pasutto e cols e Fingert e cols, observa-se que em todas as populações estudadas, estas variantes são mais comumente encontradas nos indivíduos pertencentes ao grupo GPAA. Porém, para melhor confirmar estes dados neste estudo, seria de grande interesse verificar as frequências das mesmas em ambos os grupos utilizando um “n” maior em ambos os grupos, além de estudos funcionais e avaliação de segregação nas famílias portadoras.

Tabela 11: Frequências, em outros estudos, das variantes encontradas apenas nos indivíduos pertencentes ao grupo GPAA na amostra da população brasileira.

Variações	Presente estudo		Pasutto e cols		Fingert e cols	
	Casos	Controles	Casos	Controles	Casos	Controles
A75E	2	-	-	-	-	-
R222G	1	12	4	1	1	1
P387T	2	37	20	8	6	6
R438C	2	4	1	-	-	-
T135T	1	-	-	-	-	-
S409S	2	26	6	-	-	-

Com relação as outras variantes encontradas neste estudo, todas apresentaram a mesma frequência encontrada por Pasutto e cols e Fingert e cols, com exceção da variante R357C, cuja frequência (1%) só foi semelhante à encontrada na população alemã (2,3%). Sua frequência na população americana do trabalho realizado por Pasutto e cols foi de 11,8%, enquanto que no trabalho realizado por Fingert e cols foi de 13%.

A maioria das mutações não sinônimas encontradas no presente estudo estavam presentes na região *ankyrin repeat*, que é responsável por mediar a interação proteína-proteína. Em contraste, os resultados apresentados por Pasutto e cols (2012) mostraram que a maioria das mutações não sinônimas estavam localizadas na região ND. Para elucidar o papel destas mutações em relação ao desenvolvimento de glaucoma, é essencial a realização de estudos funcionais do gene *ASB10*.

Analisando o grupo controle, observamos a presença de 7% de polimorfismos não sinônimos, enquanto que Pasutto e cols (2012) reportaram uma frequência de 13,2% e Fingert e cols (2012) reportaram uma frequência de 18,3% de alterações não sinônimas em indivíduos do grupo controle. Comparando ao grupo GPAA, observamos uma frequência de 11% de mutações não sinônimas, Pasutto e cols (2012) 13% e Fingert e cols (2012)

26%. Entretanto, quando excluimos as mutações R357C e P387T, conforme realizado por ambos os autores, observamos frequência de 8% de mutações não sinônimas, Pasutto e cols (2012) 6% e Fingert e cols (2012) 8,2%. Juntos, estes resultados mostram que variações no gene *ASB10* são comuns entre populações. As limitações deste estudo estão relacionadas, principalmente, ao tamanho da amostra, que impede a detecção de diferenças de proporção maiores entre a presença de mutações no gene *ASB10* nos grupos controle e glaucoma. Talvez, em uma amostra maior fosse possível sugerir um aumento de suscetibilidade para o desenvolvimento de glaucoma entre os indivíduos com mutação no gene *ASB10*. Além disso, uma outra abordagem seria a avaliação do padrão de segregação familiar nos pacientes com glaucoma e mutação no gene *ASB10*, preferencialmente naquelas variantes observadas somente entre os pacientes com glaucoma. Estudos funcionais são necessários para se avaliar o impacto de cada mutação na função ou estrutura protéica, visto que uma única mutação pode causar alteração funcional que seja importante para o desenvolvimento do GPAA.

Para as mutações do tipo “missense” que estão sendo descritas pela primeira vez, foi realizada a avaliação *in silico* para determinar se as proteínas por elas codificadas são potencialmente causadoras do fenótipo do glaucoma. As ferramentas SIFT e *PolyPhen-2* mostraram que as 3 alterações (G68D, A75E e Q164R) não sugerem a qualquer tipo de alteração funcional ou estrutural na proteína. Porém, vale ressaltar que as variáveis G68D e Q164R foram observadas apenas em indivíduos pertencentes ao grupo controle. Com relação às variantes encontradas apenas na população brasileira, todas foram preditas como sendo benignas à estrutura ou função proteica, com exceção da variante P387T que foi classificada como possivelmente danosa à estrutura protéica pela ferramenta *PolyPhen-2*. A

variante R357C também foi predita como possivelmente danosa à estrutura protéica pela ferramenta *PolyPhen-2*. Um estudo funcional destas mutações poderia confirmar com mais exatidão a predição realizada. Além destas duas ferramentas, foi realizada também a predição pela ferramenta SNPs&GO, onde as variantes “missense” foram classificadas como neutras em relação ao desenvolvimento de doenças.

