



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

HUGO FREIRE NUNES

ASPECTOS GENÉTICOS DO GLAUCOMA PRIMÁRIO
DE ÂNGULO ABERTO NA POPULAÇÃO BRASILEIRA

GENETICS ASPECTS OF PRIMARY OPEN-ANGLE
GLAUCOMA IN THE BRAZILIAN POPULATION

CAMPINAS

2016

HUGO FREIRE NUNES

**ASPECTOS GENÉTICOS DO GLAUCOMA PRIMÁRIO
DE ÂNGULO ABERTO NA POPULAÇÃO BRASILEIRA**

**GENETICS ASPECTS OF PRIMARY OPEN-ANGLE
GLAUCOMA IN THE BRAZILIAN POPULATION**

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do Título de Doutor em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética Animal e Evolução.

Thesis presented to the Institute of Biology of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in Genetics and Molecular Biology in the area of Animal Genetics and Evolution.

ESTE ARQUIVO DIGITAL
CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE
DEFENDIDA PELO ALUNO HUGO FREIRE
NUNES E ORIENTADA PELA Dra MÔNICA
BARBOSA DE MELO

Orientadora: Dra. MÔNICA BARBOSA DE MELO

Co-Orientador: Dr. NILSON IVO TONIN ZANCHIN

CAMPINAS

2016

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2011/04073-7

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

N922a Nunes, Hugo Freire, 1985-
Aspectos genéticos do glaucoma primário de ângulo aberto na população brasileira / Hugo Freire Nunes. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Mônica Barbosa de Melo.
Coorientador: Nilson Ivo Tonin Zanchin.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Glaucoma primário de ângulo aberto. 2. Polimorfismo (Genética). 3. Mutação. 4. Sequenciamento completo de exoma. 5. Sequenciamento de DNA. I. Melo, Mônica Barbosa de, 1968-. II. Zanchin, Nilson Ivo Tonin. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Genetic aspects of primary open angle glaucoma in Brazilian population

Palavras-chave em inglês:

Primary open angle glaucoma

Genetic polymorphisms

Mutation

Whole exome sequencing

DNA sequencing

Área de concentração: Genética Animal e Evolução

Titulação: Doutor em Genética e Biologia Molecular

Campinas, 29/08/2016

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Mônica Barbosa de Melo

Profa. Dra. Edi Lúcia Sartorato

Prof. Dr. Edmilson Ricardo Gonçalves

Profa. Dra. Sueli Matilde da Silva Costa

Prof. Dr. Niro Kasahara

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo FAPESP, pelo apoio financeiro (Número do processo: 2011/04073-7).

Ao Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética CBMEG, por fornecer um ótimo ambiente para troca de experiências entre os alunos de diferentes áreas de estudo.

À Universidade Estadual de Campinas UNICAMP, por proporcionar um ótimo ambiente e infraestrutura para pesquisa.

Ao Instituto de Biologia em especial aos funcionários e coordenadores, obrigado pela disposição e paciência.

À Dr^a Mônica Barbosa de Melo, pela orientação, ensinamentos e por ter me oferecido a oportunidade de trabalhar neste projeto.

Ao Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin, pela coorientação e ensinamentos. Obrigado pelo incentivo e por sempre ter me encorajado a crescer.

Ao Dr. José Paulo Cabral de Vasconcellos, pela disponibilidade, sugestões e críticas na produção deste trabalho.

Às professoras Edi Lúcia Sartorato e Sueli Matilde e aos professores Edmilson Ricardo Gonçalves e Niro Kasahara pela participação na banca de avaliação deste trabalho.

Aos amigos do lab, Letícia, Tamires, Danizinha, Carol, Bibi, Paulo, Galina pela ótima companhia no decorrer de muitos anos.

Aos alunos do laboratório de genética molecular da FCM, Murilo, Patrícia, ao pessoal do departamento de oftalmologia do Hospital das Clínicas da UNICAMP, a do

Hemocentro e todos os que de alguma forma contribuíram para este trabalho, obrigado pela colaboração, disposição e ensinamentos que tornaram possível que este trabalho fosse realizado.

A todos os meus familiares, aos meus irmãos Bruno e Laís, aos meus pais Raul e Jussara, meus maiores incentivadores, por todo seu amor e esforço em proporcionar as melhores condições para minha educação. Obrigado por sempre acreditarem no meu futuro profissional.

RESUMO

O glaucoma é uma das principais causas de cegueira irreversível no mundo, sendo o Glaucoma Primário de Ângulo Aberto (GPAA) a forma mais comum da doença. Esta afecção, dificilmente, é detectada precocemente por ser assintomática em sua fase inicial, durante a qual o tratamento previne perdas definitivas da função visual. Desta forma, a identificação de grupos de risco baseada em aspectos genéticos é importante para auxiliar no diagnóstico precoce e estabelecer um seguimento clínico mais adequado para os pacientes. Dentre os genes identificados relacionados ao GPAA, merecem destaque os genes *MYOC*, *OPTN* e *WDR36*, sendo que alterações no gene *MYOC* são consideradas a maior causa de cegueira com base molecular estabelecida. Mais recentemente, o gene *NTF4* (*GLC10*) foi identificado a partir de estudo de ligação em famílias alemãs com GPAA e os genes *CAVI* e *CDKN2B* foram associados ao GPAA por meio de estudos de associação de amplitude genômica ou *Genome Wide Association Studies* (GWAS) e replicados em outras populações. O possível papel de alguns destes genes na fisiopatologia do glaucoma ainda é pouco conhecido, não havendo dados sobre os mesmos na população brasileira. Além disso, são poucos os genes que têm papel estabelecido na fisiopatologia do GPAA, estimulando a busca por novos genes.

Desta maneira, inicialmente, este estudo buscou, a partir da investigação da região codificadora do gene *NTF4*, a associação deste gene com o GPAA em um estudo caso/controle que compreendeu tanto uma amostra da população de pacientes não relacionados portadores de GPAA (n =169) como uma população sem a doença (n =140). Além deste gene, foi investigada a contribuição dos alelos de risco previamente associados ao GPAA na região dos genes *CAVI* (rs4236601) e *CDKN2B* (rs4977756, rs2157719). Concomitantemente, treze famílias foram avaliadas a partir da investigação das regiões codificadoras dos genes *MYOC* e *CYP1B1*. Dentre as famílias, duas foram selecionadas para a busca de variantes causais para o GPAA por meio de sequenciamento completo de exomas.

Alterações no gene *NTF4* são muito raras e na amostra da população brasileira estudada também não foram observadas variações neste gene que resultem em associação com a doença. No entanto, para a confirmação de tais resultados é importante que as regiões regulatórias também sejam avaliadas. Nossos resultados apontam para a associação de marcadores genéticos com o GPAA na região dos genes *CAVI/2* (rs4236601, p=0,04) e *CDKN2B* (rs2157719, p=0.0005) na amostra estudada, nunca antes descrita na população brasileira.

Estudos em famílias descreveram até o momento poucos genes causais para as formas mendelianas do GPAA. Neste estudo não foram encontradas alterações no gene *MYOC* em treze famílias estudadas. Alterações no gene *MYOC* são mais relevantes em casos de GPAA-J e não foram encontradas nas famílias com GPAA na forma adulta. Nas mesmas famílias foram descritas sete diferentes mutações no gene *CYP11B1*; no entanto apenas uma pode ser considerada relacionada ao fenótipo nas formas primárias de glaucoma. Mais estudos e o acompanhamento adequado dos indivíduos portadores poderá elucidar a relação da variante rara P400S com o GPAA. Em duas famílias um estudo de sequenciamento de exomas foi realizado, contudo as análises não apontaram até o momento as causas genéticas do GPAA nestas famílias. Alterações que segreguem com o fenótipo da doença ainda não foram descritas nos dez indivíduos estudados.

ABSTRACT

Glaucoma is one of the leading causes of irreversible blindness worldwide and primary open-angle glaucoma (POAG) is the most common form of the disease. This affection is difficult to be detected once it is asymptomatic at early stages, when treatment could prevent definitive vision loss. Hence, the identification of risk groups based on genetic aspects is important to help in early diagnosis and to provide a clinical segment more adequate to the patients. Genes related to POAG have been identified, including *MYOC*, *OPTN* and *WDR36*. Mutations in the *MYOC* gene are considered one of the few causes of blindness with established molecular basis. More recently, the *NTF4* gene has been identified through linkage studies in the German population; *CAVI* and *CDKN2B* have been associated to POAG by means of Genome Wide Association Studies (GWAS) and replicated in other populations.

The possible implications of some of these genes in the physiopathology of POAG remains unrecognized and there is no data about their participation in the Brazilian population. Besides that only few genes have known influence in POAG physiopathology, stimulating the search for new genes.

This study proposed, initially, to investigate the association of the *NTF4* gene with glaucoma by means of the analysis of its coding region in a case-control study in a cohort comprised by affected versus unaffected unrelated individuals. Additionally, the contribution of risk alleles previously associated with POAG in the regions of *CAVI* (rs4236601) and *CDKN2B* (rs4977756 and rs2157719) genes was investigated. Concomitantly, thirteen families were analyzed by means of the investigation of the coding region of *MYOC* and *CYP1B1* genes. In two families without mutations in the *MYOC* gene, exome sequencing was performed aiming to discover new causal variants to POAG.

Mutations in the *NTF4* gene are not common and in our analysis no mutation was found in this gene that could be related to the disease in this Brazilian sample. However, in order to confirm these results, regulatory regions of the gene have to be evaluated. Our results showed that recently described genetic markers next to *CAVI/2* (rs4236601, p=0,04) and *CDKN2B* (rs2157719 p=0.0005) were associated with POAG in the studied sample, results that are being described for the first time in Brazil.

Family studies describe few genes that cause the mendelian forms of POAG. Our study hasn't found mutations in the *MYOC* gene in thirteen adult onset POAG families, which was expected once mutations in this gene are more common in the juvenile form of the disease. Seven mutations in the *CYP1B1* gene were described in the same families, however

only one mutation, P400S, may be related with glaucoma. In order to elucidate the relation of this variant with POAG the follow-up of carrier individuals is required. We performed exome sequencing in two families with POAG but yet no mutations have been found that segregate with the disease in ten individuals evaluated.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. ATIVAÇÃO DAS CÉLULAS NÃO NEURONAIS EM RESPOSTA À ELEVAÇÃO DA PIO (KWON ET AL., 2009)..	24
FIGURA 2. PREVALÊNCIA ESTIMADA DE GPAA POR IDADE EM HOMENS E MULHERES COMBINADOS POR ETNIA, APRESENTAÇÃO EM ESCALA LOGARÍTMICA (KAPETANAKIS ET AL., 2015).....	26
FIGURA 3. VIA DE CIRCULAÇÃO DO HUMOR AQUOSO (KWON ET AL., 2009).....	28
FIGURA 4. A PATOGÊNESE COMPLEXA DO GPAA PODE INCLUIR GENES, FATORES AMBIENTAIS E EPIGENÉTICOS (WIGGS, 2012). SE: SINDROME EXFOLIATIVA, GPN: GLAUCOMA DE PRESSÃO NORMAL.	30
FIGURA 5. ABORDAGENS TÉCNICAS PARA O MAPEAMENTO DE GENES. ADAPTADA DE <i>GENE MAPPING FOR PRIMARY OPEN ANGLE GLAUCOMA</i> (FAN ET AL., 2006).	36
FIGURA 6. REPRESENTAÇÃO DA PROTEÍNA <i>NTF4</i> EM DÍMERO E LIGAÇÃO COM O RECEPTOR FORMANDO UM COMPLEXO; A) EM DESTAQUE O AMINOÁCIDO R164 E M164; B) CONTATOS DE INTERFACE DE R164; C) CONTATOS INTERNOS DE R164; D) CONTATOS INTERNOS DE M164.	50
FIGURA 7. ETAPAS DA ANÁLISE DE SEQUENCIAMENTO DE EXOMAS.	76
FIGURA 8. HEREDOGRAMA DA FAMÍLIA, OITO INDIVÍDUOS DE 4 DIFERENTES GERAÇÕES (I, II, III), APRESENTANDO AS MUTAÇÕES (1 A 7 DE ACORDO COM A TABELA 1) NO GENE <i>CYP1B1</i> . (+) UM ALELO MUTADO, (++) DOIS ALELOS MUTADOS.	79
FIGURA 9. ELETROFEROGRAMA DO SEQUENCIAMENTO DO GENE <i>CYP1B1</i> APRESENTANDO AS ALTERAÇÕES ENCONTRADAS NESTE ESTUDO QUE FORMAM O HAPLÓTIPO MAIS RELATADO NA LITERATURA.	81
FIGURA 10. ELETROFEROGRAMA REPRESENTANDO A MUTAÇÃO P400S NO GENE <i>CYP1B1</i>	82
FIGURA 11. EXEMPLO DE COMPARAÇÃO ENTRE OS FRAGMENTOS EM AMBOS OS SENTIDOS EM UM INDIVÍDUO. A) <i>FORWARD</i> ; B) <i>REVERSE</i> . PB: PARES DE BASES.....	86
FIGURA 12. COMPARAÇÃO ENTRE O NÚMERO DE BASES DAS LEITURAS ALINHADAS ANTES E APÓS A RECALIBRAÇÃO.	87
FIGURA 13. <i>MULTIPOINT GENOME WIDE LOD SCORE</i> DA FAMÍLIA 1. A SETA INDICA A REGIÃO DE PICO (LOD = 2,4) NA REGIÃO 2P22-23 (SANTOS 2013, DISSERTAÇÃO DE MESTRADO, FCM, UNICAMP).....	88
FIGURA 14. FLUXOGRAMA DA ANÁLISE PARA SELEÇÃO DE VARIANTES DO MODELO DOMINANTE.	89
FIGURA 15. HEREDOGRAMA DA FAMÍLIA 1 COM OS GENÓTIPOS DAS MUTAÇÕES EM PACIENTES E CONTROLES.	91
FIGURA 16. <i>MULTIPOINT GENOME WIDE LOD SCORE</i> DA FAMÍLIA 2. A SETA INDICA A REGIÃO DE PICO (LOD = 2,08) NA REGIÃO 5Q31.2. (SANTOS 2013, DISSERTAÇÃO DE MESTRADO, FCM, UNICAMP).	92
FIGURA 17. HEREDOGRAMA DA FAMÍLIA 2 COM OS GENÓTIPOS DAS MUTAÇÕES EM PACIENTES E CONTROLES.	94

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. RELAÇÃO DA ELEVAÇÃO DA PRESSÃO INTRAOCULAR COM O RISCO DE DESENVOLVIMENTO DO GPAA (SOMMER ET AL., 1991).....	27
TABELA 2. GENES E REGIÕES RELACIONADAS AO GPAA POR MEIO DE ESTUDOS DE LIGAÇÃO.....	32
TABELA 3. SEQUÊNCIAS DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS, TEMPERATURAS E TEMPOS DE ANELAMENTO.	45
TABELA 4. DADOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS EM INDIVÍDUOS COM ALTERAÇÕES NO GENE <i>NTF4</i>	49
TABELA 5. SEQUÊNCIAS DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS, E TEMPERATURAS DE ANELAMENTO.	73
TABELA 6. DISTRIBUIÇÃO DAS VARIANTES NO GENE <i>CYP11B1</i> ENCONTRADAS NESTE ESTUDO NAS DIFERENTES POPULAÇÕES, MOSTRADAS EM PORCENTAGEM.	79
TABELA 7. DADOS CLÍNICOS DOS INDIVÍDUOS PERTENCENTES À FAMÍLIA.....	80
TABELA 8. INFORMAÇÕES RELEVANTES SOBRE OS GENES QUE CONTÊM ALTERAÇÕES SELECIONADAS PARA AVALIAR A SEGREGAÇÃO NA FAMÍLIA 1.	90
TABELA 9. INFORMAÇÕES RELEVANTES SOBRE OS GENES QUE CONTÊM ALTERAÇÕES SELECIONADAS PARA AVALIAR A SEGREGAÇÃO NA FAMÍLIA 2.	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCA1 - *ATP Binding Cassette Subfamily A Member 1*

ADRA2B - *adrenoreceptor alfa 2b*

AIC – critério de informação de akaike (*akaike's information criterion*)

ANOVA – análise de variância (*analysis of variance*)

ANZRAG – registros australiano e neozelandês de glaucoma avançado (*Australian and New Zealand registry of advanced glaucoma*)

ARHGEF12 - *rho guanine nucleotide exchange factor 12*

ASB10 - *ankyrin repeat- and socs box-containing protein 10*

ATOH7 - *atonal homolog 7*

BDNF - *brain derived neurotrophin*

BID - *BH3 interacting-domain*

BMP2 - *bone morphogenetic protein 2*

CAPN13 - *calcium-activated neutral proteinase 13*

CASP8 - *caspase 8*

CAV1 - *caveolin 1*

CDK4 - *cyclin-dependent kinase 4*

CDKN2B-AS1 - *cyclin-dependent kinase inhibitor 2B antisense 1*

CEU – residentes de Utah com ancestralidade do norte e oeste europeu (*Utah residents with northern and western European ancestry*)

CGR - células ganglionares da retina

CLK - *CDC like kinase*

CLN6 - *ceroid-lipofuscinosis, neuronal 6, late infantile, variant*

COL14A1 - *collagen type XIV alpha 1*

CP - *ceruloplasmin*

CYP4V2 - *cytochrome p450 family 4 subfamily V member 2*

DIABLO - *diablo IAP-binding mitochondrial protein*

DNA – ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*)

DP - desvio padrão

EBAG9 - *estrogen receptor binding site associated, antigen, 9*

ECC - espessura central da córnea

EDTA - *ethylenediamine tetraacetic acid*

EFEMP1 - *EGF containing fibulin-like extracellular matrix protein*

ERE - elementos responsivos a estrógenos

EUA - Estados Unidos da América

FAS - *fas cell surface death receptor*

FOXE1 - *forkhead box E1*

GABRB3 - *gamma-aminobutyric acid type A receptor beta 3 subunit*

GALNT14 - *UDP-N-acetylalpha-D-galactosamine polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 14*

GATK - *genome analysis toolkit*

GIST – estudo de herança do glaucoma na Tasmânia (*glaucoma inheritance study in Tasmania*)

GLAUGEN - *glaucoma genes and environment study*

GLC1A - *primary open-angle glaucoma locus 1*

GL - graus de liberdade

Glm – modelos lineares generalizados (*generalized linear models*)

GPAA - glaucoma primário de ângulo aberto

GCP – glaucoma congênito primário

GPN - glaucoma de pressão normal

GWAS – estudos de associação de amplitude genômica (*genome-wide association studies*)

HapMap – mapa haplotípico (*haplotype map*)

HF – história familiar

HGMD – dados das mutações gênicas em humanos (*human gene mutation data*)

HO - hipertenso ocular

HSPE1 - *heat shock protein family E 1*

HWE – equilíbrio de hardy-weinberg (*hardy-weinberg equilibrium*)

IL1A - *interleukin 1 A*

LOD - *logarithm of the odds*

LOXL1 - *lysyl oxidase like 1*

LRP2BP - *LDL receptor related protein 2 binding protein*

LTBP1 - *latent transforming growth factor beta binding protein 1*

LZTFL1 - *leucine zipper transcription factor like 1*

MAF – frequência do alelo menor (*minor allele frequency*)

MAP4 - *microtubule associated protein 4*

MLLT10 - *myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia; translocated to 10*

mmHg-milímetros de mercúrio

MO - *Missouri*

MSRB2 - *methionine sulfoxide reductase B2*

MT - malha trabecular

MYOC - *myocilin*

NCBI – centro nacional para informação biotecnológica (*National Center for Biotechnology Information*)

NCK2 - *NCK adaptor protein 2*

NEIGHBOR - *national eye institute glaucoma human genetics collaboration*

NGS - sequenciamento de nova geração (*next generation sequencing*)

NPAP1 - *nuclear pore associated protein 1*

NR2E3 - *nuclear receptor subfamily 2 group E member 3*

NRG2 - *neuregulin 2*

NRP1 - *neuropilin 1*

OMGH - organização mundial do genoma humano

ON - óxido nítrico

OPTN - *optineurin*

OR- razão de chances (*odds ratio*)

OTX - *orthodenticle homeobox*

PAX8 - *paired box 8*

pb – pares de bases

PCR – reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*)

PCDHGB4 - *Protocadherin Gamma Subfamily B, 4*

PIC – conteúdo de informação do polimorfismo (*polymorphism information content*)

PIO - pressão intraocular

PLIER - *Probe Logarithmic Intensity Error*

PRKD1 - *protein Kinase D1*

RED - razão escavação disco

ROR2 - *receptor tyrosine kinase like orphan receptor 2*

rpm - rotações por minuto

SE - síndrome exfoliativa

SIFT – escala invariante de transformação de característica (*scale-invariant feature transform*)

SIX6 - *sine oculis homeobox 6*

SLC4A11 - *solute carrier family 4 member 11*

SMAC - *second mitochondria-derived activator of caspase*

SMAD6 - *SMAD Family Member 6*

SNP – polimorfismo de base única (*single nucleotide polymorphism*)