Neste estudo, apesar da identificação de 8 variáveis do tipo “missense”, não foi possível concluir que estas variações estão associadas com a etiologia do GPAA. Todos os pacientes pertencentes ao grupo GPAA que apresentaram estas variáveis, possuíam níveis de PIO abaixo de 28 mmHg, apesar de todos apresentarem a doença, o que pode ocorrer devido ao uso de medicações para controle da PIO.

A abordagem de avaliação *in silico* somada ao estudo de segregação familiar são necessárias para melhor elucidar a possível não associação destas mutações no gene *ASB10* com o GPAA, principalmente no que diz respeito à nova variante encontrada no presente trabalho. Apesar de não haver associação entre a variante A75E e níveis elevados de PIO, observamos que os pacientes portadores desta variante apresentavam função visual bem comprometida, de acordo com as variáveis clínicas (Tabela 10), sugerindo a necessidade de maiores estudos, não somente sobre a variante A75E, mas sobre todas as variantes que podem conferir maior susceptibilidade ao desenvolvimento do GPAA.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

- A presença de variáveis dos tipos sinônima e não-sinônima no gene *ASB10* foram identificadas em igual proporção entre indivíduos glaucomatosos e indivíduos saudáveis quanto comparadas em sua totalidade;
- Quando cada mutação foi comparada separadamente entre casos e controles, não foi observada diferença significativa entre os grupos;
- A partir dos dados apresentados neste estudo, não foi possível concluir se o gene *ASB10* está ou não associado à etiologia do GPAA na nossa amostra da população brasileira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS

ADAM, M. F. 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. v. 6, p. 2091-2097, 1997.

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

ALWARD, W. L. M. et al. Clinical features associated with mutations in the chromosome 1 open-angle glaucoma gene (GLC1A). **N. Engl. J. Med.** v. 338, p. 1022-1027, 1998.

ANDERSON, D. R. The development of the trabecular meshwork and its abnormality in primary infantile glaucoma. **Trans Am Ophthalmol Soc.** v. 79, p. 458-485, 1981.

AYALA-LUGO, R. M. et al. A novel mutations in TIGR/MYOC gene in a Colombian individual with juvenile glaucoma. **Arvo abstract book** (Annual Meeting – Fort Lauderdale, Florida – 5-10 de maio de 2002).

BAYAT, B., et al. Contributions of MYOC and CYP1B1 mutations to JOAG. **Mol Vis.** v. 14, p. 508-517, 2008.

BOENGLER, K. et al. The ankyrin repeat containing SOCS box protein 5: a novel protein associated with arteriogenesis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 302, p. 17-22, 2003.

BORK, P. Hundreds of ankyrin-like repeats in functionally diverse proteins: mobile modules that cross phyla horizontally? **Proteins.** v. 17, p. 363-374, 1993.

BREEDEN, L. & NASMYTH, K. Similarity between cell-cycle genes of budding yeast and fission yeast and the Notch gene of Drosophila. **Nature.** v. 329, p. 651-654, 1987.

CAIXETA-UMBELINO, C. et al. Lack of association between optineurin gene variants T34T, E50K, M98K, 691_692insAG and R545Q and primary open angle glaucoma in Brazilian patients. **Ophthalmic Genet.** v. 30, p. 13-18, 2009.

- CHEN, L. J., et al. Evaluation of NTF4 as a causative gene for primary open-angle glaucoma. **Mol Vis.** v. 18, p. 1763-1772, 2012. (Abstract).
- CHUNG, A. S. et al. Ankyrin repeat and SOCS box 3 (ASB3) mediates ubiquitination and degradation of tumor necrosis factor receptor II. **Mol Cell Biol.** v. 25, p. 4716-4726, 2005.
- DE SEPULVEDA, P.; ILANGUMARAN, S.; ROTTAPPEL, R. Suppressor of cytokine signaling-1 inhibits VAV function through protein degradation. **J. Biol. Chem.** v. 275, p. 14005-14008, 2000.
- DEBRINCAT, M. A. et al. Ankyrin repeat and suppressors of cytokine signaling box protein Asb-9 targets creatine kinase B for degradation. **J Biol Chem.** v. 282, p. 4728–4737, 2007.
- DIKS, S. H. et al. The novel gene asb11: a regulator of the size of the neural progenitor compartment. **J. Cell Biol.** v. 174, p. 581–592, 2006.
- FAN, B. J.; WIGGS, J. L. Glaucoma: Genes, phenotypes, and new directions for therapy. **J. Clin. Invest.** v. 120, p. 3064-3072, 2010.
- FAUCHER. M. et al. Founder mutations for glaucoma caused by TIGR/Myocilin in the Quebec population. **Arvo abstract book.** (Annual Meeting – Fort Lauderdale, Florida – 5-10 de maio de 2002).
- FINGERT, J. H. et al. Analysis of myocilin mutations in 1703 glaucoma patients from five different populations. **Hum. Mol. Genet.** v. 8, p. 899–905, 1999.
- FINGERT, J. H. et al. No association between variations in the WDR36 gene and primary open-angle glaucoma. **Arch ophthalmol.** v. 125, p. 434 – 436, 2007.
- FINGERT, J. H. et al. Analysis of ASB10 variants in open angle glaucoma. **Hum. Mol. Genet.** 2012.

- FOSTER, P. J. et al. The definition and classification of glaucoma in prevalence surveys. **Br J Ophthalmol.** v. 86, p. 238-242, 2002.
- FRASER, S. G. 2004. Epidemiology of primary open angle glaucoma. In: SHIELDS, M. B.; RITCH, R.; KRUPING, T. The glaucomas. *Glaucoma* ed. RA Hitchings, pp. 9–15. London: BMJ Publ. 2a. Ed; 1996.
- FREDETTE, M. et al. Screening for TIGR/MYOC mutations in glaucoma patients from Southern west Haiti. **Arvo abstract book** (Annual Meeting – Fort Lauderdale, Florida – 5-10 de maio de 2002).
- GUIBAL, F. C. et al. ASB-2 inhibits growth and promotes commitment in myeloid leukemia cells. **J. Biol. Chem.** v. 277, p. 218–224, 2002.
- HAAN, S. et al. Tyrosine phosphorylation disrupts elongin interaction and accelerates SOCS3 degradation. **J. Biol. Chem.** v. 278, p. 31972–31979, 2003.
- HEUZE, M. L. et al. ASB2 is an elongin BC-interacting protein that can assemble with Cullin 5 and Rbx1 to reconstitute an E3 ubiquitin ligase complex. **J Biol Chem.** v. 280, p. 5468-5474, 2005.
- HEWITT, A. W. et al. A glaucoma case-control study of the WDR36 gene D658G sequence variant. **Am J Ophthalmol.** v. 142, p. 324–325, 2006.
- HILTON, D. J., et al. Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** v. 95, p. 114–119, 1998.
- HITCHINGS R. A. Low-tension glaucoma – its place in modern glaucoma practice. **Br J Ophthalmol.** v. 76, p. 494-496, 1992.
- HITCHINGS, R. A.; ANDERSON, S. A. A comparative study of visual field defects seen in patients with low-tension glaucoma and chronic simple glaucoma. **Br J Ophthalmol.** v. 67, p. 818-821, 1983.

IWASE, A. et al. Kitazawa Y for the Tajimi Study Group, Japan Glaucoma Society. The prevalence of primary open-angle glaucoma in Japanese: the Tajimi Study.

Ophthalmology. v. 111, p. 1641-1648, 2004.

JOHNSON, A. T. et al. Clinical features and linkage analysis of a family with autosomal dominant juvenile glaucoma. **Ophthalmology.** v. 100, p. 524-529, 1993.