SPARC - *secreted protein acidic and cysteine rich*

SRD5A2 - *steroid-5-alpha-reductase alpha polypeptide 2*

TBK1 - *TANK binding kinase 1*

TF - *transferrin*

TGF-beta - *transforming growth factor beta*

TGFBR1 - *transforming growth factor receptor 1 beta*

TMCO1 - *transmembrane coiled coil domain 1*

TRHR - *thyrotropin releasing hormone receptor*

TrkB - *tropomyosin receptor kinase B*

TSI - Toscana, Itália

UFSP2 - *UFM1 - specific peptidase 2*

UTR – não traduzido (*untranslated*)

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas

VEP – preditor de efeito da variante (*variant effect predictor*)

WDR36 - *WD repeat domain 36*

WHO - Organização mundial de saúde (*World Health Organization*)

WES – *whole exome sequencing*

XDH - *xanthine dehydrogenase*

XPO1 - *exportin 1*

YRI - africanos representados por Yoruba

ZNF219 - *zinc finger 219*

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	5
RESUMO	7
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	13

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 Definição de Glaucoma.....	21
1.2 Epidemiologia	22
1.3 Mecanismos.....	23
1.4 Fatores de risco relacionados ao GPAA.....	25
1.5 Aspectos genéticos do glaucoma.....	31
1.5.1 Classificação.....	31
1.5.2 Identificação de genes.....	31
1.5.2.1 Estudos em Famílias.....	31
1.5.2.2 Estudos de associação.....	35
1.6 Justificativas do trabalho.....	40

2.0 CAPÍTULO 1: ESTUDOS DE ASSOCIAÇÃO CASO CONTROLE

2.1 Objetivos.....	41
2.1.1 Gerais.....	41
2.1.2 Específicos.....	41
2.2 Casuística.....	41
2.2.1 Pacientes.....	41
2.2.1.1 Critérios de inclusão.....	42
2.2.1.2 Critérios de exclusão.....	42
2.2.2 Controles.....	42
2.2.2.1 Critérios de inclusão.....	42
2.2.2.2 Critérios de exclusão.....	43
2.3 Métodos.....	43
2.3.1 Exames oftalmológicos	43

2.3.2	Avaliação genética dos indivíduos.....	44
2.3.2.1	Extração de <i>DNA</i>	44
2.3.2.2	Reação em Cadeia da Polimerase PCR.....	44
2.3.2.3	Reação de sequenciamento Sanger.....	45
2.3.3	Forma de análise dos resultados.....	46
2.3.3.1	Estatística descritiva utilizando o ambiente “R”.....	46
2.3.3.2	Análise <i>in silico</i> das mutações.....	47
2.4	Resultados e discussão.....	48
2.4.1	Avaliação da associação do gene <i>NTF4</i> com GPAA em uma amostra da população brasileira.....	48
2.4.2	MANUSCRITO.....	53

3.0 CAPÍTULO 2: ESTUDO EM FAMÍLIAS

3.1	Objetivos.....	71
3.1.1	Gerais.....	71
3.1.2	Específicos.....	71
3.2	Casuística.....	71
3.2.1	Pacientes.....	71
3.2.1.1	Critérios de inclusão.....	72
3.2.1.2	Critérios de exclusão.....	72
3.2.2	Controles.....	72
3.2.2.1	Critérios de inclusão.....	72
3.2.2.2	Critérios de exclusão.....	72
3.3	Métodos.....	73
3.3.1	Exames oftalmológicos	73
3.3.2	Avaliação genética dos indivíduos.....	73
3.3.2.1	Obtenção das amostras de sangue e extração de <i>DNA</i>	73
3.3.2.2	Reação em Cadeia da Polimerase PCR.....	73
3.3.2.3	Sequenciamento direto Sanger.....	75
3.3.2.4	Sequenciamento completo de exomas.....	75
3.3.3	Forma de análise dos resultados.....	76
3.3.3.1	Análise do Sequenciamento de exomas.....	76
3.3.3.2	Filtragem das mutações	77

3.4 Resultados e discussão	
3.4.1 Sequenciamento dos genes <i>MYOC</i> e <i>CYP1B1</i> em 13 famílias com GPAA.....	78
3.4.2 Estudo de sequenciamento total de exomas em duas famílias portadoras de GPAA.....	84
3.4.2.1 Análise do sequenciamento total de exomas.....	85
3.4.2.2 Família 1.....	87
3.4.2.3 Família 2.....	92
4.0 CONCLUSÕES.....	96
5.0 BIBLIOGRAFIAS.....	98
6.0 APÊNDICES.....	111
7.0 ANEXOS.....	115

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 Definição de glaucoma

O glaucoma pode ser definido como uma doença neurodegenerativa de etiologia multifatorial, compreendendo inúmeras afecções oculares que possuem como característica comum, a lesão progressiva do nervo óptico (afilamento progressivo da rima nervosa e aumento da relação escavação/disco), com perda de campo visual correspondente. O sítio primário da lesão glaucomatosa são as células ganglionares da retina (CGR), particularmente seus axônios (fibras nervosas) (Weinreb and Khaw, 2004).

A elevação da pressão intraocular (PIO) é um fator de risco primário. No glaucoma ocorre uma aceleração do processo de apoptose das CGR comparada à perda natural decorrente do envelhecimento (Foster et al., 2002) (Weinreb, 2007). A necessidade de dividi-lo em subgrupos que compartilhem mecanismos fisiopatológicos e epidemiológicos é dificultada, muitas vezes, pelos critérios de classificação provenientes de sua propedêutica, como a tonometria, a gonioscopia, a fundoscopia e a perimetria (Foster et al., 2002) (Kroese and Burton, 2003).

O glaucoma pode ser classificado de acordo com a etiologia (primário ou secundário), o aspecto anatômico do seio camerular (aberto ou fechado) e a evolução clínica (agudo ou crônico). O seio camerular compreende uma série de estruturas que inclui desde a íris periférica até a linha de Schwalbe. A observação destas estruturas e suas correlações topográficas por meio da gonioscopia permitem classificar o seio camerular ou ângulo em aberto e fechado. Quando os mecanismos fisiopatológicos que levam ao desenvolvimento do glaucoma são conhecidos e envolvem condições oculares e/ou sistêmicas que resultem em elevação da PIO e lesão glaucomatosa do disco óptico, o glaucoma é denominado secundário. O termo primário se restringe aos glaucomas cujo mecanismo responsável pelo desenvolvimento da lesão glaucomatosa do disco óptico e, na maioria das vezes, do aumento da PIO não está estabelecido (Leske, 1983).

1.2 Epidemiologia

O glaucoma é, segundo dados mais recentes da Organização Mundial de Saúde, a segunda causa de cegueira no mundo, e suas formas primárias correspondem a cerca de 20% das causas de cegueira (<http://www.who.int/blindness/causes/>), atrás apenas da catarata e à frente da degeneração macular relacionada à idade (DMRI). Em qualquer população avaliada em relação às causas de cegueira, o glaucoma mantém-se como uma das principais responsáveis, apesar da reconhecida variação das causas em decorrência das condições sócio-econômicas e geográficas de cada população estudada (Resnikoff et al., 2004).

A prevalência do GPAA varia de acordo com a região e o grupo étnico estudado, com levantamentos revelando valores de 1 a 3 % na Europa, 1 a 4 % na Ásia e 2 a 3 % na Austrália (Quigley and Broman, 2006; Rudnicka et al., 2006). Nos Estados Unidos a prevalência varia de 1 a 5% dependendo do grupo populacional avaliado. Em norte americanos de origem europeia é de 1 a 2% (Murdoch et al., 2001) (Ntim-Amponsah et al., 2004), enquanto nos de ascendência africana é de quase 5% (Tielsch et al., 1991), nos latinos provenientes do México de 2 a 5% (Mason et al., 1989) (Leske et al., 1994) e hispânicos do Arizona de 1,8% a 2,3% (Quigley et al., 2001). Taxas maiores são encontradas na África, variando entre 1 % na Nigéria (Murdoch et al., 2001) e 8 % em Gana (Ntim-Amponsah et al., 2004). Contudo, as maiores prevalências são observadas no Caribe (7 a 9%) em indivíduos de origem, na sua maior parte, do oeste africano (Mason et al., 1989) (Leske et al., 1994). Perfis genéticos, fatores ambientais ou ainda os métodos diagnósticos utilizados para caracterizar a doença podem ser os responsáveis pela variação da prevalência de GPAA no mundo. No vasto território da China, as diferenças geográficas e étnicas podem explicar, em parte, a variação na prevalência de GPAA. As maiores são observadas na capital Pequim (2 a 3%) (Wang et al., 2010) e as menores na zona rural de Harbin (0,5 a 1%) (Sun et al., 2012). Os indivíduos de origem asiática serão responsáveis por 47% do total de glaucomatosos e 87% daqueles com diagnóstico de ângulo fechado (Quigley and Broman, 2006).

A informação sobre a incidência de GPAA é mais limitada. Mesmo que diversos estudos epidemiológicos tenham determinado a prevalência da doença, dados sobre a incidência necessitam de um estudo longitudinal com uma amostra significativa da população devido ao baixo número de novos casos por ano. No estudo que acompanhou por quase 10 anos 3882 participantes da cidade de Rotterdan, na Holanda, foi observada uma incidência de aproximadamente 0,3 % ao ano, correspondendo a 103 novos casos (Wishal D. Ramdas et al.,

2011). Em indivíduos negros acompanhados por 9 anos nos *Barbados Eye Studies* a incidência foi de apenas 0,5 %, (Leske et al., 2007). Em 5 anos de seguimento em um estudo na população coreana, apenas 36 novos casos foram confirmados (0,72%), correspondendo a cerca de 0,14% ao ano de um total de 5021 participantes acompanhados no estudo (Kim et al., 2014).

As diferenças encontradas na incidência de GPAA entre populações estão de acordo com as taxas de prevalências correspondentes. Dados sobre a incidência podem ser de grande importância na determinação de fatores de risco para o GPAA. O estudo na população australiana, de Melbourne observou um aumento do risco de se desenvolver GPAA com o decorrer da idade. Partindo de uma incidência observada de 0,3% em indivíduos na faixa de 50 anos de idade, alcançando 4%, acima dos 80 anos (Mukesh et al., 2002).

1.3 Mecanismos

A lesão glaucomatosa tem como sua principal característica de dano estrutural a perda de células ganglionares da retina (CGR) por apoptose que leva a uma redução da espessura da camada de fibras nervosas da retina e aumento da relação escavação/disco. O mecanismo envolvido na apoptose das CGR é multifatorial com diferentes contribuições dos vários fatores participantes, que incluem o aumento da PIO (teoria mecânica), alterações vasculares da qualidade do fluxo sanguíneo no disco óptico (teoria vascular), degeneração secundária neuronal, ativação das células da glia, entre outros (Weireb 2007). No processo de apoptose das CGR, as vias extrínsecas e intrínsecas são ativadas e acarretam o aumento da vulnerabilidade e o desencadeamento de morte celular. Estas vias podem ser ativadas de diferentes maneiras. A via extrínseca é iniciada com a ligação de fatores como o TNF –alfa e FAS ao seus receptores presentes na superfície da célula, que então acarretam na ativação da caspase-8 responsável por clivar a efetora caspase-3 que quando ativada induz a apoptose. A via extrínseca interage com a via intrínseca por meio da clivagem de BID mediada pela caspase-8. A via intrínseca decorre da liberação de proteínas presentes na membrana mitocondrial como o citocromo c, SMAC/DIABLO no citosol. O citocromo liberado forma o apoptossoma juntamente com a caspase-9 e Apaf-1 ativando a caspase-9 (Palioura and G., 2013).

A ativação das células da Glia e de Muller mediante estresse biomecânico ocorre devido ao aumento da PIO (Figura 1). Estas células respondem ao aumento da PIO produzindo a citocina pró inflamatória TNF-alfa, um mediador da degeneração das CGR (Nakazawa et al., 2006). A ativação destas células não neuronais facilita o processo de apoptose das CGR cuja alteração estrutural é o afinamento da camada de fibras nervosas da retina (Figura 1C), aumento da escavação e disfunção da lâmina cribosa (Figura 1D) (Kwon et al., 2009).

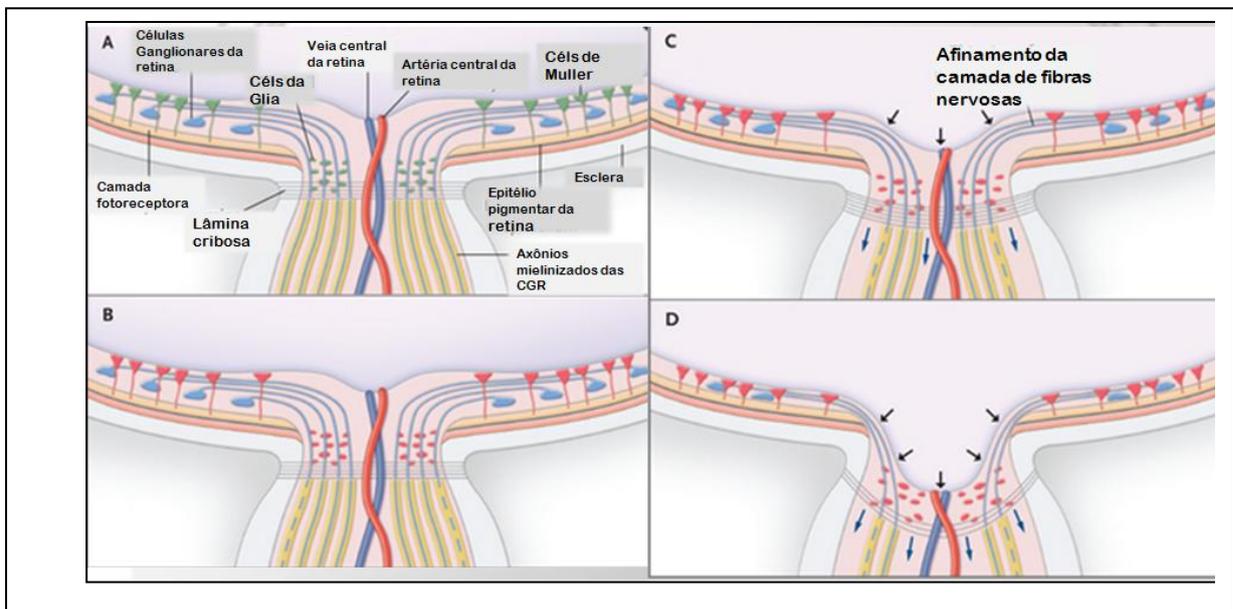


Figura 1. Ativação das células não neuronais em resposta à elevação da PIO (Kwon et al., 2009).

A degeneração também é decorrente de eventos como a hipoperfusão vascular com isquemia crônica do nervo óptico. Da mesma maneira altos níveis de PIO desequilibram o suprimento sanguíneo do nervo (Mozaffarieh et al., 2008). Desta maneira, eventos que envolvam hipóxia do nervo acarretam em disfunção mitocondrial, estresse oxidativo inflamação além da deprivação de neurotrofinas levando à apoptose (Ko et al., 2005) (Gauthier and Liu, 2016).

Desta maneira, diversas alterações do glaucoma são envolvidas no processo de apoptose das CGR, incluindo o aumento da PIO. Este aumento é decorrente da disfunção do sistema de escoamento do humor aquoso, particularmente da malha trabecular (MT), que

também tem mecanismo complexo em sua origem. Um dos mecanismos destacados e sugeridos ocorreu a partir da identificação de genes associados ao glaucoma primário de ângulo aberto (GPAA), como o gene “*myocilin*” (*MYOC*), que codifica a proteína miocilina. O envelhecimento inapropriado da proteína miocilina também acarreta disfunção da MT e aumento da PIO; as células endoteliais da MT colaboram para a manutenção desta estrutura, e permitem o escoamento do HA do olho remodelando seus poros e evitando que o *debris* ocluem esta via. Uma mudança na arquitetura da MT e redução da concentração de células são observadas no glaucoma (Alvarado et al., 1984). A variação da PIO relacionada ao dano glaucomatoso do disco óptico dá suporte à etiologia multifatorial do glaucoma, que justificaria diferenças na suscetibilidade ao dano glaucomatoso, para diferentes níveis de PIO (Leske, 2007). Adicionalmente, alterações na lâmina cribosa (LC), especialmente as alterações biomecânicas, têm a capacidade independentemente de outros fatores, de contribuir para o estresse dos axônios, o que leva a apoptose das CGR (Janssen et al., 2013).

1.4 Fatores de risco relacionados ao GPAA

Os fatores de risco associados ao GPAA incluem fatores demográficos, oculares, sistêmicos e familiares. A idade e ancestralidade são fatores de risco estabelecidos para os GPAA. No GPAA a prevalência entre os negros é maior em todas as faixas etárias quando comparadas às populações brancas e asiáticas. Em indivíduos acima dos 70 anos de idade, a prevalência nos negros foi de 16% seguida por 6% entre os brancos e 3% na população asiática. Entretanto, o aumento da prevalência do GPAA por década de aumento da idade foi maior entre os brancos com razão de chances de 2,05 (IC 95% 1,91 – 2,18), 1,61 (IC 95% 1,53 – 1,70) entre os negros e de 1,57 entre os asiáticos (IC 95% 1,46 – 1,68) (Rudnicka et al., 2006).

Dados de prevalência e fatores demográficos de 81 estudos foram utilizados em uma meta análise que incluiu participantes de 37 países divididos em 6 etnias principais, todas apresentando crescimento linear da prevalência por década de vida. A raça negra apresentou os níveis absolutos mais altos até os 80 anos alcançando 12,2%. O maior aumento da prevalência de GPAA por década de aumento da idade foi observado no grupo de hispânicos, seguido de brancos (Figura 2).

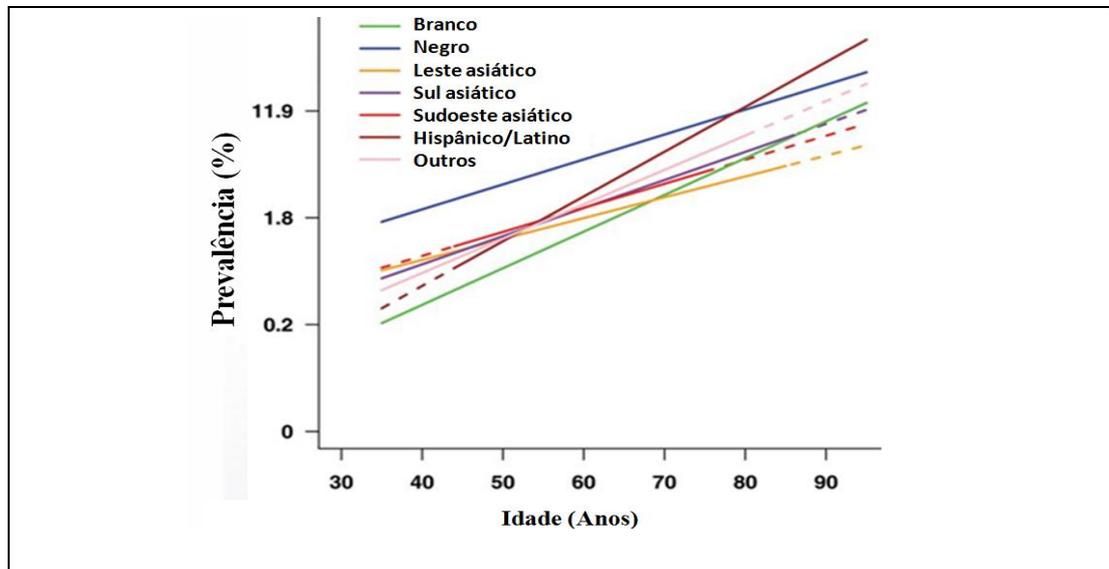


Figura 2. Prevalência estimada de GPAA por idade em homens e mulheres combinados por etnia, apresentação em escala logarítmica (Kapetanakis et al., 2015).

A espessura central da córnea foi considerada também como fator preditivo para o desenvolvimento do GPAA em indivíduos hipertensos oculares (HO). Um estudo longitudinal de Barbados observou que o decréscimo de 40 micrômetros na espessura central da córnea aumenta o risco para glaucoma em 1,41 (IC 95% 1,01-1,96). Não está ainda elucidado se olhos com córneas mais finas apresentam maior risco para desenvolver o GPAA devido à influência da espessura corneana na medida da PIO ou se os olhos apresentam discos ópticos mais vulneráveis à lesão glaucomatosa (Leske et al., 2008).

A miopia, de moderada a severa, é um reconhecido fator de risco para o GPAA, levando ao aumento de até três vezes no risco de se desenvolver a doença (Xu et al., 2007) (Shen et al., 2016). Em relação ao diabetes, os estudos são conflitantes na associação desta doença com o GPAA; uma recente meta-análise com 6 estudos transversais de base populacional, determinou um risco relativo de apenas 1,35 (95% IC, 1.06-1.74) para os pacientes diabéticos (Zhou et al., 2014).

A elevação da PIO é o principal fator de risco associado ao GPAA. Esta relação é geralmente avaliada por meio de estudos populacionais com abordagem na incidência da doença. Sommer e colaboradores avaliaram na população de Baltimore o risco relativo para

GPAA em diferentes faixas de PIO e observaram um risco de até 39 vezes para níveis de PIO acima de 30 mmHg. (Tabela 1) (Sommer et al., 1991).