JOHNSON, A. T. et al. Clinical phenotype of juvenile-onset primary open-angle glaucoma linked to chromosome 1q. **Ophthalmology.** v. 103, p. 808-814, 1996.

KAELIN, W. G. Jr. Molecular basis of the VHL hereditary cancer syndrome. **Nat. Rev. Cancer** v. 2, p. 673–682, 2002.

KAMIZONO, S. et al. The SOCS box of SOCS-1 accelerates ubiquitin-dependent proteolysis of TEL-JAK2. **J. Biol. Chem.** v. 276, p. 12530–12538, 2001.

KAMURA, T. et al. The elongin BC complex interacts with the conserved SOCS-box motif present in members of the SOCS, ras, WD-40 repeat, and ankyrin repeat families. **Genes Dev.** v. 12, p. 3872-3881, 1998.

KAMURA, T. et al. Muf1, a novel Elongin BC-interacting leucine-rich repeat protein that can assemble with Cul5 and Rbx1 to reconstitute a ubiquitin ligase. **J. Biol. Chem.** v. 276, p. 29748–29753, 2001.

KARALI, A. et al. Localization of myocilin/trabecular meshwork—inducible glucocorticoid response protein in the human eye. **IOVS.** v. 41, p. 729–740, 2000.

KILE, B. T. et al. Cloning and characterization of the genes encoding the ankyrin repeat and SOCS box-containing proteins Asb-1, Asb-2, Asb-3 and Asb-4. **Gene.** v. 258, p. 31–41, 2000.

KILE, B. T. et al. Functional analysis of Asb-1 using genetic modification in mice. **Mol. Cell. Biol.** v. 21, p. 6189–6197, 2001.

KILE, B. T. et al. The SOCS box: a tale of destruction and degradation. **Trends Biochem Sci.** v. 27, p. 235-241, 2002.

KIMURA, R.; HONDA, M. Effect of orally administered hydrocortisone on the rate of aqueous flow in man. **Acta Ophthalmol.** v. 60, p. 584-589, 1982.

KOHROKI, J. et al. ATRA-regulated Asb-2 gene induced in differentiation of HL-60 leukemia cells. **FEBS Lett.** v. 505, p. 223–228, 2001.

KOHROKI, J. et al. ASB proteins interact with Cullin5 and Rbx2 to form E3 ubiquitin ligase complexes. **FEBS Letters.** v. 579, p. 6796–6802, 2005.

KUBOTA, R. et al. Novel mutations in the myocilin in Japanese glaucoma patients. **Hum. Mutat.** v. 16, p. 270, 2000.

LAM, D. S. C. et al. - Truncations in the TIGR gene in individuals with and without primary open-angle glaucoma. **IOVS.** v. 41, p. 1386-1391, 2000.

LESKE, M. C. The epidemiology of open-angle glaucoma: a review. **Am. J. Epidemiol.** v. 118, p. 166-191, 1983.

LIBBY, R. T. et al. Complex genetics of glaucoma susceptibility. **Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.** v. 6, p. 15-44, 2005.

LIU, Y. et al. Molecular cloning and characterization of the human ASB-8 gene encoding a novel member of ankyrin repeat and SOCS box containing protein family. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 300, p. 972–979, 2003.

LIU, Y. et al. No evidence of association of heterozygous NTF4 mutations in patients with primary open-angle glaucoma. **Am J Hum Genet.** v. 86, p. 498–499, 2010.

LUX, S. E.; JOHN, K. M.; BENNETT, M. Analysis of cDNA for human erythrocyte ankyrin indicates a repeated structure with homology to tissue-differentiation and cell-cycle control proteins. **Nature.** v. 344, p. 36-42, 1990.