Os estudos envolvendo a população de Barbados constataram que o risco relativo para GPAA para indivíduos com PIO acima de 21 mmHg foi de 5,2 (IC 95% 3,5-7,6) e para o grupo de pacientes com PIOs acima de 25 mmHg foi de 5,9 (IC 95% 3,6-9,4) (Leske et al., 2008) (Nemesure et al., 2007). Indivíduos com PIO elevada e sem sinais de glaucoma são denominados hipertensos oculares (HO) (Leske, 2007).

Tabela 1. Relação da elevação da pressão intraocular com o risco de desenvolvimento do GPAA (Sommer et al., 1991).

Valores de PIO	Risco Relativo de GPAA
>15mmHg	1
16-19mmHg	2
19-21mmHg	2.8
22-29mmHg	12.8
30-34mmHg	39

A PIO pode ser considerada um traço de caráter poligênico e que sofre influência de fatores ambientais (Duggal et al., 2005). A maior parte da regulação da pressão intraocular, de 6 a 9 mmHg, acontece sob ação da matriz extracelular da MT (Figura 3) em uma porção denominada região juxtacanicular, outros 0,5 a 2 mmHg da pressão exercida pelo humor aquoso é regulada nas paredes internas do canal de Schlemm e passa através de seus poros. Após o canal de Schlemm e as veias coletoras o HA se mistura ao sangue nas veias episclerais (Johnson, 2006) (Overby et al., 2009).

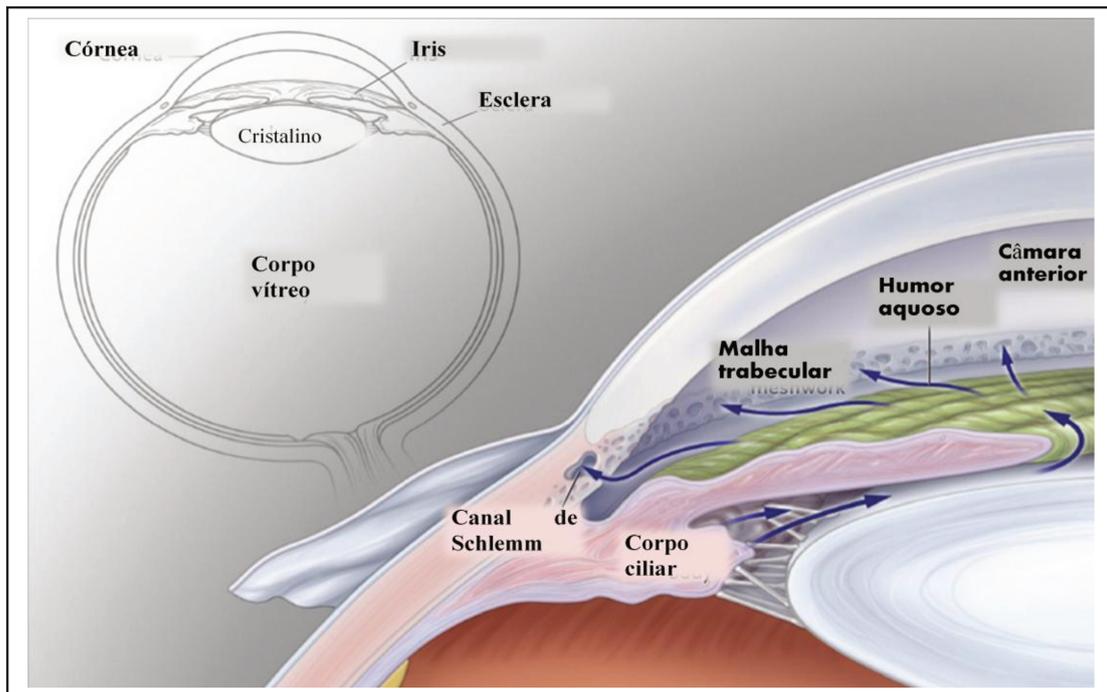


Figura 3. Via de circulação do humor aquoso (Kwon et al., 2009).

Postula-se, como referido anteriormente, que fatores vasculares possam estar envolvidos na fisiopatologia do glaucoma. A teoria vascular sugere que distúrbios do fluxo sanguíneo no disco óptico, devido a fatores vasculares locais ou sistêmicos, desencadeariam o processo de apoptose das CGR (Flammer et al., 2002). Estudos sugerem que alterações vasculares, como vasoespasmo, enxaqueca, anormalidade no fluxo sanguíneo ocular distúrbios na auto regulação da circulação sanguínea sistêmica e/ou ocular estão associados a uma maior susceptibilidade para o desenvolvimento do GPAA (Flammer et al., 2002). O Baltimore Eye Survey demonstrou o aumento de risco de desenvolvimento do glaucoma em até seis vezes, no grupo de indivíduos com pressões de perfusão diastólica, menores do que 30 mmHg (Tielsch JM et al., 1995). Corroborando com este achado, Leske e colaboradores em 2007 constataram que a baixa pressão média de perfusão (menor do que 40 mmHg) apresentou um risco relativo de 2,6 (IC 95% 1,4-4,6) para a incidência de GPAA na população de Barbados seguida por um período de 9 anos (Leske, 2007).

Finalmente, o antecedente familiar positivo inclui-se como um dos fatores de risco para o desenvolvimento do GPAA em diversas populações estudadas (Tielsch JM et al., 1995). Alguns estudos populacionais longitudinais avaliaram os fatores de risco para GPAA, um deles na Austrália e outro em Barbados, no Caribe. O primeiro (estudo na população

australiana) avaliou 3271 indivíduos (85% de participação) com 5 anos de seguimento. A história familiar (HF) de glaucoma apresentou um risco relativo para o desenvolvimento de GPAA de 2,1 (IC 95% 1,03- 4,2) (Le et al., 2003). O segundo estudo avaliou 3222 indivíduos (81-85% participação) seguidos por 9 anos. Dentre os fatores de risco associados ao desenvolvimento do GPAA, a HF de glaucoma foi um dos principais fatores, com risco relativo de 2,4 (IC 95% 1,3-4,6) (Leske et al., 2008).

Existem diversos pontos de partida para o desenvolvimento da doença, cada um deles colocando em ação uma cadeia de eventos. Cada evento tem a capacidade, interagindo ou não com outros fatores, de contribuir para a suscetibilidade do olho para o desenvolvimento de GPAA. Características clínicas associadas ao GPAA, como por exemplo, os aspectos morfológicos do disco óptico e da camada de fibras nervosas da retina, também são influenciados por componentes genéticos (Klein et al., 2004) (van Koolwijk et al., 2007). A herdabilidade estimada para a PIO foi de 0,35 (IC 95% 0,27-0,43), 0,48 (IC 95% 0,35-0,60) para a espessura da camada de fibras nervosas da retina e 0,39 (IC 95% 0,20-0,58) para a rima neural do disco óptico (van Koolwijk et al., 2007). Adicionalmente, um estudo transversal sugeriu que o grupo de pacientes com GPAA e HF de glaucoma está associado com a evolução mais grave da doença, do que o grupo de indivíduos com glaucoma esporádico (Wu et al., 2006).

A maior parte dos casos de GPAA é decorrente de um efeito combinado de diversos fatores de risco, genéticos e ambientais, em que nenhum deles, de maneira independente, tem a capacidade de causar GPAA (Kumar et al., 2016). A heterogeneidade genética observada em formas complexas do glaucoma como a síndrome exfoliativa (SE), glaucoma de pressão normal (GPN) e GPAA pode ser relacionada à presença de diferentes variantes de risco, cada uma exercendo um pequeno efeito patogênico contribuindo para o desenvolvimento da doença, além de fatores de risco ambientais e epigenéticos (Figura 4).

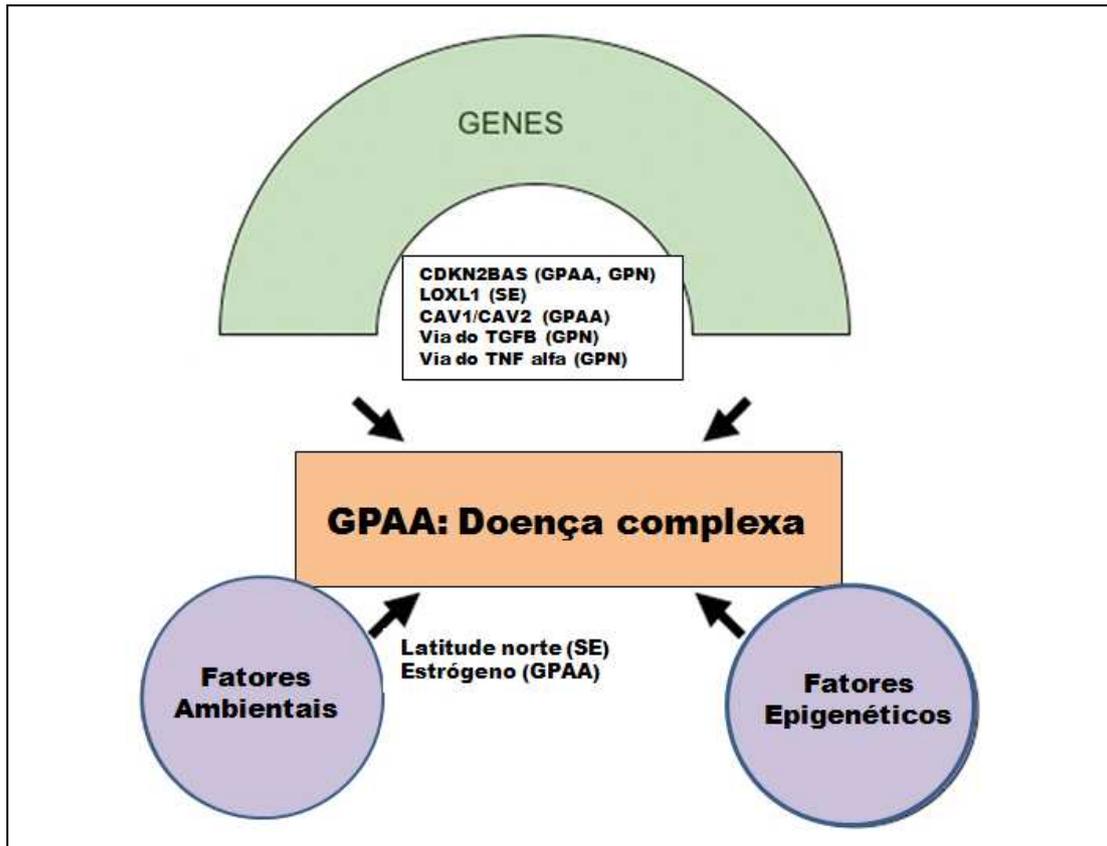


Figura 4. A patogênese complexa do GPAA pode incluir genes, fatores ambientais e epigenéticos (Wiggs, 2012). SE: síndrome exfoliativa, GPN: glaucoma de pressão normal.

Mesmo com a herdabilidade observada no GPAA, estudos de ligação em famílias são pouco eficazes em revelar genes com efeito significativo na população geral. A falta destes achados sugere que novos genes de efeito modesto para a doença devam ser encontrados em estudos de fenótipos bem caracterizado e que avaliam grandes amostras das populações. Para o sucesso dos estudos de associação de amplitude genômica é necessário um grande número de pacientes e controles (Wiggs, 2012). Mesmo com a reconhecida contribuição da HF no desenvolvimento do GPAA, os eventos moleculares decorrentes das alterações genéticas no desenvolvimento desta doença são pouco conhecidos. Abordagens genéticas já demonstraram que o GPAA pode ser herdado tanto como um traço monogênico ou mendeliano, tendendo a ser de início precoce, como também na forma adulta da doença como um traço comum de herança complexa. Recentemente, um grande número de estudos genéticos em pacientes com glaucoma foi publicado; desta maneira, é crescente o número de novos genes que são possivelmente associados com a doença.

1.5 Aspectos genéticos do glaucoma

1.5.1 Classificação

A classificação proposta pela Organização Mundial do Genoma Humano designa para os genes e loci relacionados ao glaucoma a sigla GLC (Raymond, 1997). Os números “1”, “2” e “3” que seguem a sigla geral para os glaucomas representam ângulo aberto (GPAA), ângulo fechado (GPAF) e glaucoma congênito (GCP), respectivamente. Finalmente, as letras “A”, “B”, “C” e assim por diante, indicam o primeiro e os subsequentes loci identificados para determinado tipo de glaucoma (Raymond, 1997). Portanto, o primeiro locus identificado em associação com o GPAA foi denominado GLC1A. Estudos genéticos de ligação em famílias identificaram 21 loci (GLC) para formas mendelianas de glaucoma. Quatro estão ligados às formas autossômicas recessivas infantis e congênitas da doença, GCP (GLC3A-D). Dezesete loci (GLC1A-Q) são relacionados com a forma dominante, tanto juvenil (>3<35 anos) como adulto. O primeiro gene descrito foi o *MYOC*, em 1997 – GLC1A (Stone et al., 1997), seguido pelos genes *OPTN* - GLC1E (Rezaie et al., 2002) e *WDR36* - GLC1G (Monemi et al., 2005). Os genes *ASB10* (GLC1F), *NTF4* (GLC1O), *TBK1* (GLC1P) também foram relacionados ao GPAA (Wirtz et al., 1999) (Wiggs et al., 2000) (Fingert et al., 2011).

Ainda não são reconhecidas as bases genéticas e moleculares para o glaucoma primário de ângulo fechado (GPAF), entretanto estudos apontam para um risco aumentado de 3,5 a 6 vezes entre parentes de primeiro grau de indivíduos com GPAF (Alsbirk, 1976). Admite-se o padrão poligênico multifatorial como o mais aceito para este tipo de glaucoma (Netland et al., 1993).

1.5.2 Identificação de genes

1.5.2.1 Estudos em Famílias

Existem diferentes abordagens quando se trata da descoberta de genes em famílias portadoras de GPAA; a busca direta por meio de sequenciamento da região codificadora de genes candidatos é uma estratégia inicial para o estudo. O estudo de ligação é normalmente empregado em famílias que apresentem padrão de herança mendeliano. Este tipo de análise tem a capacidade de detectar, de forma mais eficiente do que o estudo de associação, alelos

raros de maior influência na determinação do fenótipo. Adicionalmente, alterações do tipo *single nucleotide polymorphisms* (SNP) são consideradas candidatas para a suscetibilidade ao GPAA na forma complexa (Wiggs, 2012).

Tabela 2. Genes e regiões relacionadas ao GPAA por meio de estudos de ligação.

Cromossomo	Gene(s)	Lócus	Local	Autores
1q21-24	MYOC	<i>GLC1A</i>	EUA	(E M Stone et al., 1997)
2cen-q13	<i>ADRA2B, PAX8, IL1A, IL1B e NCK2</i>	<i>GLC1B</i>	Reino Unido	(Stoilova et al., 1996)
2p15-16	<i>EFEMP1, XPO1, OTX</i>	<i>GLC1H</i>	Reino Unido	(Suriyapperuma et al., 2007)
2q33-34	<i>CLK1, HSPE1, CASP8</i>		Caribe	(Nemesure et al., 2003)
3q21-q24	<i>CD10, IL12A, TF, CP</i>	<i>GLC1C</i>	EUA	(Wirtz et al., 1997)
3p21-22	<i>LZTFL1, MAP4</i>	<i>GLC1L</i>	Austrália	(Baird et al., 2005)
4q35.1-q35.2	<i>LRP2BP, UFSP2, CYP4V2</i>	<i>GLC1Q</i>	EUA	(Porter et al., 2011)
5q22.1	WDR36	<i>GLC1G</i>	EUA,	(Monemi et al., 2005)
5q22.1-q32	<i>NRG2, WDR36</i>	<i>GLC1M</i>	China	(Pang et al., 2006)
7q35-q36	ASB10	<i>GLC1F</i>	EUA	(Wirtz et al., 1999)
8q23	<i>EBAG9, TRHR, COL14A1</i>	<i>GLC1D</i>	Reino Unido	(Trifan et al., 1998)
9q22	<i>FOXE1, ROR2, TGFBR1, COL15A1</i>	<i>GLC1J</i>	EUA	(Wiggs et al., 2004)
10p14-p15	OPTN	<i>GLC1E</i>	Reino Unido	(Sarfarazi et al., 1998)
10p12-13	<i>MLLT10, NRPI, MSRB2</i>		Caribe	(Nemesure et al., 2003)
12q-14	TBK1	<i>GLC1P</i>	EUA	(Fingert et al., 2011)
14q1.1	<i>PRKD1, ZNF219</i>		Caribe	(Nemesure et al., 2003)
15q11-q13	<i>NPAPI, GABRB3</i>	<i>GLC1I</i>	EUA	(Allingham et al., 2005)
15q22-24	<i>NR2E3, SMAD6, CLN6</i>	<i>GLC1N</i>	China	(Wang et al., 2006)
19q13.33	NTF4	<i>GLC1O</i>	Europa	(Wiggs et al., 2000)
20p12	<i>BMP2, SLC4A11</i>	<i>GLC1K</i>	EUA	(Wiggs et al., 2004)

Uma vez que o GPAA é uma doença que geralmente manifesta-se mais tardiamente, torna-se difícil a avaliação de famílias com duas gerações ou mais de indivíduos afetados. Além disso, o GPAA tem como uma de suas características a heterogeneidade genética, o que dificulta a análise em comum, de diferentes famílias com esta afecção, para o estudo de ligação. Estima-se que 10% da herdabilidade da forma complexa de GPAA seja devido à presença de mutações nos genes identificados nas formas mendelianas da doença (*MYOC, OPTN, WDR36, CYP11B1, NTF4, ASB10*) (Vishal et al., 2016). No entanto estas alterações foram identificadas predominantemente nas populações de origem caucasiana e asiática e existem poucos dados referentes à população brasileira. É possível que a descoberta

de novos genes para as formas monogênicas da doença promova o entendimento da arquitetura genética envolvida nas formas complexas de glaucoma (Vishal et al., 2016).

O principal gene associado ao GPAA, particularmente o subtipo juvenil é o gene *MYOC*. Apesar de algumas variantes raras deste gene não serem patogênicas (Acharya et al., 2008), mais de 100 mutações relacionadas ao GPAA já foram descritas (www.myocilin.com/variants.php), a grande maioria no éxon 3, que codifica o domínio olfactomedina presente na proteína (Resch and Fautsch, 2009). Os estudos iniciais neste assunto estimaram que apenas de 2% a 4% dos casos de GPAA na forma adulta são relacionados a alterações no gene *MYOC* (Fingert et al., 1999) (Stone et al., 1997); em GPAA-J este número se aproxima de 30% (Wiggs et al., 1998). A presença de altos níveis da proteína miocilina está associada ao glaucoma induzido por esteroides, um subtipo secundário de glaucoma (Polansky et al., 1997). Em células da MT a expressão da miocilina pode ser estimulada por glicocorticoides. Adicionalmente as proteínas mutantes nestas células iniciam a formação de agregados proteicos e não sendo secretadas apropriadamente, acarretam estresse do retículo endoplasmático e apoptose, ocasionando a disfunção da MT e decorrente aumento da PIO (Carbone et al., 2009) (Zode et al., 2014).

A expressão da proteína miocilina pode ser regulada por ação da enzima CYP1B1, produto do gene contido no primeiro locus conhecido do GCP (GLC3A), descrito por estudo de ligação com marcadores microssatélites, que compreendeu 17 famílias das quais 11 não apresentaram recombinação na região 2p21 (Sarfarazi et al., 1995). Da mesma maneira, o gene *NTF4* foi relacionado ao GPAA inicialmente por estudo de ligação (Wiggs et al., 2000), sendo esta relação confirmada por meio de estudos do tipo caso controle, na população alemã (Pasutto et al., 2009) e na população chinesa (Chen et al., 2012).

Recentemente novas abordagens são empregadas na busca pela determinação de mutações em genes com possível papel na fisiopatologia do glaucoma. Estas abordagens utilizam técnicas de sequenciamento de nova geração ou *next generation sequencing (NGS)*, sendo o sequenciamento completo de exomas um exemplo. Este método vem sendo empregado também de forma a complementar os estudos em que a análise de ligação requer a busca em grandes regiões gênicas, compreendendo regiões codificadoras de um grande número de genes. Este, também é um método que viabiliza a busca direta de genes previamente relacionados ao GPAA. Um estudo recente selecionou por meio do sequenciamento total de exomas, uma alteração no gene *EFEMP1* (*EGF containing fibulin-like extracellular matrix protein* ou fator de crescimento epidérmico contendo domínio de

matriz extracelular do tipo fibulina) com possível papel no desenvolvimento do GPAA, segregando com a doença em uma família afro-americana (Mackay et al., 2015). Este gene localiza-se em uma região cromossômica previamente relacionada ao GPAA (*GLC1H*). A detecção de variações do número de cópias de genes também é importante na determinação das causas do GPAA. Sugere-se que a presença de duplicações na região do gene *TBKI* (*GLC1P*) sejam consideradas causadoras do GPAA de pressão normal (Fingert et al., 2011) (Ritch et al., 2014).

Em relação à contribuição ao fenótipo do GPAA, também são conhecidos os efeitos moduladores exercidos por alterações em genes, incluindo o gene associado ao glaucoma congênito primário: *CYP1B1* (Acharya et al., 2008) (Melki et al., 2004) (Wiggs et al., 2013). Wiggs e colaboradores reconheceram também variantes no gene *COL15A1* envolvidas no agravamento do GPAA; os autores detectaram que variantes neste gene apresentam baixa penetrância e estão envolvidos com a idade precoce do desenvolvimento do GPAA, tanto na forma adulta como juvenil. Variantes no gene *COL15A1* (R163H, A200T E V1332I) estão presentes em famílias afetadas, embora seja possível que outras mutações sejam causadoras do GPAA (Wiggs et al., 2013). Um estudo anterior relacionou a região cromossômica 9q22 (*GLC1J*) com o GPAA em um estudo de ligação (Wiggs et al., 2004), que corresponde à mesma região do gene *COL15A1*, neste estudo apenas os genes *FOXE1*, *ROR2* e *TGFBR1* foram considerados candidatos ao desenvolvimento do GPAA. Genes da família do colágeno, como o gene *COL15A1*, estão envolvidos em diferentes doenças, principalmente de comprometimento estrutural na formação de componentes envolvidos em mecanismos de regulação, como por exemplo, da malha trabecular do olho. Wallace e colaboradores descreveram três casos em que o glaucoma estava relacionado à osteogênese imperfeita, em decorrência de mutações no gene do colágeno-1, *COL1A1*, no cromossomo 17. Alterações no colágeno do tipo 1 podem estar envolvidas com o colapso da malha trabecular ou com outros efeitos fisiológicos adversos que acometem a manutenção da pressão intraocular. Efeitos adicionais, na lamina cribrosa e nervo óptico podem aumentar o risco de ocorrência da neuropatia óptica glaucomatosa (Wallace et al., 2014).

É importante observar que existem diferentes critérios a serem levados em consideração, quando se trata de busca por mutações em genes associados ao GPAA. Embora alguns genes não apresentem mutação em sua região codificadora, são encontrados em regiões genéticas que sofreram duplicação ou deleção. Assim, informações sobre a expressão e dosagem gênica também podem fornecer pistas sobre os mecanismos fisiopatológicos da

doença. Adicionalmente, muitos estudos de ligação são inconclusivos no que diz respeito ao reconhecimento do papel das alterações genéticas no desenvolvimento do GPAA. Estas regiões podem abranger milhares de pares de bases, contendo diferentes genes. Além disso, dados sobre função e a presença da proteína nos tecidos do olho envolvidos na fisiopatologia da doença também são importantes critérios para direcionar a busca por genes relacionados ao GPAA.

1.5.2.2 Estudos de associação

Numerosos estudos de associação, de amplitude genômica com variantes comuns ou do tipo caso controle com genes candidatos, buscaram identificar genes de suscetibilidade para formas complexas de GPAA de início adulto. Até o momento já foram descritos dezenas de loci contendo muitos genes, possivelmente, associados ao GPAA. No entanto ainda são necessários mais estudos para se confirmar o papel da maior parte destes genes na etiologia da doença. Não existe um modelo padrão para identificação de genes relacionados ao GPAA. Duas diferentes abordagens são amplamente aplicadas na busca de suas causas genéticas, estudos de genes candidatos e estudos de amplitude genômica (Figura 5). De maneira geral, os estudos levam a busca de alterações nos indivíduos afetados pelo GPAA e ausentes nos controles sem a doença. Estes consistem, principalmente, no rastreamento de mutações, bem como na busca por alterações no número de cópias e posteriormente validação funcional das alterações mediante a utilização de diferentes métodos (Fan et al., 2006).

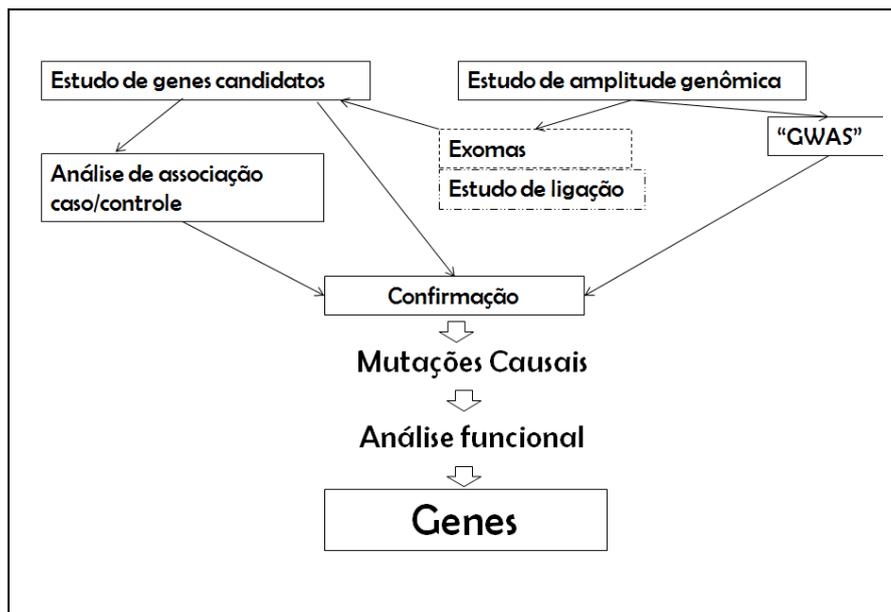


Figura 5. Abordagens técnicas para o mapeamento de genes. Adaptada de *Gene mapping for primary open angle glaucoma* (Fan et al., 2006).

Os estudos de associação em geral tem a capacidade, ao contrário do estudo de ligação, de identificar alelos de risco moderado para o desenvolvimento de determinada doença. Além disso, outra possível vantagem do estudo de associação é o recrutamento mais fácil de indivíduos não relacionados e controles para o mapeamento genético de doenças, principalmente as de início tardio como o GPAA (Wiggs et al., 2000).

Desta maneira outra possibilidade para a identificação de genes causais ou de suscetibilidade para o GPAA são os estudos de associação do tipo caso controle. Os genes candidatos nestes estudos estão relacionados com processos relacionados à fisiopatologia do glaucoma como a regulação da PIO, apoptose, condições anatômicas do disco óptico entre outros. Por meio da estratégia utilizada por estudos de associação de amplitude genômica, por exemplo, identificou-se o gene associado ao glaucoma pseudoexfoliativo, gene *LOXLI* cuja variante de risco, o polimorfismo G153D, está presente em maior proporção entre os indivíduos afetados. Diversos estudos envolvendo diferentes populações replicaram a existência de um aumento de suscetibilidade para o desenvolvimento do glaucoma pseudoexfoliativo na presença da variante de risco G153D no gene *LOXLI* (Thorleifsson et al., 2007) (Wiggs JL, 2008). No entanto, em estudos de associação com o mesmo gene os resultados não foram replicados de forma consistente.

No GPAA os estudos de amplitude genômica como o GWAS são amplamente utilizados na busca por marcadores genéticos com possível importância nos diversos caminhos fisiopatológicos que levam a doença. Após meia década da utilização deste método, dezenas de genes ganharam relevância na etiologia da doença, determinando novos conceitos a respeito dos mecanismos que levam a degeneração, aumento da PIO e das características endofenotípicas relacionados ao glaucoma (Thorleifsson et al., 2010a) (Chen et al., 2015).

Recentemente, entre os genes candidatos a partir dos estudos do tipo GWAS, inclui-se o gene *ABCA1*, localizado na região 9q31, que foi associado com a doença em três diferentes estudos de amplitude genômica (Chen et al., 2014) (Gharahkhani et al., 2014) (Hysi et al., 2014). Por meio de GWAS o gene *ARHGEF12* foi relacionado ao principal fator de risco da doença, a elevação da pressão intraocular (Springelkamp et al., 2015a).

Estudos de GWAS mais antigos, destacaram duas variantes de risco que foram identificadas entre os genes *CAVI* e *CAV2* (rs4236601 e rs1052990) no cromossomo 7q31, por meio de GWAS em indivíduos com e sem GPAA. Ambos os genes são expressos na malha trabecular e células ganglionares da retina, as quais estão envolvidas na patogênese da doença. Estas associações foram replicadas em amostras de casos e controles provenientes da Suécia, Inglaterra, Austrália e China (Thorleifsson et al., 2010a). A família de genes da caveolina codifica proteínas que formam o cavéolo, estruturas invaginadas da membrana plasmática, com importância no transporte de macromoléculas e em vias de transdução de sinais. A *CAVI* pode regular a Sintetase de Óxido Nítrico Endotelial (eNos), uma enzima que produz óxido nítrico, levando à inativação da eNos e produção reduzida de óxido nítrico. O óxido nítrico, quando produzido em excesso, pode causar citotoxicidade, neurodegeneração, apoptose e comprometimento do sistema circulatório. Além disso, a proteína codificada pelo gene *CAVI* parece ser um importante regulador da sinalização de *TGF-beta* por meio do receptor de *TGF-beta* 1. Tanto o óxido nítrico como a sinalização via *TGF-beta* têm sido implicados na patogênese do GPAA (Toda and Nakanishi-Toda, 2007a) (Thorleifsson et al., 2010a).

Utilizando a abordagem do GWAS outro recente estudo avaliou 596 pacientes com GPAA avançado e 3956 controles provenientes da Austrália e Nova Zelândia. Os autores identificaram os alelos de risco associados ao locus do gene *TMCO1* (rs4656461 (G) cromossomo 1q24) com razão de chances de 1,68, $p=6,1 \times 10^{-10}$ e do gene *CDKN2B* (rs4977756 (A) cromossomo 9p21) com razão de chances de 1,50, $p=4,7 \times 10^{-9}$ (Burdon et al.,

2011). Estes resultados foram replicados em três coortes distintas envolvendo pacientes com glaucoma grave e moderado. Em casos esporádicos de GPAA foram encontradas variações no número de cópias, ou *copy number variation* (CNV), nos genes *CDKN2B-AS1* e *TMC01* (Liu et al., 2014), o mesmo estudo detectou alterações do tipo CNV também nos genes *TBK1*, *SIX6* e *ATOH7*, previamente relacionados ao GPAA. Estas alterações, além de serem consideradas raras, não foram encontradas em controles. Estes genes são expressos na íris, corpo ciliar, retina e nervo óptico de olhos humanos. Os genes *CDKN2A* e *CDKN2B* têm sua expressão aumentada na retina de modelos de camundongo com glaucoma (Burdon et al., 2011). Adicionalmente, CGR de camundongos se tornaram mais vulneráveis ao aumento PIO, em animais que possuíam deleções na região dos genes do locus *INK4* (contendo *CDKN2A*, *CDKN2B* e *CDKN2B-AS1*) (Gao and Jakobs, 2016). O SNP rs1063192, do gene *CDKN2B*, foi associado tanto com o tamanho do disco óptico como também com a relação escavação/disco em indivíduos saudáveis e em pacientes com GPAA (Ramdas et al., 2010) (Fan and Wiggs, 2010). Desta maneira, endofenótipos relacionados ao GPAA como a PIO, ECC e as características anatômicas do disco óptico, também apresentam componentes genéticos na sua determinação (van Koolwijk et al., 2007) (Vitart et al., 2010).

Estudos do tipo GWAS também buscaram determinar a associação com parâmetros do disco óptico que representam fatores de suscetibilidade para o GPAA. Poucos destes estudos foram replicados em populações de diferentes ancestralidades, possivelmente devido a diferenças na estrutura genética entre as populações (Janssen et al., 2013). Em algumas populações não existem dados referentes a estudos de rastreamento genético que possam elucidar a relação entre variantes comuns e a suscetibilidade ao GPAA (Vishal et al., 2016). Outra forma de abordagem busca identificar variações no número de cópias de genes candidatos para o GPAA. Em um estudo caso-controle foram observadas duplicações e deleções em genes provenientes de GWAS; variações raras do número de cópias de genes candidatos podem explicar alguns casos de GPAA (Liu et al., 2014).

As ferramentas que utilizam a abordagem de varredura das regiões exômicas atualmente são amplamente aplicadas nas buscas por determinantes genéticos de características oculares, em famílias e pacientes não relacionados. Um estudo na população norte americana de Wisconsin, o Beaver Dam Eye Study, observou por meio de *exome array* que diversos fatores genéticos estão envolvidos na regulação da PIO, principalmente alterações raras (MAF<1%) ou pouco comuns (1%<MAF<5%); o mesmo estudo replicou em 1660 pacientes 2 loci previamente envolvidos com a PIO por meio de GWAS em populações

com ancestralidade européia (Chen et al., 2015). Outro estudo relacionou o lócus do gene *SIX6* com a razão escavação/disco (RED) ($p=7,74 \times 10^{-7}$) (Iglesias et al., 2014). Estudos recentes demonstraram o papel do *SIX6* no desenvolvimento ocular e na morfologia do nervo óptico. Morfantes de *zebrafish* sem a expressão deste gene possuem um desenvolvimento anormal das CGR; a ausência da proteína *six6b* acarreta aumento da expressão do gene *cdkn2b* o que interrompe a progressão do ciclo celular e leva à proliferação anormal destas células. A interação entre *six6b* e *cdkn2b* é importante na regulação do ciclo celular em *zebrafish* e os morfantes apresentaram um fenótipo de olho pequeno (Iglesias et al., 2014). Embora seja inegável a importância do gene *SIX6* em doenças oculares, esta relação pode ser devido a presença de mutações funcionais neste gene. A presença da mutação His141Asn leva ao decréscimo no número de células ganglionares da retina (Carnes et al., 2014) e a alteração Glu129Lys foi relacionada ao aumento da RED em um estudo de exomas na população holandesa (Iglesias et al., 2014). Desta maneira é possível que alterações no gene *SIX6* e não no gene *SIX1* sejam as responsáveis pelo sinal observado em estudos de associação do tipo GWAS (Fan et al., 2011) (Wishal D Ramdas et al., 2011b). A expressão de variantes de risco do gene *SIX6* está relacionada ao aumento da expressão dos genes *CDKN2A* e *CDKN2B* em CGR (Skowronska-Krawczyk et al., 2015), efeito similar ao observado nas mesmas células submetidas ao aumento da PIO em modelo animal de GPAA (Burdon et al., 2011).

Fatores de risco genéticos são pouco conhecidos na população brasileira com GPAA e por meio dos estudos do tipo caso-controle com marcadores do tipo SNP, que foram previamente relacionados ao glaucoma, existe a possibilidade de que sejam determinados grupos de risco genéticos em uma amostra da população brasileira. Além disso, a compreensão e identificação dos eventos moleculares responsáveis pelo desenvolvimento do glaucoma são dificultadas pelo escasso conhecimento bioquímico e celular dos tecidos envolvidos na sua fisiopatologia (disco óptico e seio cameral). O acesso a esses tecidos para estudos de expressão gênica também é limitado e modelos animais só recentemente foram desenvolvidos. A abordagem genética tem a vantagem de identificar as proteínas envolvidas na degeneração óptica glaucomatosa sem a necessidade de obtenção de amostras de tecido ocular dos pacientes. A identificação de genes auxiliará no entendimento da fisiopatologia bem como no desenvolvimento de testes para o diagnóstico e novas terapias para o glaucoma.

1.6 Justificativas do trabalho

Este trabalho buscou reconhecer os diferentes aspectos genéticos envolvidos no desenvolvimento do GPAA por meio de abordagens que permitem determinar associação de alterações genéticas com esta doença.

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

Adicionalmente, a abordagem genética possibilita o entendimento da fisiopatologia do glaucoma sem a necessidade de obtenção de tecidos do olho, assim permitindo o desenvolvimento de testes diagnósticos e novas terapias para o glaucoma.

Esta tese foi dividida na forma de capítulos, de acordo com o tipo de estudo realizado, se estudos do tipo caso-controle ou estudos de famílias e cada capítulo foi subdividido em duas partes, de acordo com seus objetivos e resultados.

2.0 CAPÍTULO 1: ESTUDOS CASO-CONTROLE

2.1 Objetivos

2.1.1 Gerais

Este trabalho teve como objetivo a melhor compreensão das bases genéticas do glaucoma em uma amostra da população brasileira por meio do estudo de genes já reportados como envolvidos na etiologia desta afecção, assim como da avaliação de marcadores genéticos associados ao GPAA.

2.1.2 Específicos

- Realizar estudos de associação do tipo caso-controle por meio da investigação de todas as regiões codificadoras do gene *NTF4* (OMIM 162662).

- Investigar a contribuição dos alelos previamente associados ao GPAA na região dos genes *CAVI* (OMIM 601047) e *CDKN2B* (OMIM 613149) tanto em uma população de pacientes não relacionados, portadores de GPAA como em uma população sem a doença.

2.2 Casuística

Os pacientes com GPAA e controles são provenientes do Ambulatório de Glaucoma, do Departamento de Oftalmologia do Hospital de Clínicas da Unicamp.

O protocolo de pesquisa seguiu os princípios enunciados na Declaração de Helsinque, assim como as determinações do Comitê de Ética em Pesquisa da FCM – UNICAMP (Anexo 1).

2.2.1 Pacientes

Do total de 309 indivíduos, 169 são pacientes com GPAA, selecionados a partir dos critérios de inclusão e exclusão descritos a seguir.

2.2.1.1 Critérios de inclusão

- a. Ângulo aberto no exame de gonioscopia com pigmentação da malha trabecular até grau 2;
- b. Lesão característica de disco óptico, definida como a presença de pelo menos dois dos seguintes critérios: razão escavação/disco $>0,6$, perda localizada da rima neural, hemorragia de disco óptico ou assimetria da razão escavação/disco $>0,2$ entre os dois olhos;
- c. Presença de pelo menos dois exames de campo visual confiáveis revelando perda glaucomatosa característica, definida como o agrupamento de três ou mais pontos não periféricos no gráfico do *Pattern Deviation*, todos deprimidos a $p < 5\%$, com pelo menos um ponto a $p < 1\%$ ou pior, *Glaucoma Hemifield Test Outside Normal Limits* e *Corrected Pattern Standard Deviation* ocorrendo em menos de 5% dos exames perimétricos normais;

2.2.1.2 Critérios de Exclusão

- a. Presença de alterações de segmento anterior compatíveis com glaucomas secundários (ou de desenvolvimento) e/ou alterações de disco óptico e campo visual que mimetizem lesões glaucomatosas;
- b. Diagnóstico de glaucoma primário de ângulo fechado;
- c. Pacientes com GPAA que não puderam ser submetidos à avaliação oftalmológica e genética.

2.2.2 Controles

Foram avaliados 140 indivíduos sem glaucoma, atendidos no ambulatório de Doenças Externas da Disciplina de Oftalmologia do Hospital de Clínicas da UNICAMP, segundo os seguintes critérios:

2.2.2.1 Critério de inclusão

- a. Indivíduos acima de 50 anos de idade;
- b. Razão escavação/disco menor do que 0,4 em ambos os olhos;
- c. PIOs menores do que 21 mmHg em ambos os olhos.

2.2.2.2 Critérios de Exclusão

- a. História familiar de glaucoma;
- b. História familiar de cegueira;

2.3 Métodos

2.3.1 Exame Oftalmológico

Todos os pacientes foram submetidos a exame oftalmológico, incluindo:

- a. Medida da acuidade visual com correção, utilizando a tabela de optotipos de Snellen, localizada a seis metros de distância do paciente;
- b. Medida do erro refracional em dioptrias com refrator Topcon VT-10 (Tóquio, Japão), seguido do cálculo do equivalente esférico (EE). Este valor foi obtido a partir da fórmula: $EE = DE + DC/2$, sendo DE correspondente ao grau em dioptrias esféricas e DC correspondente ao grau em dioptrias cilíndricas;
- c. Biomicroscopia do segmento anterior realizada em lâmpada de fenda Haag-Streit, modelo 900 (Haag Streit, Berna, Suíça);
- d. Tonometria de aplanção com tonômetro calibrado de Goldmann (modelo R-500 – Haag Streit, Berna Suíça). Medida da espessura central da córnea por meio de paquímetro ultrassônico;
- e. Gonioscopia com lente de Posner (Ocular Instruments Inc., Bellevue, EUA);
- f. Biomicroscopia de fundo de olho (retina, com a lente 2.2 (Volk Optical Inc., Mentor, EUA) e disco óptico com a lente esférica Volk + 78 dioptrias (Volk Optical Inc., Mentor, E.U.A) após midríase obtida com a instilação de 1 gota de tropicamida 1%;
- g. Retinografia (Topcon TRC 50X) digital realizada após midríase: aspectos do disco óptico e da razão escavação/disco (escavação) incluindo área do disco óptico, área da escavação, área da rima neural e razão escavação/disco vertical foram avaliadas por meio de dois examinadores independentes.
- h. Perimetria computadorizada branco no branco realizada no perímetro Humphrey Field Analyzer II, modelo 750, software versão A-10 (Zeiss Humphrey Systems, Califórnia, E.U.A) estratégia 24.2 SITA Standard. Os

indivíduos receberam orientações prévias de como proceder durante a realização do exame.

Além do exame oftalmológico, foram coletados dados sobre sexo, idade e raça de ambos os grupos, indivíduos normais e com glaucoma.

2.3.2 Avaliação genética dos indivíduos

2.3.2.1 Obtenção das amostras de sangue e extração de DNA

Foram obtidos 5 a 10 ml de sangue periférico da veia antecubital de todos os participantes, em frasco estéril contendo EDTA 10% como anticoagulante. As amostras de DNA foram extraídas com a utilização do *QIAamp DNA Blood kit*, Qiagen, Alemanha, segundo as instruções do fabricante.