- MANSERGH, F. C. et al. Novel mutations in the TIGR gene in early and late onset open angle glaucoma. **Hum. Mut.** v. 11, p. 244-251, 1998.
- MATAFTISI, A. et al. MYOC mutations frequency in primary open-angle glaucoma patients from Western Switzerland. **Ophthalmic. Genet.** v. 22, p. 225-231, 2001.
- MCDANELD, T. G.; HANCOCK, D. L.; MOODY, D. E. Altered mRNA abundance of ASB15 and four other genes in skeletal muscle following administration of beta-adrenergic receptor agonists. **Physiol. Genomics.** v. 16, p. 275–283, 2004.
- MCDANELD, T. G.; HANNON, K.; MOODY, D. E. Ankyrin repeat and SOCS box protein 15 regulates protein synthesis in skeletal muscle. **Am. J. Physiol.** v. 290, p. 1672–1682, 2006.
- MICHAELY, P. et al. Crystal structure of a 12 ANK repeat stack from human ankyrinR. **EMBO J.** v. 21, p. 6387–6396, 2002.
- MICHEL, F. et al. Crystal structure of the ankyrin repeat domain of Bcl-3: A unique member of the I κ B protein family. **EMBO J.** v. 20 p. 6180–6190, 2001.
- MICHELS-RAUTENSTRAUSS, K. G. et al. Juvenile open angle glaucoma: fine mapping of the TIGR gene to 1q24.3-q25.2 and mutation analysis. **Hum. Genet.** v. 102, p. 103-106, 1998.
- MONEMI, S. et al. Identification of a novel adult-onset primary open-angle glaucoma (POAG) gene on 5q22.1. **Hum Mol Genet.** v. 14, p. 725–733, 2005.
- MOSAVI, L. K. et al. The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. **Protein Science.** v. 13, p. 1435-1448, 2004.
- MUKHOPADHYAY, A. et al. Mutations in MYOC gene of Indian primary open-angle glaucoma patients. **Mol. Vis.** v. 15, p. 442-448, 2002.

NAUMANN, GOH.; SCHLÖTZER-SCHREHARDT, U.; KÜCHLE, M. Pseudoexfoliation syndrome for the comprehensive ophthalmologist. **Ophthalmology**. v. 105, p. 951-968, 1998.

NICHOLSON, S. E. et al Mutational analyses of the SOCS proteins suggest a dual domain requirement but distinct mechanisms for inhibition of LIF and IL-6 signal transduction. **EMBO J**. v. 18, p. 375-385, 1999.

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

OKU, Y. et al. Long axial length as risk factor for normal tension glaucoma. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol**. v. 247, p. 781-787, 2009.

PASUTTO, F. et al. Heterozygous NTF4 mutations impairing neurotrophin-4 signaling in patients with primary open-angle glaucoma. **Am J Hum Genet**. v. 85, p. 447-456, 2009.

PASUTTO, F. et al. Variants in ASB10 are associated with open-angle glaucoma. **Hum Mol Genet**. v. 21, p. 1336-1349, 2012.

PLÁSILOVÁ, M. et al. Identification of a single ancestral CYP1B1 mutation in Slovak Gypsies (Roms) affected with primary congenital glaucoma. **J Med Genet**. v. 36, p. 290-294, 1999.

PORTER, L. F. et al. Identification of a novel locus for autosomal dominant primary open angle glaucoma on 4q35.1-q35.2. **IOVS**. v. 52. p. 7859-7865, 2011.

QUIGLEY, H. A. Open-angle glaucoma. **N Engl J Med**. v. 328, p. 1097-1106, 1993.

QUILEY, H. A. Neuronal death in glaucoma. **Prog Retin Eye Res**. v. 18, p. 39-57, 1999.

QUIGLEY, H. A. Glaucoma. **Lancet**. v. 16, p. 1367-1377, 2011.

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

RAO, K. N. et al. Variations in NTF4, VAV2, and VAV3 genes are not involved with primary open-angle and primary angle-closure glaucomas in an Indian population. **IOVS**. v. 51, p. 4937–4941, 2010.

RAYMOND, V. Molecular genetics of the glaucomas: mapping of the first five “GLC” loci. **Am J Hum Genet**. v. 60, p. 296-304, 1997.

REZAIIE, T. et al. Adult-Onset Primary Open-Angle Glaucoma caused by Mutations in Optneurin. **Science**. v. 295, p. 1077-1079, 2002.