2.3.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR foi realizada utilizando-se os seguintes reagentes, no mínimo: 0,7 µl de cada iniciador na concentração de 20 pmoles, 5 µl do tampão da enzima 10X (Tris-HCl 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM, gelatina 0,01%), 2,0 µl de MgCl₂ 50 mM, 1 µl da mistura de nucleotídeos 10X (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) e 2 unidades de Taq DNA polimerase (InvitrogenTM, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), somados a 0,5 µg de DNA genômico. A seguir as amostras foram amplificadas por meio de aparelho ciclador de temperatura.

As regiões que contêm a região codificadora do gene *NTF4*, e as variantes nos genes *CAVI* e *CDKN2B* foram amplificadas com a utilização de *primers* escolhidos a partir das sequências dos genes. As amplificações por PCR foram executadas em 35 ciclos, as temperaturas de anelamento (TA) e tempo de anelamento estão descritos na tabela 3. As temperaturas e tempo de desnaturação e extensão foram de 72°C por 30 segundos e 92°C por 30 segundos, respectivamente. Foram utilizados 10 pmoles de cada *primer* e 50 ng de DNA em uma reação que continha o volume final de 25 µl.

Tabela 3. Sequências dos oligonucleotídeos, temperaturas e tempos de anelamento.

Primer	Sequência	TA (°C)	tempo (s)
<i>NTF4</i> (1)	5'-GCTCTGGA ACTCCTGACCTC-3'	62°	30
<i>NTF4</i> (1)	5'-CCTTCCTCAGCGTTATCAGC-3'		
<i>NTF4</i> (2)	5'-GGGTGAGCTGGCTGTGTG-3'	64°	30
<i>NTF4</i> (2)	5'-GAAATGTCCCCTCCCACTC-3'		
rs4236601	5'-TGATTCCATGTGTTGCTGTTG-3'	62°	30
rs4236601	5'-CGGGGGTCTCACTCTGTTAC-3'		
rs2157719	5'-CACCGCTGCACTACACTACTACC-3'	64°	45
rs2157719	5'-GCATCTGGCACG TAGTAGGC-3'		
rs4977756	5'-AAGCCCGAGTTTGACAGAGA-3'	61°	30
rs4977756	5'-GCATCTGGCACG TAGTAGGC-3'		

Ao final da reação, 5 μ L do produto da PCR foram misturados a 1 μ L do tampão de corrida 10X *Blue Juice Gel Loading Buffer* (Invitrogen™·Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo e visualizados sob iluminação ultra-violeta (UV). Os fragmentos amplificados foram comparados ao marcador de peso molecular 1Kb *DNA Ladder* (Invitrogen™·Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e, para a realização da reação de sequenciamento, a concentração do DNA da amostra purificada foi estimada a partir da comparação com a intensidade da banda do marcador de peso e massa molecular *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen™·Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). As imagens foram digitalizadas através de equipamento para captura de imagens.

2.3.2.3 Reação de Sequenciamento Sanger

Para a reação de sequenciamento foram utilizados de 10 a 40 ng do produto purificado para um volume final de reação de 20 μ L, contendo 1 μ L de *Big Dye Terminator Ready Reaction v3.0* (ABI PRISM *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit*, Applied Biosystems Foster City, Califórnia, EUA), 4 μ L do tampão de sequenciamento 5X (Applied Biosystems Foster City, Califórnia, EUA) e 1,6 pmol de um dos iniciadores (*sense* ou *antisense*) utilizados na PCR, sendo o volume final completado com água deionizada estéril.

As condições das reações de sequenciamento foram: 25 ciclos a 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos. Após esta reação, as amostras foram novamente purificadas para eliminação dos nucleotídeos não incorporados. Após realização da reação de sequenciamento, aos 10µl do produto final foram adicionados 50 µl de isopropanol 65%, permanecendo em repouso em ambiente escuro por 20 minutos e logo em seguida submetidos à centrifugação por 25 minutos a 25°C a 13000 rpm. Após centrifugação o sobrenadante foi retirado por pipetagem. Foram adicionados, em seguida, 250 µl de etanol 60%, levando-se à centrifugação por 10 minutos a 25°C a 13000rpm. Após centrifugação o sobrenadante foi retirado por pipetagem. Em seguida os tubos foram levados ao banho seco a 90°C por 4 minutos para evaporação do etanol residual, permanecendo no tubo apenas o *pellet* do material tratado aderido à parede do tubo.

As amostras foram ressuspensas em Formamida Hi-Di (Applied BioSystems, Foster City, Califórnia, EUA), desnaturadas a 95°C por 3 minutos, colocadas em gelo e submetidas à eletroforese no analisador automático de DNA ABI PRISM 3130 (Applied BioSystems, Foster City, Califórnia, EUA). 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](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)).

2.3.3 Forma de análise dos resultados

2.3.3.1 Estatística descritiva utilizando o ambiente “R”

Todas as análises estatísticas foram executadas utilizando-se o programa R (R Core Team, 2014). Os conjuntos de pacotes tal qual o *Genetics* foram empregados (Warnes et al, 2013) para se calcular as frequência alélicas e genotípicas, assim como o conteúdo de informação do polimorfismo (PIC), uma estimativa sem viés da heterozigosidade esperada. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significantes. Correção por testes múltiplos quando apropriado foi executado pelo método de Bonferroni. Desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg foram testados com o teste de qualidade de ajuste pelo chi-quadrado.

Para se investigar a associação dos SNPs com o GPAA foi utilizado um modelo de regressão logística (passo a passo) empregando a função *glm* com a ligação com o pacote que contem a distribuição de erro binomial (pacote *stats* do programa R, R Core Team , 2014).

2.3.3.2 Análise *in silico* das mutações

Os programas SIFT (<http://sift.jcvi.org>) e Polyphen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu>) foram utilizados na detecção do impacto da troca de aminoácidos na estrutura e função da proteína. A conservação entre as diferentes espécies, do resíduo de aminoácido foi observada no programa AlignGVGD (<http://agvgd.iarc.fr/>). Para a determinação a respeito das interações dos aminoácidos alterados foi utilizado o programa *Blue Star String* (<https://www.cbi.cnptia.embrapa.br>) e os modelos cristalográficos foram obtidos com o *Swiss Model* (<https://swissmodel.expasy.org/>).

2.4 Resultados e discussão

2.4.1 : Avaliação da associação do gene *NTF4* com o GPAA em uma amostra da população brasileira

O gene *NTF4* está localizado na região 19q13.33, previamente relacionada ao GPAA por estudo de ligação (Wiggs et al., 2000) e foi novamente relacionado à doença em um estudo do tipo caso controle, na população alemã. Foram encontradas sete diferentes mutações em heterozigose, representando 1,7% do casos estudados (Pasutto et al., 2009). Outro estudo, na população chinesa, encontrou mutações em 2 (Gly157Ala e Ala182Val) de 720 casos estudados (0,3%) (Chen et al., 2012), no entanto as variantes, apesar de apresentarem-se como mutações funcionais, não são ainda consideradas como causadoras do GPAA. Outro estudo na população asiática reconhece a alteração Leu113Ser (C.338T>C) como causadora do GPAA em um indivíduo (Vithana et al., 2010). Alguns estudos não foram capazes de demonstrar a associação de mutações no gene *NTF4* com GPAA. Os estudos avaliaram a população caucasiana dos Estados Unidos (Liu et al., 2010) e indiana (Rao et al., 2010).

Mecanismos que levam à apoptose das CGR envolvem diferentes sinais moleculares que podem potencialmente causar ou catalisar a neurodegeneração no glaucoma. O resultado final da degeneração no glaucoma consiste em perda das CGR por uma via de apoptose caspase dependente (Quigley et al., 1995) (Quigley, 1999). Mais de uma década atrás Klocker e colaboradores demonstraram a atuação de fatores neurotróficos na supressão da caspase-3 e conseqüentemente na apoptose das CGR (Klöcker et al., 2000). Em modelos animais que não apresentam a proteína *NTF4*, as lesões isquêmicas na retina são mais graves, confirmando a importância desta proteína para a sobrevivência de células neuronais (Harada et al., 2005).

A região codificadora do gene *NTF4* foi completamente sequenciada em 169 casos e 140 controles. Foram encontradas três diferentes variantes em indivíduos apresentando ou não o GPAA. As variantes encontradas foram R164M e duas variantes em região 3' não traduzida (3'UTR). A mutação R164M corresponde à troca uma guanina por uma timina na posição 632 do gene e resulta na troca do aminoácido arginina por metionina; esta mutação foi encontrada em 6 indivíduos sem o diagnóstico de GPAA e em apenas 1 indivíduo apresentando a doença. A mutação na posição 900 foi encontrada em 7 casos e em

apenas 1 controle (900c>t); a mutação 884a>g em 3'UTR (rs115969617) esteve presente apenas em casos de GPAA; esta mutação é referente à troca A>G na posição 884 (Tabela 4).

Tabela 4. Dados demográficos e clínicos em indivíduos com alterações no gene *NTF4*.

Indivíduo	Sexo	Idade	Glaucoma	PIO	RED (pior olho)	<i>NTF4</i>	Contr/Caso	P valor
1461/4	M	57	-	10	0.2	R164M		
250/9	F	56	+	20	0.8	R164M		
2564/4	M	51	-	12	0.2	R164M		
1073/4	F	54	-	12	< 0.3	R164M		
1448/4	F	80	-	10	< 0.3	R164M	4/1	P >0.05
280/4	F	62	+	21	0.8	900 c>t		
190/9	M	80	+	28	1.0	900 c>t		
402/4	M	41	+	16	0.7	900 c>t		
453/4	F	65	+	23	1.0	900 c>t		
454/4	M	44	+	30	1.0	900 c>t		
484/4	M	43	+	27	0.6	900 c>t		
1060/4	F	62	-	10	< 0.3	900 c>t	1/6	P > 0.05
191/9	F	66	+	20	0.8	884 a>g		
400/4	M	57	+	24	1.0	884 a>g	0/2	

RED: Razão escavação disco, PIO: Pressão intraocular. Contr: Controle. +: glaucoma. -: sem glaucoma. M: masculino. F: feminino

O aminoácido R164 encontra-se na extremidade da estrutura formada pelo dímero de neurotrofina, que forma o complexo proteico que ativa seu ligante, o receptor TrkB. O complexo proteico é apresentado na figura 6A, em destaque a posição 164 no dímero contendo os aminoácidos R164 (verde e azul) e M164 (branco e amarelo). As setas amarelas apontam os dois ligantes TrkB em ligação com o dímero de NTF4; a imagem foi obtida à partir dos dados cristalográficos depositados no banco de dados *Protein data bank* 1HCF (Banfield et al., 2001). As interações de interface do resíduo R164 acontecem apenas com os dois diferentes aminoácidos (R164 e D162) que interagem com a arginina na posição 164 com uma distância que indica que não são importantes na formação do dímero formado por NTF4 (figura 6B). As figuras 6C e 6D foram obtidas a partir dos dados de estrutura cristalográfica

1B98 (Robinson et al., 1999), obtidas por similaridade ao homodímero de NTF4 e apresentam as interações do aminoácido R164 e da variante M164 com os aminoácidos da mesma cadeia em monômero e foram geradas por meio da ferramenta que gera o modelo cristalográfico *Swiss Model* associada ao programa *Blue Star String* que destaca as interações. Na figura 6C são apresentados os contatos internos do resíduo R164 (D162, H165 e R206 e R163). Após a troca de R164 para M164 duas das interações com H165 são perdidas e uma das interações com M162 (figura 6D), mas a metionina na posição 164 permanece interagindo com D162, H165 e R206 e R163.

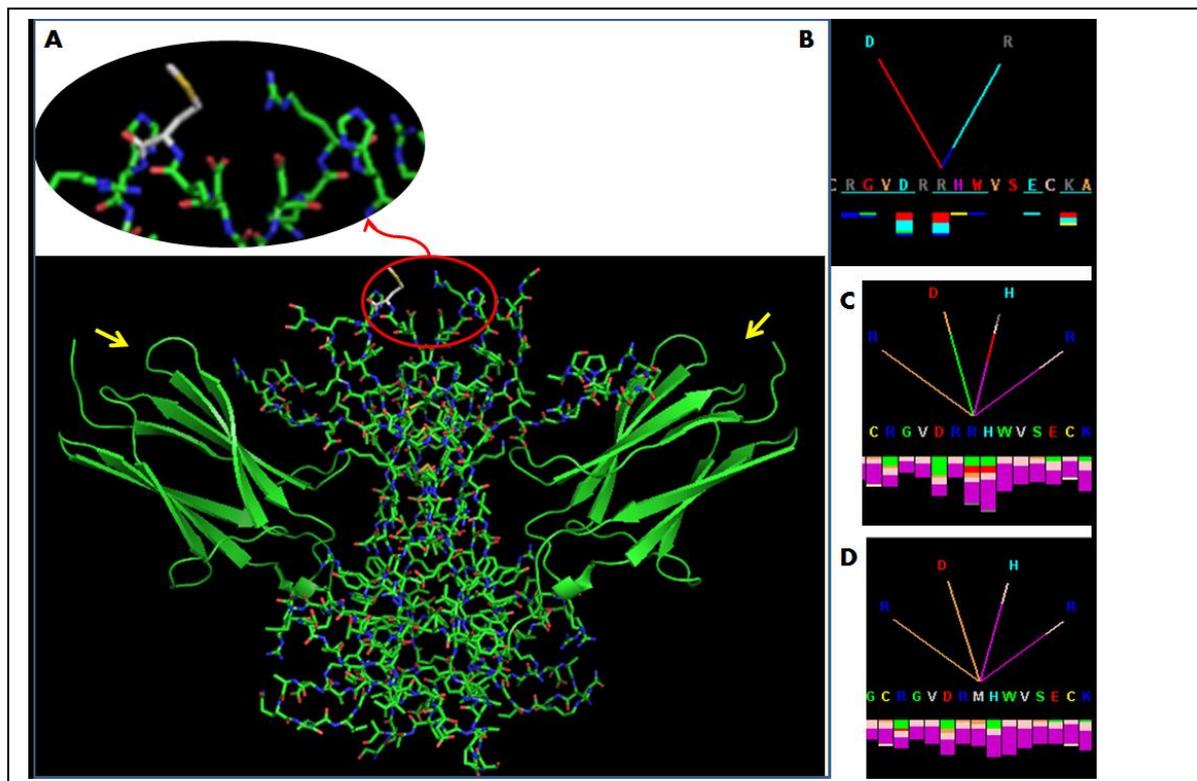


Figura 6. Representação da proteína *NTF4* em dímero e ligação com o receptor formando um complexo; A) em destaque o aminoácido R164 e M164; B) contatos de interface de R164; C) contatos internos de R164; D) Contatos internos de M164.

Por meio do programa AlignGVGD (Tavtigian et al., 2006) o resultado obtido em relação à alteração estrutural na proteína, ClassC65, sugere alteração funcional. No entanto, não é incomum que alterações classificadas no mesmo nível sejam encontradas em indivíduos saudáveis (Chen et al., 2012). De acordo com o programa *SIFT* a mutação é considerada deletéria. O Polyphen2 (Adzhubei et al., 2010), outro programa capaz de avaliar impacto de

mutações foi utilizado. Os resultados referem-se à conservação do aminoácido alterado por meio de comparação entre diferentes espécies e também é fornecida informação referente ao impacto da alteração que, neste caso, foi considerada provavelmente deletéria (score =0.98) com índices de sensibilidade=0.75 e especificidade=0.96 para a comparação HumDiv. Para a comparação HumVar esta foi classificada como possivelmente deletéria (score=0.79) com sensibilidade =0.75 e especificidade=0.87. Embora o aminoácido R164 seja conservado, assim como observado em outros estudos, alterações em aminoácidos conservados e variações que alteram a estrutura e função da proteína já foram encontradas em indivíduos sem GPAA (Chen et al., 2012). Este estudo, assim como outros estudos que buscaram encontrar associação de mutações no gene *NTF4* com GPAA, não foi capaz de determinar esta associação, e inesperadamente, foi observado um grande número de indivíduos não afetados apresentando a mutação R164M. Alterações classificadas como C65 (Poliphen2) e afetando a função da proteína (SIFT), assim como neste estudo, já foram encontradas em indivíduos que não apresentam GPAA. Alterações em genes como *MYOC* e *OPTN* também já foram encontradas em indivíduos sem GPAA; acredita-se que estas alterações sejam de penetrância variável e desta maneira outras causas moleculares podem estar envolvidas no desenvolvimento da doença. Foi previamente sugerido que a Neurotrofina-4 esteja envolvida na sobrevivência das células ganglionares da retina em modelos animais apresentando lesão isquêmica. Observou-se uma alteração na regulação da expressão deste gene, o que levou a um aumento nos níveis de RNA mensageiro do mesmo. Adicionalmente, em modelos animais que não apresentam a proteína NTF4, as lesões isquêmicas na retina são mais graves confirmando a importância desta proteína para a sobrevivência das células nervosas (Harada et al., 2005). No entanto sabe-se que a NTF4 não possui função muito relevante na transdução de sinal da via de tirosina kinase por meio da ativação do receptor TrkB, sendo este mecanismo dependente primordialmente de outra neurotrofina, *Brain Derived Neurotrophin* (BDNF). Alguns estudos em diferentes populações não foram capazes de demonstrar a associação de mutações no gene *NTF4* com GPAA. Os estudos avaliaram a população caucasiana dos Estados Unidos (Liu et al., 2010), indiana (Rao et al., 2010) e a população chinesa, na qual apenas três diferentes mutações foram encontradas (Chen et al., 2012).

Caso ocorra a dimerização, a alteração estará localizada na extremidade da estrutura, havendo a possibilidade de que esta não interfira na ligação com o receptor. O aminoácido R164 interage com R206; uma mutação que já foi descrita por Pasutto e

colaboradores e a interação entre os dois aminoácidos tornou-se fraca após a troca de arginina por glicina em R206G (Pasutto et al., 2009).

A proteína contendo a alteração R164M foi encontrada em um número maior de controles do que de casos. É possível que esta alteração implique em um melhor funcionamento da proteína, com maior capacidade de ativação do receptor TrkB, o que implicaria em uma melhora na capacidade de atuação como fator de sobrevivência para células ganglionares da retina. É necessário comparar a capacidade de fosforilação do receptor TrkB de R164M em relação a proteína selvagem por meio da análise densitométrica de TrkB fosforilado após *immunoblotting*, desta forma, será possível determinar a real capacidade funcional da proteína NTF4 R164M em comparação com a proteína selvagem.

A alteração na posição 884a>g em 3'UTR, de acordo com o HAPMAP possui uma frequência alélica de 0,069 em uma amostra da população africana; adicionalmente o rs115969617 foi observado em alguns indivíduos representantes da população americana com frequência alélica de 0,012. A variante 900c>t ainda não foi descrita em outros estudos. Ambas as alterações em região 3'UTR descritas neste estudo, provavelmente, não representam um risco ao desenvolvimento do GPAA ,pois, aparentemente não influenciam no funcionamento do gene por não se encontrarem em regiões regulatórias ou sítio para ligação de moléculas de RNA com função regulatória (microRNA e RNA longo não codificante).

2.4.2 : Association of polymorphisms in *CAVI/CAV2* and *CDKN2B-AS1* genes with the risk of primary open-angle glaucoma in a Brazilian population.

HUGO FREIRE NUNES, Laboratory of Human Genetics, Center for Molecular Biology and Genetic Engineering - CBMEG, University of Campinas - UNICAMP, Campinas, SP, Brazil

Zip Code: 13083-875 — P.O. Box: 6010. E-mail: fn.hugo@gmail.com

JOSÉ PAULO CABRAL DE VASCONCELLOS, Department of Ophthalmology, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas - UNICAMP, Campinas, SP, Brazil

Zip Code: 13083-875 — P.O. Box: 6010. E-mail: cabraljp@uol.com.br

GALINA ANANINA, Laboratory of Human Genetics, Center for Molecular Biology and Genetic Engineering - CBMEG, University of Campinas - UNICAMP, Campinas, SP, Brazil

Zip Code: 13083-875 — P.O. Box: 6010. E-mail: g.ananina@gmail.com

VITAL PAULINO COSTA, Department of Ophthalmology, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas - UNICAMP, Campinas, SP, Brazil

Zip Code: 13083-875 — P.O. Box: 6010. E-mail: vpcosta@uol.com.br

NILSON IVO TONIN ZANCHIN, Oswaldo Cruz Foundation, Carlos Chagas Institute, Curitiba, PR, Brazil

Zip Code: 81350-010 — E-mail: nizanchin@gmail.com

MÔNICA BARBOSA DE MELO*, Laboratory of Human Genetics, Center for Molecular Biology and Genetic Engineering - CBMEG, University of Campinas - UNICAMP, Campinas, SP, Brazil

Zip Code: 13083-875 — P.O. Box: 6010. E-mail: melomb@uol.com.br

Corresponding author: Mônica Barbosa de Melo

Address: Laboratory of Human Genetics, Center for Molecular Biology and Genetic Engineering (CBMEG), University of Campinas - UNICAMP, Campinas, SP, Brazil, Zip Code: 13083-875 — P.O. Box: 6010. E-mail: melomb@uol.com.br

Phone: +55-19-3521-1143

Running-head: Polymorphisms in *CAVI/CAV2* and *CDKN2B-AS1* and risk of POAG

Acknowledgements

We thank São Paulo Research Foundation, FAPESP (grants 2011/04073-7, 2010/18353-9, 2002/11575-0) for the financial support and the patients for their valuable collaboration.