RICHTER, C. U.; RICHADSON, T. M.; GRANT, W. M. Pigmentary dispersion syndrome and pigmentar glaucoma. **Arch Ophthalmol**. v. 104, p. 211-215, 1986.

RITCH, R., LOWE, R. F. Angle-closure glaucoma: clinical types. In: RITCH, R., SHIELDS, M. B., KRUPIN, T. *The Glaucomas*. 2 ed. Saint Louis. Mosby-Year Book, 1996. v. 2. p.821-840.

SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T. *Molecular cloning: a laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor (NY). Cold Spring Harbor Press. 1989; 17-19.

SARFARAZI, M.; STOILOV, I. Molecular genetics of primary congenital glaucoma. **Eye**. v. 14, p. 422-428, 2000.

SARFARAZI, M.; STOILOV, I.; SCHENKMAN, J. B. Genetics and biochemistry of primary congenital glaucoma. **Ophthalmol Clin North Am**. v. 16, p. 543–554, 2003.

SEDGWICK, S. G. & SMERDON, S. J. The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. **Trends Biochem. Sci**. v. 24, p. 311–316, 1999.

SHIMIZU, S., et al. Age-dependent prevalence of mutations at the GLC1A locus in primary open-angle glaucoma. **Am. J. Ophthalmol**. v. 130, p. 165-177, 2000.

SHIOSE, Y. et al. Epidemiology of glaucoma in japan - a nationwide glaucoma survey. **Jpn. J. Ophthalmol**. v.133, p. 155, 1991.

SKUTA, G. L.; MORGAN, R. K. Corticosteroid-induced glaucoma. In: RITCH, R.; SHIELDS, M. B. KRUPIN, T. *The Glaucomas*. 2 ed. Saint Louis. Mosby-Year Book, 1996. v. 2, p. 1177-1188.

SOMMER, A. et al. Racial differences in the cause-specific prevalence of blindness in east Baltimore. **N. Engl. J. Med.** v. 325, p. 1412-1417, 1991.

SPAETH, G. L. Glaucoma apoptosis, death, and life. **Acta Ophthalmol Scand.** p. 9-19, 1998.

STONE, E. M, et al. Identification of a gene that causes primary open angle glaucoma. **Science.** v. 275, p. 668–670, 1997.

SUZUKI, Y. et al. Mutations in the TIGR gene in familial primary open-angle glaucoma in Japan. **Am. J. Hum. Genet.** v. 61, p. 1202-1204, 1997.

SWIDERSKI, R.E. et al. Localization of MYOC transcripts in human eye and optic nerve by in situ hybridization. **IOVS.** v. 41, p. 3420–3428, 2000.

TAMM, E. R. Myocilin and glaucoma: facts and ideas. **Prog. Retin. Eye Res.** v. 21, p. 395–428, 2002.

TIELSCH, J. M. et al. A population-based evaluation of glaucoma screening: the Baltimore Eye Survey. **Am. J. Epidemiol.** v. 134, p. 1102–1110, 1991.

TIELSCH, J. M. et al. Racial variations in the prevalence of primary open-angle glaucoma: the Baltimore eye survey. **J. Am. Med. Assoc.** v. 266, p. 369-374, 1991.

URBANO, A. P. et al. Avaliação dos tipos de glaucoma no serviço de oftalmologia da UNICAMP. **Arq Bras Oftalmol.** v. 66, p. 61-65, 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.

VASCONCELLOS, J. P. C. et al. Penetrance and phenotype of the CYS433ARG Myocilin Mutation in a Family Pedigree with Primary Open-Angle Glaucoma. **Journal of Glaucoma**. v. 12, p. 104-107, 2003.

VITTITOW, J.; BORRAS, T. Expression of Optneurin, a glaucoma-linked gene, is influenced by elevated intraocular pressure. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 298, p. 67-74, 2002.

WAX, M. B. Is there a role for immune system in glaucomatous optic neuropathy? **Curr Opin Ophthalmol**. v. 11, p. 145-150, 2000.

WERNER, E. B. Normal-tension glaucoma. In: Ritch R, Shields MB, Krupin T, editors. The Glaucomas. 2nd ed. St. Louis: Mosby; 1996. p. 769–97.

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

WIGGS, J. L. et al. Clinical features of five pedigrees genetically linked to the juvenile glaucoma locus on chromosome 1q21-q31. **Ophthalmology**. v. 102, p. 1782-1789, 1995.

WILCOX, A. et al. Asb6, an adipocyte-specific ankyrin and SOCS box protein, interacts with APS to enable recruitment of elongins B and C to the insulin receptor signaling complex. **J Biol Chem**. v. 279, p. 38881–38888, 2004.

WIRTZ, et al. GLC1F, a new primary open angle glaucoma Locus, maps to 7q36-q36. **Arch Ophthalmol**. v. 117, 237-241, 1999.

WOLFS, R.C. et al. Genetic risk of primary open-angle glaucoma. Population-based familial aggregation study. **Arch. Ophthalmol**. v. 116, p. 1640-1645, 1998.

WORDINGER, R. J.; CLARK, A. F. Effects of glucocorticoids on the trabecular meshwork: towards a better understanding of glaucoma. **Prog Ret Eye Res**. v. 18, p. 629-667, 1999.

WU, S. Y.; NEMESURE, B.; LESKE, M. C. - Glaucoma and myopia. **Ophthalmology**. v. 106, p. 2010-2015, 2000.

YOON, S. J. K. et al. Mutations of the TIGR/MYOC gene in primary open-angle glaucoma in Korea. **Am. J. Hum. Genet.** v. 64, p. 1775-1778, 1999.

ZHANG, J. G., et al. The conserved SOCS box motif in suppressors of cytokine signaling binds to elongins B and C and may couple bound proteins to proteasomal degradation **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** v. 96, p. 2071–2076, 1999.

ANEXOS

Anexo I: aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.



**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

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

CEP, 26/11/10
(Grupo III)

PARECER CEP: N° 910/2010 (Este n° deve ser citado nas correspondências referente a este projeto).
CAAE: 0705.0.146.000-10

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “RASTREAMENTO DE MUTAÇÕES NO GENE ASB10 (GLC1F) EM PACIENTES PORTADORES DE GLAUCOMA PRIMÁRIO DE ÂNGULO ABERTO”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Bruno Batista de Souza

INSTITUIÇÃO: Hospital das Clínicas/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 13/09/2010

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 26/10/11 (O formulário encontra-se no *site* acima).

II - OBJETIVOS

Avaliar a presença de mutações no gene ASB10 em pacientes portadores de glaucoma primário de ângulo aberto (GPAA); Buscar uma associação entre eventuais alterações estruturais no gene e manifestações clínicas da doença.

III - SUMÁRIO

Os sujeitos do estudo (n=100) serão pacientes portadores de GPAA atendidos no ambulatório de Oftalmologia do HC/UNICAMP. O grupo controle (n=100) será composto de pacientes que não apresentam glaucoma nem histórico familiar desta doença. Os critérios de inclusão/exclusão são claros e adequados bem como as metodologias e tratamento estatístico dos dados a serem empregados.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Após respostas às pendências, o projeto encontra-se adequadamente redigido e de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

V - PARECER DO CEP

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



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

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

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

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

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

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

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

VII- DATA DA REUNIÃO

Homologado na IX Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 28 de setembro de 2010.


Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
VICE-PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Anexo II: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP
(0_19) 3521-8936

FAX (0_19) 3521-7187

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

cep@fcm.unicamp.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

Informações sobre a pesquisa:

Título do projeto: **RASTREAMENTO DE MUTAÇÕES NO GENE ASB10 (GLC1F) EM PACIENTES PORTADORES DE GLAUCOMA PRIMÁRIO DE ÂNGULO ABERTO**

Pesquisador responsável: Bruno Batista de Souza

Telefone para contato: (019) 8891-8745

O glaucoma é uma das principais causas de cegueira irreversível no mundo. O objetivo geral do estudo é avaliar estruturalmente o gene *ASB10* associado recentemente ao desenvolvimento de glaucoma primário de ângulo aberto. Este estudo poderá levantar dados que possibilitarão um conhecimento mais aprofundado sobre o desenvolvimento do glaucoma primário de ângulo aberto.