ABSTRACT

Large-scale genome-wide association studies (GWAS) have identified several susceptibility variants associated with POAG, among which rs4236601 (*CAVI/CAV2*) at chromosome 7q31 and rs4977756 and rs2157719 at chromosome 9p21 (*CDKN2B-AS1*). The purpose of this study was to investigate whether these variants contribute to POAG incidence in a sample of a Southeastern population from Brazil and to determine the best-fitted genetic model for these single nucleotide polymorphisms (SNPs). A case-control study with three hundred and nine individuals, 169 with POAG and 140 controls, was conducted through PCR and direct sequencing. We observed that G/A and A/A genotypes of the rs4236601 were significantly more frequent in the POAG group than in non-affected individuals ($p = 0.0464$ and $p = 0.0454$, respectively). Regarding rs2157719, only the heterozygous genotype (A/G) had a significant effect, and occurred more frequently in the control group ($p = 0.0005$). Allele frequencies also differed between cases and controls for rs4236601 (OR: 1.57, CI95%: 1.108 - 2.225), but not for rs2157719 (OR 1.37, CI95%: 0.944 - 2.002). No differences were observed for genotype and allele distributions in relation to rs4977756. Our results suggest that the best-fitted genetic models are additive and codominant for rs4236601 and rs2157719, respectively. For rs4236601 (*CAVI/CAV2*) and rs2157719 (*CDKN2B-AS1*) it was possible to replicate previously published results and reinforce the importance of these variants in relation to POAG.

Keywords: glaucoma, caveolin, cyclin-dependent kinase, variants, intraocular pressure, optic nerve

1. INTRODUCTION

Glaucoma is a progressive neurodegenerative disease of multifactorial etiology. It is the second leading cause of blindness worldwide, affecting more than 60 million people. The disease is characterized by progressive loss of retinal ganglion cells, clinically observed as progressive optic disc cupping with corresponding visual field defects. Among several forms of glaucoma, the most prevalent is primary open angle glaucoma (POAG). Although intraocular pressure (IOP) is considered the most important risk factor for the development of POAG, family history has been consistently demonstrated by epidemiological studies to be another relevant risk factor (Quigley, 2011).

The comprehension of the genetic basis of POAG in the field of molecular biology and gene identification started in 1993 with the description of the first locus (*GLC1A*) by Sheffield and colleagues (Sheffield et al., 1993), followed by the identification of the Myocilin (*MYOC*) gene in 1997 by Stone and co-workers (E. M. Stone et al., 1997). Since then, several loci (from *GLC1B* to *GLC1Q*) but few genes have been mapped for POAG, including Optineurin (*OPTN* at *GLC1E* locus) (Sarfarazi et al., 1998), WD40-repeat 36 (*WDR36* at *GLC1G* locus) (Monemi et al., 2005) and Ankyrin repeat- and soxs box-containing protein 10 (*ASB10* at *GLC1F*) (M. K. Wirtz et al., 1999). The complex nature of the disease phenotype combined with the vast genetic heterogeneity suggests the involvement of multiple pathological processes and molecular pathways in the development of POAG (Vithana et al., 2010). Since 2009, large-scale genome-wide association studies (GWAS) have been used in the identification of susceptibility variants associated with POAG; however the molecular basis of this disease remains poorly understood (Nakano et al., 2009a).

Among several common risk alleles for POAG mapped through GWAS, single nucleotide polymorphisms (SNPs) rs4236601 [*CAVEOLIN 1 (CAV1)/CAVEOLIN 2 (CAV2)*] at chromosome 7q31 and rs4977756 and rs2157719 at chromosome 9p21 [*CYCLIN-DEPENDENT KINASE INHIBITOR 2B ANTISENSE 1 (CDKN2B-AS1)*] are the focus of our work. The rs4236601 SNP (G to A) was identified by Thorleifsson and co-workers in a population-based study performed in Iceland and is located in an intergenic region between the caveolin genes (*CAV1* and *CAV2*), both expressed in the trabecular meshwork and retinal ganglion cells (Thorleifsson et al., 2010b). The SNPs rs4977756 (A to G) and rs2157719 (A to G) at chromosome 9p21 were identified in a region that harbors *CDKN2A*, *CDKN2B* and *CDKN2B-AS1*, all expressed in the iris, ciliary body, retina and optic nerve (Burdon et al., 2011) and have been implicated in different disorders like diabetes (Scott et al., 2007) myocardial infarction (Helgadottir et al., 2008) and gliomas (Shete et al., 2009). Several

variants in this region have been associated with either protection or increased risk for POAG (Burdon et al., 2011) (Wishal D Ramdas et al., 2011a) (Wiggs et al., 2012) (Burdon et al., 2012) (Cao et al., 2012).

Results from different studies are contradictory regarding the importance of polymorphisms in regions 7q31 and 9p21 in relation to POAG etiology and, to our knowledge; there are no reports in the Brazilian population. In order to investigate whether these recent identified variants contribute to POAG development in a sample of the Southeastern population from Brazil, we aimed to determine the allelic and genotypic frequency distribution of rs4236601 variant at chromosome 7q31 (*CAVI/CAV2*) and rs4977756 and rs2157719 variants at chromosome 9p21 (*CDKN2B-AS1*) in a case-control study, as well as to find the best-fitted genetic model for the SNPs.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Patients and controls

This study was approved by the Ethics Committee of the University of Campinas and comprised a total of 309 individuals, 169 with POAG and 140 controls. Patients were recruited in the Glaucoma Service and controls in the General Ophthalmology Service at the Clinical Hospital, University of Campinas. All participants signed the informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki. An ophthalmological examination, including visual acuity measurement, slit-lamp biomicroscopy, Goldmann applanation tonometry, gonioscopy and optic disc evaluation (with the pupils dilated and using a 78-dioptre lens), visual field evaluation (Humphrey 24.2, Sita Standard; Zeiss Humphrey Zeiss System, Dublin, CA, USA), and an interview to collect demographic data were performed. The definition of POAG was based on structural and functional changes observed in the optic disc and visual field evaluations, respectively, as well as an open angle at gonioscopy. The optic disc was considered glaucomatous if it had at least two of the following signals: thinning of the neuroretinal rim, hemorrhage, notch, excavation greater than 0.7, or asymmetry of cup/disc ratio greater than 0.2. Glaucomatous visual field defect was defined as a pattern standard deviation outside of the 95% normal limits or a glaucoma hemifield test result outside of the 99% limits. The inclusion criteria for the control group were optic disc and visual field without signs of glaucomatous damage as well as IOP less than 18 mmHg in both eyes. Also, individuals were excluded if they had family history of glaucoma or vision loss.

2.2. DNA extraction and sequencing analysis

DNA was obtained from 200 μ l of peripheral blood cells through GenElute™ Blood DNA Kit, Sigma Aldrich St. Louis, MO, USA. Genotypes were obtained through polymerase chain reaction (PCR) followed by Sanger direct sequencing method. Primers were designed using the genomic data bank GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Sequence and annealing temperatures are depicted in Table 1. Thirty-five cycles were required for the PCR reaction encompassing 30 seconds for denaturation, annealing and extension, except for rs2157719 primers that required 45 second for the extension step. Direct sequencing was performed with BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1® (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA), in the ABI Prism 3530 DNA Analyzer (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) and FinchTV program (http://www.cambridgesoft.com/Ensemble_for_Biology/FinchTV/) was used to analyze sequencing data.

2.3. Statistical analysis

All statistical analyses were performed using R software (R Core Team, 2015). Additional to the core packages, a genetics package was employed to calculate allele and genotype frequencies, as well as polymorphism information content (PIC). Deviation from Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) was tested by the Chi-square goodness-of-fit test. The Student's T-test and the Wilcoxon-Mann-Whitney test were applied for the comparisons of continuous variables; the last one was done with the aid of *wilcox.test* function (R Core Team, 2015). P-values < 0.05 were considered statistically significant. Correction for multiple comparisons was performed using the Bonferroni method whenever appropriate.

In order to investigate the association of SNPs rs4236601, rs2157719, and rs4977756 with glaucoma, we fitted logistic regression model (stepwise) employing the *glm* function with the link to the binomial error distribution (R Core Team, 2015). Our null hypothesis was an absence of relationship among response and explanatory variables. We developed one complete multilocus model taking affection state as the response variable and including all three polymorphisms (their respective genotypes) and interaction terms as explanatory variables, *i.e.*, primarily assuming that each combination of genotypes may have a different effect. Subsequently, we proceeded with stepwise backward elimination of the variables to choose the best model. Each step of elimination was followed by ANOVA, employing the Chi-square difference test. Finally, we attempted to find the best-fitted genetic model. Genotype assignments under different inheritance modes are listed in Table 2; they were

slightly different depending on the choice of the allele taken as a reference. For rs2157719, the co-dominant model, for example, admits that each allele in the model has the same importance, different from additive (weight 1 for one G allele, 2 for two copies - G/G genotype and 0 for its absence), dominant model (weight 1 for any genotype carrying the G allele, 0 for its absence) and recessive (weight 1 for two G alleles and 0 for heterozygotes or its absence). On the other hand, for rs4236601 the additive model admits weight 1 for one A allele, 2 for two copies - A/A genotype and 0 for its absence, the dominant model admits weight 1 for any genotype carrying the A allele, 0 for its absence; the recessive model admits weight 1 for two A alleles and 0 for heterozygotes or its absence. The G-power software (<http://gpower.hhu.de/>) was employed to estimate the effect of rs4977756 in our population and to extrapolate our knowledge to infer sample size for the upcoming studies. We used the same software to perform a post-hoc power calculation for the three SNPs.

3. RESULTS

3.1. Demographic and clinical data

Three hundred and nine individuals were evaluated in this age-matched case-control study (cases were represented by 78 males and 91 females and controls by 54 males and 86 females). The mean age was 67 years with standard deviation (SD) 13 in cases and 66 years with SD 9 in controls. IOP measures were obtained from the worst eye at the time of the first evaluation at the Glaucoma Service. Application of Shapiro and Wilk's W test (Royston, 1982) to the distribution of IOP showed that it was not normal only in the control group: $W = 0.968$, $p\text{-value} = 0.349$ for POAG patients; $W = 0.831$, $p\text{-value} = 0.046$ in the control group. Hence, we applied the Wilcoxon-Mann-Whitney test to compare the groups. As it was expected, the difference in IOP distribution between POAG and controls was highly significant: $p\text{-value} = 2.157e-05$. No differences were observed in the distribution of age and gender between the groups.

3.2. Association of polymorphisms with POAG

Genotype and allele distribution in affected and control groups, as well as their basic descriptive statistics; polymorphism information content (PIC) and HWE are described in Table 3. Hardy-Weinberg Equilibrium was observed for SNPs rs4236601 (*CAVI/CAV2*) and rs4977756 (*CDKN2B-AS1*) in both cases and controls. SNP 2157719 showed a depart from HWE ($p=0.048$ in the control group and $p=0.005$ in the POAG cohort, the last one held the significance after multiple testing correction – 0.144 and 0.015, respectively). This effect

was mainly due to a deficit of heterozygotes in the affected group and an excess of those among the control individuals. Such a depart could be caused by the sampling criterion of individuals on the basis of the presence of a disease phenotype. Evidently, there are a number of other reasons, but we cannot exclude true association with the disease, and hence we proceeded with our analysis (Nielsen et al., 1998) (Wittke-Thompson et al., 2005) (Zou and Donner, 2006).

We can observe that G/A and A/A genotypes of the polymorphism rs4236601 were significantly more present in the POAG group than in non-affected individuals, whereas for the polymorphism rs2157719, only the heterozygous genotype (A/G) had a significant effect, most frequently occurring in the control group. Allele frequencies also differed between cases and controls for rs4236601 (OR: 1.57, CI95%: 1.108; 2.225), but not for rs2157719 (OR 1.37, CI95%: 0.944; 2.002). No differences were observed for genotype and allele distributions in relation to the variant rs4977756.

In order to perform a regression model adjustment, we took our initial full model with all predictors and eliminated interaction terms that did not show any association with the affection state and were accounting for the excessive complexity of the model. Next, rs4977756 was eliminated, resulting in the final model fitted for polymorphisms rs4236601 and rs2157719. Some of the parameters of the fitted model are shown in Table 4 (without adjustment steps). The null hypothesis was rejected for polymorphisms rs4236601 and rs2157719.

Subsequently, we examined the influence of the genetic model on the observed effects for the polymorphisms rs4236601 and rs2157719. Characteristics of the considered genetic models, such as degrees of freedom (Df) and Akaike's Information Criterion (AIC) values of codominant, additive, recessive, and dominant models are shown in Table 5.

The lowest AIC index corresponds to a higher likelihood of the model. Consequently, the best model is the one showing the lowest AIC. For SNP rs4236601, ANOVA did not show a significant difference between the models ($p=0.7559$). However, based on the AIC, we can suggest additive as a better genetic model. For SNP rs2157719, AIC index and ANOVA clearly indicate codominant model as the best genetic model ($p=0.0007$).

The SNP rs4977756 did not show any association with POAG in our study. Altogether, in view of the fact that its association with POAG was communicated in other studies (Wiggs et al., 2012) (Burdon et al., 2012) (Liu et al., 2013), we estimated its effect in our population and attempted to extrapolate our knowledge to infer sample size for the

upcoming studies. Assuming additive heritability for this polymorphism, OR is equal to 0.84 (CI95%: 0.59, 1.20), which results in a suggestion of the sample size of 6304 individuals for the experimental design with logistic regression analysis and a statistical power of 85% (G-power software, options: binomial distribution, one-tail statistics). Under the assumption of co-dominant heritability, the estimate of the suggested sample size is less conservative and decreases to 2270 individuals (OR: 0.74, CI 95%: 0.30, 1.83). The post-hoc power calculation showed that our sample had a power of 26% for rs4977756, 84% for 2157719 and 93% for rs4236601, considering an alpha of 0.05% (G-power software, options: binomial distribution, one-tail statistics).

4. DISCUSSION

In order to verify the effect of three previously described SNPs (rs4236601, rs2157719 and rs4977756) in Brazilian POAG patients, we conducted a case-control study and confirmed the association of two of the variants (rs4236601, rs2157719) in a cohort of 309 individuals from the State of São Paulo.

The rs4236601 SNP is located on chromosome 7q31, region of the genome that contains the caveolin genes *CAV1* and *CAV2*. Caveolins facilitate and modulate high-fidelity intracellular signaling pathways and are involved in a wide range of cellular processes, including vesicular transport, adhesion and cell motility, cholesterol homeostasis and tumor suppression (García-Cardena et al., 1997) (Fuchshofer and Tamm, 2009a) (Toda and Nakanishi-Toda, 2007b). *CAV1* protein has been shown to be an important regulator of nitric oxide NO (Ju et al., 1997) and TGF-beta signaling (Fuchshofer and Tamm, 2009b), both implicated in the pathogenesis of POAG (Toda and Nakanishi-Toda, 2007b). We observed that the A allele of the polymorphism was significantly more frequent in the POAG group than in non-affected individuals, in accordance with some studies.

Since its identification in 2010 by Thorleifsson and co-workers, many independent studies have investigated this variant and its relation with the disease in different populations; conflicting results have been reported (Thorleifsson et al., 2010b) (Cao et al., 2012) (Abu-Amero et al., 2012) (Chen et al., 2015) (Loomis et al., 2014) (Wiggs et al., 2011). Our observations replicate other studies. In the US population, Wiggs and colleagues analyzed patients and controls from the GLAUGEN study and observed the association of rs4236601 with POAG overall but not with the subgroup of high IOP. However, this association was found to be more significant in women, by GWAS (Wiggs et al., 2011). In a subsequent study, this time evaluating both GLAUGEN and NEIGHBOR data sets, Loomis et al reported

association with POAG overall (no stratification on IOP), with gender (significance only in women) and with early paracentral loss (Loomis et al., 2014). Chen and co-workers related the association of this variant in glaucomatous patients with elevated IOP in a population-based cohort from the Beaver Dam Eye Study through exome sequencing (Chen et al., 2015). On the other hand, Kuehn and collaborators studied an US-cohort from Iowa, consisting of 545 POAG patients and 297 control subjects, and did not observe a relationship between rs4236601 and POAG (Kuehn et al., 2011). In an African American cohort, Liu and cols observed a nominal significance between this variant and POAG, but this association did not survive correction for multiple testing (Liu et al., 2013). In relation to non-US populations, no statistically significant associations were found in Ghanaian subjects (Liu et al., 2013) in an Afro-Caribbean cohort from Barbados (Cao et al., 2012) and in a recent study of individuals from Saudi Arabia (Abu-Amero et al., 2012).

Overall data indicate that the effect of this SNP in relation to POAG is highly variable intra-US populations and inter US and non-US populations with different minor allele frequencies (MAF) among ethnicities (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>). In our sample, the MAF was 35.20 in cases and 25.71 in controls. Brazilians are very admixed, with populations that came from Africa and Europe added to our native Indians. The frequency in our control population was similar to that observed in Utah residents with Northern and Western European ancestry (CEU=27.90) and also to a sample from Tuscan, Italy (TSI=28.90). However, the frequency observed in Africans represented by Yoruba (YRI=42.90) was higher than in our sample and Amerindians are not consistently represented to be used in the comparison.

Sample size is always a concern. Although the number of patients and controls is small when compared to other studies, our OR is higher than most of them, confirming the influence of this variant in relation to the disease in our population (Thorleifsson et al., 2010b) (Wiggs et al., 2011) (Loomis et al., 2014) (Kuehn et al., 2011).

In our analysis, we tested the importance of different inheritance modes in relation to the disease. Although the difference among the genetic models was not significant, based on the AIC index, we can indicate the additive effect (AIC 423,68) for the rs4236601 as the best model. This finding means that each copy of the allele A confers an additive increase in POAG risk. The very similar AIC (424.16) was observed for the dominant model that admits the protective effect of the G allele only in the presence of two copies (GG genotype).

Glaucoma risk alleles at 9p21 have already been associated with the presence of both normal tension glaucoma (NTG) and advanced POAG, suggesting that *CDKN2B-AS1*

contributes to optic nerve degeneration in glaucoma (Wiggs et al., 2012). Besides the *CDKN2B-AS1* antisense RNA gene, the 9p21 locus contains *CDKN2A* and *CDKN2B* tumor suppressor genes, which are regulated by *CDKN2B-AS1* (Burdon et al., 2011). *CDKN2B* is an inhibitor of cyclin-dependent kinase 4 (CDK4), which has an essential role in cell cycle progression (Greene et al., 2007). *CDKN2A* has been shown to be downregulated in some neurodegenerative disorders, indicating a possible involvement in the pathogenesis of glaucoma (Pogue et al., 2010). Our results showed that the rs4977756 SNP was not associated with the disease, whereas rs2157719 was associated with protection against POAG.

Data regarding these SNPs can have a wide variation according to the studied population. In the US population, Wiggs and co-authors studying patients from the GLAUGEN and NEIGHBOR consortiums, observed that rs2157719 and rs4977756 conferred a protection against the disease both in the overall POAG GWAS and in the NTG meta-analysis (Wiggs et al., 2012). Looking for an association between *CDKN2B-AS1* SNPs and POAG features, Pasquale and colleagues reported that, for each minor allele of rs2157719, a 24% increased risk of “peripheral VF loss only” in one or both eyes was observed. After controlling for CDR, this association was not sustained (Pasquale et al., 2013). Liu and colleagues investigated SNPs in several candidate regions previously associated with POAG in African Americans (1150 cases and 999 controls) and from Ghana (483 cases and 593 controls). In their analysis, rs2157719 was not evaluated and rs4977756 showed association with the disease in the NPG subgroup, but did not survive correction for multiple tests (Liu et al., 2013). In contradiction to the report from Wiggs et al and supporting the observations described by Liu and co-workers, Burdon and collaborators described an association between rs4977756 and the risk of the disease. Their study included the analysis of 590 patients with advanced OAG from the Australian and New Zealand Registry of Advanced Glaucoma (ANZRAG) and the Glaucoma Inheritance Study in Tasmania (GIST), as well as 3,956 controls from Australia (Burdon et al., 2011). Chen and co-workers conducted another study that confirmed the possible protective effect of rs2157719, and reported the investigation of 13 previously reported SNPs in a Han Chinese population. They observed that rs2157719 was associated with protection against glaucoma when all cases were evaluated, and also after stratification in HTG and NTG groups, with the minor allele having a protective effect in both groups. In relation to quantitative traits, rs2157719 was positively associated with a lower IOP. No association was observed for rs4977756 in relation to glaucoma. Recently, Li and colleagues conducted a two-stage Exome Chip discovery and replication study that totalized 12,677 POAG cases and 36,526 controls from several ethnicities (Li et al., 2015). Once again

rs2157719 was found to be protective against glaucoma (OR = 0.71, $p = 2.81 \times 10^{-33}$). The MAF of rs2157719 is also variable among different ethnicities according to HapMap data (YRI=0.0, CEU=44.20, TSI=37.70). Regarding the genetic model that explains the disease, the co-dominant was significantly better (AIC 417.72), than the others (followed by the dominant one, AIC 422.04).

In our study, the non association between rs4977756 and glaucoma may have been due either to the small sample size or to the small difference in the MAF between cases and controls (26.63 and 30.00, respectively). The fact that published results are contradictory may indicate that the effect conferred by this SNP is low, which would explain the need of such a big sample to detect an association. There is also the possibility that modifiers such as genetic background or environment act over its effect. All these factors justify the need of other studies to better understand the role of this variation in relation to POAG.

One limitation of this study is the small sample size, which probably hampers the detection of association between rs4977756 and the disease. However, for both rs2157719 (*CDKN2B-AS1*) and rs4236601 (*CAVI/CAV2*), it was possible to replicate previously published results and reinforce the importance of these variants in relation to POAG. To our knowledge, this is the first study that evaluates the above-mentioned variants in patients from Brazil, characterized by a very admixed population, different from most studies already reported. Due to its colonization process and to the high miscegenation, it is difficult to extrapolate the importance of genetic findings from Americans and/or Europeans. Although the constantly increasing number of modifier genes related to glaucoma etiology or to its endophenotypes, a very small percentage of the heritability can be explained by alterations in few genes, making replication studies relevant to the establishment of the most important genetic variants related to the disease.

5. CONCLUSIONS

The variant rs4236601 was significantly more present in the POAG group than in non-affected individuals and based on the AIC, additive is suggested to be the best genetic model. The SNP rs2157719 was more frequent in the control group, suggesting protection against the disease. AIC index and ANOVA clearly indicate codominant model as the best genetic model for this variant. No differences were observed for genotype and allele distributions in relation to rs4977756 SNP.

6. COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

Ethical approval: All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Informed consent: “Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.”

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

7. REFERENCES

- Abu-Amero, K.K., Kondkar, A.A., Mousa, A., Osman, E.A., Al-Obeidan, S.A., 2012. Lack of association of SNP rs4236601 near CAV1 and CAV2 with POAG in a Saudi cohort. *Mol. Vis.* 18, 1960–1965.
- Burdon, K.P., Crawford, A., Casson, R.J., Hewitt, A.W., Landers, J., Danoy, P., Mackey, D.A., Mitchell, P., Healey, P.R., Craig, J.E., 2012. Glaucoma risk alleles at CDKN2B-AS1 are associated with lower intraocular pressure, normal-tension glaucoma, and advanced glaucoma. *Ophthalmology* 119, 1539–1545. doi:10.1016/j.ophtha.2012.02.004
- Burdon, K.P., Macgregor, S., Hewitt, A.W., Sharma, S., Chidlow, G., Mills, R.A., Danoy, P., Casson, R., Viswanathan, A.C., Liu, J.Z., Landers, J., Henders, A.K., Wood, J., Souzeau, E., Crawford, A., Leo, P., Wang, J.J., Rochtchina, E., Nyholt, D.R., Martin, N.G., Montgomery, G.W., Mitchell, P., Brown, M.A., Mackey, D.A., Craig, J.E., 2011. Genome-wide association study identifies susceptibility loci for open angle glaucoma at TMCO1 and CDKN2B-AS1. *Nat. Genet.* 43, 574–578. doi:10.1038/ng.824
- Cao, D., Jiao, X., Liu, X., Hennis, A., Leske, M.C., Nemesure, B., Hejtmancik, J.F., 2012. CDKN2B polymorphism is associated with primary open-angle glaucoma (POAG) in the Afro-Caribbean population of Barbados, West Indies. *PLoS One* 7, e39278. doi:10.1371/journal.pone.0039278
- Chen, F., Klein, A.P., Klein, B.E.K., Lee, K.E., Truitt, B., Klein, R., Iyengar, S.K., Duggal, P., 2015. Exome Array Analysis Identifies CAV1/CAV2 as a Susceptibility Locus for Intraocular Pressure. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 56, 544–551. doi:10.1167/iovs.14-15204
- Fuchshofer, R., Tamm, E.R., 2009a. Modulation of extracellular matrix turnover in the trabecular meshwork. *Exp. Eye Res.* 88, 683–688.
- Fuchshofer, R., Tamm, E.R., 2009b. Modulation of extracellular matrix turnover in the trabecular meshwork. *Exp. Eye Res.* 88, 683–688.
- García-Cardena, G., Martasek, P., Masters, B.S., Skidd, P.M., Couet, J., Li, S., Lisanti, M.P., Sessa, W.C., 1997. Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the nos caveolin binding domain in vivo. *J. Biol. Chem.* 272, 25437–25440.
- Greene, L.A., Liu, D.X., Troy, C.M., Biswas, S.C., 2007. Cell cycle molecules define a pathway required for neuron death in development and disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1772, 392–401. doi:10.1016/j.bbadis.2006.12.003
- Helgadottir, A., Thorleifsson, G., Magnusson, K.P., Grétarsdottir, S., Steinthorsdottir, V., Manolescu, A., Jones, G.T., Rinkel, G.J.E., Blankensteijn, J.D., Ronkainen, A., Jääskeläinen, J.E., Kyo, Y., Lenk, G.M., Sakalihasan, N., Kostulas, K., Gottsäter, A., Flex, A., Stefansson, H., Hansen, T., Andersen, G., Weinsheimer, S., Borch-Johnsen, K., Jorgensen, T., Shah, S.H., Quyyumi, A.A., Granger, C.B., Reilly, M.P., Austin, H., Levey, A.I., Vaccarino, V., Palsdottir, E., Walters, G.B., Jonsdottir, T., Snorraddottir, S., Magnusdottir, D., Gudmundsson, G., Ferrell, R.E., Sveinbjornsdottir, S., Hernesniemi, J., Niemelä, M., Limet, R., Andersen, K., Sigurdsson, G., Benediktsson, R., Verhoeven, E.L.G., Teijink, J.A.W., Grobbee, D.E., Rader, D.J., Collier, D.A., Pedersen, O., Pola, R., Hillert, J., Lindblad, B., Valdimarsson, E.M.,

- Magnadottir, H.B., Wijmenga, C., Tromp, G., Baas, A.F., Ruigrok, Y.M., van Rij, A.M., Kuivaniemi, H., Powell, J.T., Matthiasson, S.E., Gulcher, J.R., Thorgeirsson, G., Kong, A., Thorsteinsdottir, U., Stefansson, K., 2008. The same sequence variant on 9p21 associates with myocardial infarction, abdominal aortic aneurysm and intracranial aneurysm. *Nat. Genet.* 40, 217–224. doi:10.1038/ng.72
- Ju, H., Zou, R., Venema, V.J., Venema, R.C., 1997. Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity. *J. Biol. Chem.* 272, 18522–18525.
- Kuehn, M.H., Wang, K., Roos, B., Stone, E.M., Kwon, Y.H., Alward, W.L.M., Mullins, R.F., Fingert, J.H., 2011. Chromosome 7q31 POAG locus: ocular expression of caveolins and lack of association with POAG in a US cohort. *Mol. Vis.* 17, 430–435.
- Liu, Y., Hauser, M.A., Akafo, S.K., Qin, X., Miura, S., Gibson, J.R., Wheeler, J., Gaasterland, D., Challa, P., Herndon, L., Ritch, R., Moroi, S.E., Girkin, C.A., Pasquale, L.R., Budenz, D.L., Wiggs, J.L., Richards, J.E., Ashley-Koch, A.E., Allingham, R.R., 2013. Investigation of Known Genetic Risk Factors for Primary Open Angle Glaucoma in Two Populations of African Ancestry. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* doi:10.1167/iovs.13-12779
- Li, Z., Allingham, R.R., Nakano, M., Jia, L., Chen, Y., Ikeda, Y., Mani, B., Chen, L.-J., Kee, C., Garway-Heath, D.F., Sripriya, S., Fuse, N., Abu-Amero, K.K., Huang, C., Namburi, P., Burdon, K., Perera, S.A., Gharahkhani, P., Lin, Y., Ueno, M., Ozaki, M., Mizoguchi, T., Krishnadas, S.R., Osman, E.A., Lee, M.C., Chan, A.S.Y., Tajudin, L.-S.A., Do, T., Goncalves, A., Reynier, P., Zhang, H., Bourne, R., Goh, D., Broadway, D., Husain, R., Negi, A.K., Su, D.H., Ho, C.-L., Blanco, A.A., Leung, C.K.S., Wong, T.T., Yakub, A., Liu, Y., Nongpiur, M.E., Han, J.C., Hon, D.N., Shantha, B., Zhao, B., Sang, J., Zhang, N., Sato, R., Yoshii, K., Panda-Jonas, S., Koch, A.E.A., Herndon, L.W., Moroi, S.E., Challa, P., Foo, J.N., Bei, J.-X., Zeng, Y.-X., Simmons, C.P., Chau, T.N.B., Sharmila, P.F., Chew, M., Lim, B., Tam, P.O.S., Chua, E., Ng, X.Y., Yong, V.H.K., Chong, Y.F., Meah, W.Y., Vijayan, S., Seongsoo, S., Xu, W., Teo, Y.Y., Bailey, J.N.C., Kang, J.H., Haines, J.L., Cheng, C.Y., Saw, S.-M., Tai, E.-S., Consortium, I.-G., Consortium, N., Richards, J.E., Ritch, R., Gaasterland, D.E., Pasquale, L.R., Liu, J., Jonas, J.B., Milea, D., George, R., Al-Obeidan, S.A., Mori, K., Macgregor, S., Hewitt, A.W., Girkin, C.A., Zhang, M., Sundaresan, P., Vijaya, L., Mackey, D.A., Wong, T.Y., Craig, J.E., Sun, X., Kinoshita, S., Wiggs, J.L., Khor, C.-C., Yang, Z., Pang, C.P., Wang, N., Hauser, M.A., Tashiro, K., Aung, T., Vithana, E.N., 2015. A common variant near TGFBR3 is associated with primary open angle glaucoma. *Hum. Mol. Genet.* 24, 3880–3892. doi:10.1093/hmg/ddv128
- Loomis, S.J., Kang, J.H., Weinreb, R.N., Yaspan, B.L., Cooke Bailey, J.N., Gaasterland, D., Gaasterland, T., Lee, R.K., Lichter, P.R., Budenz, D.L., Liu, Y., Realini, T., Friedman, D.S., McCarty, C.A., Moroi, S.E., Olson, L., Schuman, J.S., Singh, K., Vollrath, D., Wollstein, G., Zack, D.J., Brilliant, M., Sit, A.J., Christen, W.G., Fingert, J., Kraft, P., Zhang, K., Allingham, R.R., Pericak-Vance, M.A., Richards, J.E., Hauser, M.A., Haines, J.L., Pasquale, L.R., Wiggs, J.L., 2014. Association of CAV1/CAV2 genomic variants with primary open-angle glaucoma overall and by gender and pattern of visual field loss. *Ophthalmology* 121, 508–516. doi:10.1016/j.ophtha.2013.09.012
- Monemi, S., Spaeth, G., DaSilva, A., Popinchalk, S., Ilitchev, E., Liebmann, J., Ritch, R., Héon, E., Crick, R.P., Child, A., Sarfarazi, M., 2005. Identification of a novel adult-onset primary open-angle glaucoma (POAG) gene on 5q22.1. *Hum. Mol. Genet.* 14, 725–733. doi:10.1093/hmg/ddi068
- Nakano, M., Ikeda, Y., Taniguchi, T., Yagi, T., Fuwa, M., Omi, N., Tokuda, Y., Tanaka, M., Yoshii, K., Kageyama, M., Naruse, S., Matsuda, A., Mori, K., Kinoshita, S., Tashiro, K., 2009. Three susceptible loci associated with primary open-angle glaucoma identified by genome-wide association study in a Japanese population. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 12838–12842. doi:10.1073/pnas.0906397106
- Nielsen, D.M., Ehm, M.G., Weir, B.S., 1998. Detecting marker-disease association by testing for Hardy-Weinberg disequilibrium at a marker locus. *Am. J. Hum. Genet.* 63, 1531–1540. doi:10.1086/302114
- Pasquale, L.R., Loomis, S.J., Kang, J.H., Yaspan, B.L., Abdrabou, W., Budenz, D.L., Chen, T.C., DelBono, E., Friedman, D.S., Gaasterland, D., Gaasterland, T., Grosskreutz, C.L., Lee, R.K.,

- Lichter, P.R., Liu, Y., McCarty, C.A., Moroi, S.E., Olson, L.M., Realini, T., Rhee, D.J., Schuman, J.S., Singh, K., Vollrath, D., Wollstein, G., Zack, D.J., Allingham, R.R., Pericak-Vance, M.A., Weinreb, R.N., Zhang, K., Hauser, M.A., Richards, J.E., Haines, J.L., Wiggs, J.L., 2013. CDKN2B-AS1 Genotype–Glaucoma Feature Correlations in Primary Open-Angle Glaucoma Patients From the United States. *Am. J. Ophthalmol.* 155, 342–353.e5. doi:10.1016/j.ajo.2012.07.023
- Pogue, A.I., Cui, J.G., Li, Y.Y., Zhao, Y., Culicchia, F., Lukiw, W.J., 2010. Micro RNA-125b (miRNA-125b) function in astrogliosis and glial cell proliferation. *Neurosci. Lett.* 476, 18–22. doi:10.1016/j.neulet.2010.03.054
- Quigley, H.A., 2011. Glaucoma. *Lancet* 377, 1367–1377. doi:10.1016/S0140-6736(10)61423-7
- R: a language and environment for statistical computing [WWW Document]. GBIF.ORG. URL <http://www.gbif.org/resource/81287> (accessed 7.3.15).
- Ramdas, W.D., van Koolwijk, L.M.E., Cree, A.J., Janssens, A.C.J.W., Amin, N., de Jong, P.T.V.M., Wolfs, R.C.W., Gibson, J., Kirwan, J.F., Hofman, A., Rivadeneira, F., Oostra, B.A., Uitterlinden, A.G., Ennis, S., Lotery, A.J., Lemij, H.G., Klaver, C.C.W., Vingerling, J.R., Jansonius, N.M., van Duijn, C.M., 2011. Clinical implications of old and new genes for open-angle glaucoma. *Ophthalmology* 118, 2389–2397. doi:10.1016/j.ophtha.2011.05.040
- Royston, J.P., 1982. An Extension of Shapiro and Wilk’s W Test for Normality to Large Samples. *J. R. Stat. Soc. Ser. C Appl. Stat.* 31, 115–124. doi:10.2307/2347973
- Sarfarazi, M., Child, A., Stoilova, D., Brice, G., Desai, T., Trifan, O.C., Poinosawmy, D., Crick, R.P., 1998. Localization of the Fourth Locus (GLC1E) For Adult-Onset Primary Open-Angle Glaucoma to the 10p15-p14 Region. *Am. J. Hum. Genet.* 62, 641–652. doi:10.1086/301767
- Scott, L.J., Mohlke, K.L., Bonnycastle, L.L., Willer, C.J., Li, Y., Duren, W.L., Erdos, M.R., Stringham, H.M., Chines, P.S., Jackson, A.U., Prokunina-Olsson, L., Ding, C.-J., Swift, A.J., Narisu, N., Hu, T., Pruim, R., Xiao, R., Li, X.-Y., Conneely, K.N., Riebow, N.L., Sprau, A.G., Tong, M., White, P.P., Hetrick, K.N., Barnhart, M.W., Bark, C.W., Goldstein, J.L., Watkins, L., Xiang, F., Saramies, J., Buchanan, T.A., Watanabe, R.M., Valle, T.T., Kinnunen, L., Abecasis, G.R., Pugh, E.W., Doheny, K.F., Bergman, R.N., Tuomilehto, J., Collins, F.S., Boehnke, M., 2007. A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. *Science* 316, 1341–1345. doi:10.1126/science.1142382
- Sheffield, V.C., Stone, E.M., Alward, W.L., Drack, A.V., Johnson, A.T., Streb, L.M., Nichols, B.E., 1993. Genetic linkage of familial open angle glaucoma to chromosome 1q21-q31. *Nat. Genet.* 4, 47–50. doi:10.1038/ng0593-47
- Shete, S., Hosking, F.J., Robertson, L.B., Dobbins, S.E., Sanson, M., Malmer, B., Simon, M., Marie, Y., Boisselier, B., Delattre, J.-Y., Hoang-Xuan, K., El Hallani, S., Idbaih, A., Zelenika, D., Andersson, U., Henriksson, R., Bergenheim, A.T., Feychting, M., Lönn, S., Ahlbom, A., Schramm, J., Linnebank, M., Hemminki, K., Kumar, R., Hepworth, S.J., Price, A., Armstrong, G., Liu, Y., Gu, X., Yu, R., Lau, C., Schoemaker, M., Muir, K., Swerdlow, A., Lathrop, M., Bondy, M., Houlston, R.S., 2009. Genome-wide association study identifies five susceptibility loci for glioma. *Nat. Genet.* 41, 899–904. doi:10.1038/ng.407
- Stone, E.M., Fingert, J.H., Alward, W.L., Nguyen, T.D., Polansky, J.R., Sunden, S.L., Nishimura, D., Clark, A.F., Nystuen, A., Nichols, B.E., Mackey, D.A., Ritch, R., Kalenak, J.W., Craven, E.R., Sheffield, V.C., 1997. Identification of a gene that causes primary open angle glaucoma. *Science* 275, 668–670.
- Thorleifsson, G., Walters, G.B., Hewitt, A.W., Masson, G., Helgason, A., DeWan, A., Sigurdsson, A., Jonasdottir, A., Gudjonsson, S.A., Magnusson, K.P., Stefansson, H., Lam, D.S.C., Tam, P.O.S., Gudmundsdottir, G.J., Southgate, L., Burdon, K.P., Gottfredsdottir, M.S., Aldred, M.A., Mitchell, P., St Clair, D., Collier, D.A., Tang, N., Sveinsson, O., Macgregor, S., Martin, N.G., Cree, A.J., Gibson, J., Macleod, A., Jacob, A., Ennis, S., Young, T.L., Chan, J.C.N., Karwatowski, W.S.S., Hammond, C.J., Thordarson, K., Zhang, M., Wadelius, C., Lotery, A.J., Trembath, R.C., Pang, C.P., Hoh, J., Craig, J.E., Kong, A., Mackey, D.A., Jonasson, F., Thorsteinsdottir, U., Stefansson, K., 2010. Common variants near CAV1 and CAV2 are associated with primary open-angle glaucoma. *Nat. Genet.* 42, 906–909. doi:10.1038/ng.661
- Toda, N., Nakanishi-Toda, M., 2007. Nitric oxide: ocular blood flow, glaucoma, and diabetic retinopathy. *Prog. Retin. Eye Res.* 26, 205–238. doi:10.1016/j.preteyeres.2007.01.004

- Vithana, E.N., Nongpiur, M.E., Venkataraman, D., Chan, S.H., Mavinahalli, J., Aung, T., 2010. Identification of a novel mutation in the NTF4 gene that causes primary open-angle glaucoma in a Chinese population. *Mol. Vis.* 16, 1640–1645.
- Wiggs, J.L., Kang, J.H., Yaspan, B.L., Mirel, D.B., Laurie, C., Crenshaw, A., Brodeur, W., Gogarten, S., Olson, L.M., Abdrabou, W., DelBono, E., Loomis, S., Haines, J.L., Pasquale, L.R., 2011. Common variants near CAV1 and CAV2 are associated with primary open-angle glaucoma in Caucasians from the USA. *Hum. Mol. Genet.* 20, 4707–4713. doi:10.1093/hmg/ddr382
- Wiggs, J.L., Yaspan, B.L., Hauser, M.A., Kang, J.H., Allingham, R.R., Olson, L.M., Abdrabou, W., Fan, B.J., Wang, D.Y., Brodeur, W., Budenz, D.L., Caprioli, J., Crenshaw, A., Crooks, K., DelBono, E., Doheny, K.F., Friedman, D.S., Gaasterland, D., Gaasterland, T., Laurie, C., Lee, R.K., Lichter, P.R., Loomis, S., Liu, Y., Medeiros, F.A., McCarty, C., Mirel, D., Moroi, S.E., Musch, D.C., Realini, A., Rozsa, F.W., Schuman, J.S., Scott, K., Singh, K., Stein, J.D., Trager, E.H., VanVeldhuisen, P., Vollrath, D., Wollstein, G., Yoneyama, S., Zhang, K., Weinreb, R.N., Ernst, J., Kellis, M., Masuda, T., Zack, D., Richards, J.E., Pericak-Vance, M., Pasquale, L.R., Haines, J.L., 2012. Common Variants at 9p21 and 8q22 Are Associated with Increased Susceptibility to Optic Nerve Degeneration in Glaucoma. *PLoS Genet* 8, e1002654. doi:10.1371/journal.pgen.1002654
- Wirtz, M.K., Samples, J.R., Rust, K., Lie, J., Nordling, L., Schilling, K., Acott, T.S., Kramer, P.L., 1999. GLC1F, a new primary open-angle glaucoma locus, maps to 7q35-q36. *Arch. Ophthalmol.* 117, 237–241.
- Wittke-Thompson, J.K., Pluzhnikov, A., Cox, N.J., 2005. Rational inferences about departures from Hardy-Weinberg equilibrium. *Am. J. Hum. Genet.* 76, 967–986. doi:10.1086/430507
- Zou, G.Y., Donner, A., 2006. The merits of testing Hardy-Weinberg equilibrium in the analysis of unmatched case-control data: a cautionary note. *Ann. Hum. Genet.* 70, 923–933. doi:10.1111/j.1469-1809.2006.00267.