Caso você concorde em participar desse estudo, os pesquisadores participantes farão perguntas a respeito dos seus antecedentes médicos e familiares. Você será submetido a um exame oftalmológico completo para confirmação do estado clínico. Para participar do estudo é necessária sua permissão para colhermos uma amostra de sangue (10 a 20 ml). O exame é muito seguro e fora o desconforto da injeção não costuma causar efeitos colaterais. Hospitalização não será necessária. Os procedimentos mencionados acima serão realizados dentro do primeiro ano após o consentimento em participar no estudo e, fazem parte dos cuidados médicos de rotina para um paciente com glaucoma primário de ângulo aberto.

Será garantida, aos pacientes e responsáveis, respostas a quaisquer perguntas que possam ocorrer, em qualquer momento da pesquisa, e esclarecimento de qualquer dúvida acerca dos assuntos relacionados com esta pesquisa.

O participante do estudo não receberá qualquer valor em dinheiro. Os resultados serão publicados e sua identidade será preservada.

O DNA, extraído a partir do sangue de cada paciente, será preservado conforme o Regimento do Laboratório de Genética Molecular Humana do CBMEG (UNICAMP) se o paciente assim o consentir.

Liberdade de abandonar a pesquisa sem prejuízo:

Eu, paciente ou responsável, entendi que a participação neste projeto de pesquisa é voluntária e que eu posso recusar ou retirar meu consentimento, a qualquer momento (incluindo sobre a amostra de sangue), sem comprometer os cuidados médicos que recebo ou receberei no futuro.

Fui informado que poderei autorizar que esse material genético seja guardado no Banco de Material Biológico do Laboratório de Genética Molecular Humana CBMEG/UNICAMP. Caso este material venha a ser útil para outros estudos aprovados pelo Comitê de Ética, estou ciente que serei informado para que autorize ou não o uso da(s) amostra(s).

- Inclui o armazenamento do material para pesquisas genéticas futuras.
- Determina que o material deva ser descartado após o término da pesquisa.

Nome e RG do sujeito da pesquisa

Consentimento

Eu, _____ RG _____
_____,

abaixo assinado, estou de acordo em participar do estudo proposto acima, como sujeito. Fui devidamente informado(a) e esclarecido pelo pesquisador _____ sobre a pesquisa e os procedimentos nela envolvidos. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer instante, sem prejuízo em meu acompanhamento ou tratamento. Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

Local e data: _____

Nome do paciente: _____

Nome e assinatura do responsável legal: _____

PARTICIPAÇÃO DE INDIVÍDUOS CONTROLE

Eu estou ciente de que a minha participação no estudo intitulado “**RASTREAMENTO DE MUTAÇÕES NO GENE ASB10 (GLC1F) EM PACIENTES PORTADORES DE GLAUCOMA PRIMÁRIO DE ÂNGULO ABERTO**” será como um indivíduo controle em testes de biologia molecular.

Entendi que todas as informações constadas neste termo quanto a procedimentos, sigilo, resultados e contatos para resultados (se eu desejar saber), serão iguais aos demais indivíduos não-controles deste estudo. Fui informado também que poderei autorizar que o meu material genético seja guardado no Banco de Material Biológico do Laboratório de Genética Molecular Humana CBMEG/UNICAMP. Caso este material venha a ser útil para outros estudos aprovados pelo Comitê de Ética, estou ciente que serei informado para que autorize ou não o uso da (s) amostra (s).

Nome e RG do indivíduo controle

Assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

Data

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR

Eu expliquei a _____ o objetivo do estudo, os procedimentos requeridos e os possíveis riscos que poderão advir do estudo, usando o melhor do meu conhecimento. Eu me comprometo a fornecer uma cópia desse formulário de consentimento ao participante ou responsável.

Nome e RG do pesquisador

Assinatura do pesquisador

Data

Telefone para contato: (19) 8891-8745 (Bruno B. Souza)

Telefone do Comitê de Ética em Pesquisa – FCM – UNICAMP para dúvidas éticas e/ou reclamações: (19) 3521-8936