Table 1: Oligonucleotide sequences with respective products sizes and annealing temperatures.

SNP	Sequence (5' - 3')	Product Size (bp)	AT (°C)
rs4236601 F rs4236601 R	TGATTCCATGTGTGCTGTTG CGGGGGTCTCACTCTGTTAC	704	62
rs2157719 F rs2157719 R	CACCGCTGCACTACTACTACC GCATCTGGCACGTTAGTAGGC	564	61
rs4977756 F rs4977756 R	AAGCCCGAGTTTGACAGAGA GCATCTGGCACGTTAGTAGGC	652	64

F: Forward, R: reverse, AT: annealing temperature

Table 2: Genotype assignment under different inheritance modes.

	Codominant		Dominant	Recessive	Additive
Genotype	G1	G2	G	G	G
AA/GG	0	0	0	0	0
AG/AG	1	0	1	0	1
GG/AA	0	1	1	1	2

Table 3. Genotype and allele counts and basic descriptive statistics of the frequencies distribution in affected and control groups. Totally, 169 individuals were genotyped in the affected group and 140 in the control group

SNP	Genetic region	Genotype and Alleles	Affected n (%)	Control n (%)	PIC Case/Control	P _{HWE} Case/Control
rs4236601	<i>CAVI/CAV2</i>	G/G	74 (43.8)	80 (57.1)	35.21/30.91	0.303/0.225
		G/A	71 (42.0)	48 (34.3)		
		A/A	24 (14.2)	12 (8.6)		
		G	219 (65.8)	208 (74.3)		
		A	119 (35.2)	72 (25.7)		
rs2157719	<i>CDKN2B-ASI</i>	A/A	113 (66.9)	72 (51.4)	27.21/31.11	0.005/0.048*
		A/G	43 (25.4)	63 (45.0)		
		G/G	13 (7.7)	5 (3.6)		
		A	269 (79.6)	207 (73.9)		
		G	69 (20.4)	73 (26.1)		
rs4977756	<i>CDKN2B-ASI</i>	A/A	90 (53.3)	67 (47.9)	31.44/33.18	0.670/0.520
		A/G	68 (40.2)	62 (44.3)		
		G/G	11 (6.5)	11 (7.9)		
		A	248 (73.4)	196 (70.0)		
		G	90 (26.6)	84 (30.0)		

PIC – polymorphism information content value; PHWE – p-value of the chi-square goodness-of-fit test for the Hardy-Weinberg equilibrium; *0.015/0.144 applying Bonferroni correction.

Table 4. Parameters of the fitted logistic regression model: odds ratios and p-values.

	OR	2.5%	97.5%	p-value
<i>rs4236601</i>				
G/G	--	--	--	reference
G/A	1.6569	1.0109	2.7349	0.0464*
A/A	2.2349	1.0333	5.0516	0.0454*
<i>rs2157719</i>				
A/A	--	--	--	reference
G/A	0.4146	0.2511	0.6776	0.0005***
G/G	1.4427	0.5087	4.7160	0.5101

* Significance level: $p < 0.05$

*** Significance level: $p < 0.001$

Table 5. Characteristics of codominant, additive, recessive and dominant genetic models for SNPs rs4236601 and rs2157719.

Model for SNP	Df	AIC rs4236601	AIC rs2157719
Codominant	2	425.58	417.72
Additive	1	423.68	426.96
Dominant	1	424.16	422.04
Recessive	1	427.23	427.17

Df – Degrees of Freedom; AIC – Akaike's Information Criterion

3.0 CAPÍTULO 2: ESTUDOS EM FAMÍLIAS

3.1 Objetivos

3.1.1 Gerais

Esta parte do projeto teve como objetivo a melhor compreensão das bases genéticas do glaucoma por meio do estudo em famílias de genes já associados à doença como causadores ou moduladores, assim como da identificação de novas regiões e/ou genes candidatos associados ao GPAA. Com o intuito de melhor compreender o papel de alterações genéticas no desenvolvimento do GPAA, em duas famílias previamente estudadas por meio de estudo de ligação e sequenciamento do gene *MYOC* foi realizado o sequenciamento de exomas, com o objetivo de identificação de novos genes candidatos.

3.1.2 Específicos

- 3.1.2.1** Avaliar a presença de mutações nos genes *MYOC* e *CYP11B1* e efetuar a correlação genótipo/fenótipo em membros de 13 famílias portadoras de GPAA.
- 3.1.2.2** Realizar o sequenciamento completo de exomas em membros de duas famílias sem mutações no gene *MYOC* e previamente avaliadas em um estudo de ligação.

3.2 Casuística

3.2.1 Pacientes

Foram avaliados 26 indivíduos afetados pertencentes a 13 famílias (Apêndice 1) para os genes *MYOC* e *CYP11B1*.

Por meio do sequenciamento total de exomas foram avaliados sete indivíduos afetados por GPAA pertencentes a dois núcleos familiares.

O protocolo de pesquisa seguiu os princípios enunciados na Declaração de Helsinque, assim como as determinações do Comitê de Ética em Pesquisa da FCM – UNICAMP.

3.2.1.1 Critérios de inclusão

- a. Ângulo aberto no exame de gonioscopia com pigmentação da malha trabecular até grau 2;
- b. Lesão característica de disco óptico, definida como a presença de pelo menos dois dos seguintes critérios: razão escavação/disco $>0,6$, perda localizada da rima neural, hemorragia de disco óptico ou assimetria da razão escavação/disco $>0,2$ entre os dois olhos;
- c. Presença de pelo menos dois exames de campo visual confiáveis revelando perda glaucomatosa característica, definida como o agrupamento de três ou mais pontos não periféricos no gráfico do *Pattern Deviation*, todos deprimidos a $p < 5\%$, com pelo menos um ponto a $p < 1\%$ ou pior, *Glaucoma Hemifield Test Outside Normal Limits* e *Pattern Standard Deviation* (PSD) ocorrendo em menos de 5% dos exames perimétricos normais;

3.2.1.2 Critérios de Exclusão

- a. Presença de alterações de segmento anterior compatíveis com glaucomas secundários (ou de desenvolvimento) e/ou alterações de disco óptico e campo visual que mimetizem lesões glaucomatosas;
- b. Diagnóstico de glaucoma primário de ângulo fechado;
- c. Pacientes com GPAA que não puderam ser submetidos à avaliação oftalmológica e genética.

3.2.2 Controles

Foram avaliados 26 indivíduos sem glaucoma, componentes de 13 núcleos familiares de afetados pelo GPAA para os genes *MYOC* e *CYP1B1* e 3 não afetados por GPAA pertencentes a dois núcleos familiares para o sequenciamento total de exomas, atendidos no ambulatório de oftalmologia da Disciplina de Oftalmologia do Hospital das Clínicas da UNICAMP, segundo os seguintes critérios;

3.2.2.1 Critério de inclusão

- a. Indivíduos acima de 50 anos de idade;
- b. Razão escavação/disco menor do que 0,4 em ambos os olhos;

- c. PIOs menores do que 21 mmHg em ambos os olhos;
- d. Pertencer ao núcleo familiar com membros afetados por GPAA avaliados neste estudo;

3.2.2.2 Critérios de Exclusão

- a. Indivíduos onde não foi possível a avaliação oftalmológica e genética serão excluídos do estudo.
- b. PIO > 16mmHg;

3.3 Métodos

3.3.1 Exame Oftalmológico

O exame oftalmológico encontra-se descrito no item 2.3.1

3.3.2 Avaliação genética dos indivíduos

3.3.2.1 Obtenção das amostras de sangue e extração de DNA

A obtenção das amostras de sangue e extração de DNA encontram-se descritas no item 2.3.2.1.

3.3.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase

As PCRs para os genes *MYOC*, *CYP11B1*, assim como para os genes candidatos selecionados por meio do sequenciamento de exomas foram realizadas de acordo com a padronização descrita no item 2.3.2.2. Os iniciadores utilizados encontram-se descritos na tabela 5. As amplificações pela reação em cadeia pela *DNA* polimerase foram executadas em 35 ciclos, as temperaturas de anelamento (TA) estão descritas na tabela 5. As temperaturas e tempo de desnaturação e extensão foram de 72°C por 30 segundos e 92°C por 30 segundos respectivamente. Foram utilizados 10pmoles de cada primer e 50ng de *DNA* em uma reação que continha o volume final de 25 µl.

Tabela 5. Sequências dos oligonucleotídeos, e temperaturas de anelamento.

Gene	Oligonucleotídeos	TA (°C)
<i>MYOC (S)</i>	5' GGTGCATAAATTGGGATGTTC 3'	61
<i>MYOC (AS)</i>	5' TTGTGCTAGCTGTGCAGTCTC 3'	
<i>MYOC (S)</i>	5' TACAGGCATGAGCCACCAC 3'	62
<i>MYOC (AS)</i>	5' GAGAGTTCTGTTTCCTTCTCCTC 3'	
<i>MYOC (S)</i>	5' GATTTGTCTCCAGGGCTGTC 3'	65

<i>MYOC (AS)</i>	5' GCTTGGAGGCTTTTCACATC 3'	
<i>MYOC (S)</i>	5' TCTGTGGCACCTTGTACACC 3'	61
<i>MYOC (AS)</i>	5' CCACCTTTAACATCCTGCAATC 3'	
<i>CYP1B1(S)</i>	5' TCTCCAGAGAGTCAGCTCCG 3'	61
<i>CYP1B1(AS)</i>	5' GGGTCGTCGTGGCTGTAG 3'	
<i>CYP1B1(S)</i>	5' ATGGCTTTCGGCCACTACT 3'	57
<i>CYP1B1(AS)</i>	5' GATCTTGGTTTTGAGGGGTG 3'	
<i>CYP1B1(S)</i>	5'TCCCAGAAATATTAATTTAGTCACTG 3	61
<i>CYP1B1(AS)</i>	5 'TATGGAGCACACCTCACCTG 3'	
<i>LRP1 (S)</i>	5' CTGGAAATGCGATGGAGAC 3'	65°
<i>LRP1 (AS)</i>	5' GAGAAAGAATGAGTGAATGACTGG 3'	
<i>SCNMI(S)</i>	5' CTCTACCCCTGCTCAGCTTTG 3'	64°
<i>SCNMI(AS)</i>	5' GGGAGACAGAGTCAGAGCCTTC 3'	
<i>FNI(S)</i>	5' CTGCCTTCCAAAATGTTTCC 3'	63°
<i>FNI(AS)</i>	5' GGGGCTTGTGTCACTTACC 3'	
<i>GPR179 (S)</i>	5' TGGGTGCAGGAGGAGAAC 3'	64°
<i>GPR179 (AS)</i>	5' CTGAGGTCTGGCTTGAGTCC 3'	
<i>ADAMTSL4(S)</i>	5' TCCCTGGTTCAGTCCCTTATC 3'	65
<i>ADAMTSL4 (AS)</i>	5' TGGCGAGTGGACATCCTG 3'	
<i>ICAIL (S)</i>	5' AGATTGGCCCTGTGTACTCC 3'	62°
<i>ICAIL (AS)</i>	5' CATAACCAAGAAAAGGAAAGG 3'	
<i>GALC (S)</i>	5' GGTGGGGAGTGAGATGGTC 3'	64°
<i>GALC(AS)</i>	5' CAAGGGCAAAGAAAGGATCA 3'	
<i>GOSRI(S)</i>	5' CTTTCTGTGCTGCTTCTCC 3'	64°
<i>GOSRI(AS)</i>	5' GCTCTCAAGGCGGAAACAC 3'	
<i>COL15A1 (S)</i>	5' TCCTGTGTTCTCTGCTTCCA 3'	64°
<i>COL15A1 (AS)</i>	5' CCAACCTGCCATCAATC 3'	
<i>PRSS12(S)</i>	5' CCAAGGTACAAAGGCTGAGAC 3'	61°
<i>PRSS12(AS)</i>	5' GGTCGGTTTACAGGGAGAATG 3'	
<i>DNMBP(S)</i>	5' CTCGAGGGTCTCTGCTTTG 3'	61°
<i>DNMBP(AS)</i>	5' AGCACAGCAGAGAACGAATG 3'	
<i>NID2(S)</i>	5' GTACCCAGATGCGCACTCAC 3'	61°
<i>NID2(AS)</i>	5' TGCAGAAAATCCACCCTAGC 3'	
<i>NINL(S)</i>	5' AGGGAAATTACTCAGGACCGC 3'	61
<i>NINL(AS)</i>	5' TTGCGTAAACCTGGGAGGAC 3'	
<i>TMTC3(S)</i>	5' ATCATATCAAGGGCCTCATTT 3'	62°
<i>TMTC3(AS)</i>	5' GTGGGGTGTCTCTTCGTCTC 3'	

3.3.2.3 Reação de Sequenciamento

Os detalhes da reação de sequenciamento encontram-se descritos no item 2.3.2.3.

3.3.2.4 Sequenciamento completo de exomas

Para o sequenciamento de exomas foram utilizados de 50 ng de *DNA* genômico dos pacientes e controles pertencentes às famílias. O *DNA* genômico deve possuir OD 260/280 entre 1.8 e 2.0. As amostras de *DNA* de cada indivíduo foram quantificadas por meio do equipamento Qubit 2.0 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), que realiza quantificação de ácidos nucléicos através de método fluorimétrico, para serem submetidos ao sequenciamento.

Foi utilizado o kit *Nextera rapid Exome Enrichment Kit*® (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA), seguindo as instruções do fabricante. As bibliotecas capturadas foram submetidas ao sequenciamento no equipamento Illumina HiSeq 2500 (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA). As amostras foram combinadas para que pudessem ser submetidas ao sequenciamento. A qualidade, quantidade e distribuição do tamanho dos produtos de PCR foi analisada pelo equipamento 2100 BioAnalyser. Para os indivíduos de ambas as famílias, as bibliotecas capturadas foram submetidas ao sequenciamento no equipamento *Illumina HiSeq*TM (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA), situado no Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida. O sequenciamento foi realizado em 2x100pb (*paired ends*) com cobertura mínima de 50X.

O tamanho dos insertos a serem sequenciados devem ter aproximadamente 200 pb. O sequenciamento foi por multiplex, com seis amostras (bibliotecas) por canal, sendo a corrida feita por *paired-ends* (*primers sense* e *antisense*) 2x54 pb. Como cada canal produz aproximadamente 2 Gb de sequências e esperando que 50% das leituras correspondam aos alvos, uma cobertura de 40 a 50 vezes para cada amostra é obtida quando seis indivíduos são sequenciados em apenas um canal. Este valor de cobertura é a ideal, pois assegura que 95% dos SNPs sejam identificados (Summerer et al., 2009).

3.3.3 Forma de análise dos resultados

3.3.3.1 Análise do sequenciamento de exomas

O processo de tratamento e análise dos dados obtidos foi dividido em etapas que têm início com um pré-processamento dos dados; nesta etapa os dados brutos têm suas referências mapeadas e duplicatas marcadas. Variações do tipo *indel* são realinhadas; a partir desta etapa o programa GATK (<http://www.broadinstitute.org/gatk/>) pode ser utilizado. Posteriormente, é efetuada a recalibração de bases e então os dados são comprimidos e submetidos ao programa GATK com a retirada de informações redundantes e manutenção apenas de informações essenciais para a busca por variantes. Desta maneira este processo inclui as etapas de obtenção das sequências, alinhamento, processamento e obtenção das variantes. Os dados obtidos, gerados no formato de arquivo SAM devem ser convertidos para o formato BAM que é posteriormente comprimido. A análise com o programa GATK se dá pela busca por variantes e tem início com a utilização do *UnifiedGenotyper*, programa que permite a identificação de SNPs e *indels* separadamente considerando as variações em cada locus. Outro método empregado está voltado para a obtenção dos haplótipos baseados nas variações do tipo *indel*, SNPs a ferramenta *HaplotypeCaller* auxilia em detectar se a região em questão tem potencial para ser considerada variável e possibilita a análise de variações simultaneamente o que permite uma avaliação mais minuciosa, especialmente, das alterações do tipo *indel*.



Figura 7. Etapas da análise de sequenciamento de exomas.

3.3.3.2 Filtragem dos genes candidatos

Foram utilizadas ferramentas que permitem avaliar os dados gerados que correspondem às sequências codificadoras e regulatórias dos genes. Foram comparados bancos de dados de variações genéticas como do projeto ESP5400 (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>), 1000 genomes (<http://www.1000genomes.org/>), HGMD (<http://www.hgmd.org/>) e EXAC (<http://exac.broadinstitute.org/>) por meio de ferramentas como o wAnnoVar (<http://wannovar.usc.edu/>) que permite a comparação com diferentes bancos de dados com informações sobre a frequência nas populações e patogenicidade das alterações. As mutações novas foram avaliadas em relação ao impacto estrutural e funcional na proteína (SIFT, Polyphen2). Foram verificadas as regiões funcionais, pois, alterações podem ocorrer em sítios catalíticos relacionados com a função da proteína e desta maneira é possível entender o efeito molecular que apresenta relação com o desenvolvimento do GPAA. Os genes selecionados nas etapas finais de análise foram estudados com relação ao seu nível de expressão nos diferentes tecidos oculares, com base nas informações contidas no banco de dados de expressão em tecidos oculares (<https://genome.uiowa.edu/otdb/>). Nesta etapa foi utilizada a comparação por meio da plataforma MySQL (<https://www.mysql.com/>) que tem a capacidade de relacionar bancos de dados de maneira seletiva, desta maneira considerando apenas os genes com expressão (PLIER) na malha trabecular, nervo óptico ou outros tecidos do olho. A mesma ferramenta foi utilizada para a busca de genes previamente relacionados às formas de glaucoma (apêndice 2 e tabela 2). A partir de uma extensiva busca no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) cerca de 100 genes foram selecionados e esta lista foi confrontada com os resultados de exomas das famílias portadoras de GPAA, buscando-se assim alterações em genes com efeito reconhecido para a doença.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 Sequenciamento dos genes *MYOC* e *CYP1B1* em 13 famílias com GPAA.

Foram avaliadas as possíveis mutações na região codificadora do gene *MYOC*, em 2 pacientes de cada uma das 13 famílias. Não observaram-se mutações após o sequenciamento completo das demais regiões do gene *MYOC*, resultados correspondentes aos observados em outros estudos. A prevalência do GPAA é de 1,6% da população mundial (Rose et al., 2011), e o *MYOC* está envolvido em apenas cerca 2 a 4 % dos casos de GPAA (Banerjee et al., 2012), apresentando-se mais comumente alterado em casos de glaucoma primário de ângulo aberto do tipo juvenil (GPAA-J), perfazendo cerca de 30% destes casos no Brasil e em outros países. Mutações neste gene geralmente acarretam alterações de pressão intraocular (PIO) com valor acima de 21 mmHg.

A maior parte dos pacientes pertencentes às famílias incluídas neste estudo apresentaram GPAA com PIOs menores do que 25 mmHg. De acordo com os dados das publicações sobre o tema as mutações no gene *MYOC* geralmente estão relacionadas ao GPAA de pressão elevada e as prevalências das mutações são dependentes da etnia, sendo a Q368X mais comum em caucasianos e a T351I em asiáticos (Cheng et al., 2012).

Nestas 13 famílias também foi analisada a região codificadora do gene *CYP1B1*, inicialmente, em 2 indivíduos mais gravemente afetados pelo GPAA, totalizando 78 sequenciamentos, dividindo se o gene em três diferentes regiões. Cinco famílias avaliadas apresentaram os polimorfismos R48G, A119S, D449D e L432V. Dentre estas uma família apresentou também a variante rara P400S (Figura 10), que em homozigose é considerada causadora de GCP e em heterozigose pode ser relacionada ao fenótipo de GPAA (Dimasi et al., 2007). Alterações neste gene são reconhecidamente uma causa do glaucoma congênito primário (GCP) (Azmanov et al., 2011), muito embora já tenha sido sugerido que também sejam de suscetibilidade ao GPAA (Acharya et al., 2008) (López-Garrido et al., 2006) e GPAA-J (Bayat et al., 2008). As alterações D449D e L432V apresentam frequências elevadas na população de uma maneira geral; em caucasianos foi observada frequência de 63% assim como na média da população mundial. As frequências destes polimorfismos em outras populações de acordo com diferentes bancos de dados são apresentadas na tabela 6.

Tabela 6. Distribuição das variantes no gene *CYP1B1* encontradas neste estudo nas diferentes populações, mostradas em porcentagem.

Mutação	genótipo	européu	africano	americano	asiático	média
1-R48G	C	30	61	29	18	34
	G	70	39	71	82	66
2-A119S	A	30	55	29	17	32
	C	70	45	71	73	68
3-V243V	C	100	73	99	99	93
	G	0	27	1	1	7
4-V432L	A	37	77	31	9	38
	C	63	23	69	91	62
5-D449D	A	37	77	31	9	38
	C	63	23	69	91	62
6-N453S	T	80	99	84	99	90
	C	20	1	16	1	10
7-P400S	C	-	-	-	-	-
	G	-	-	-	-	-

Na família em que a variante rara P400S foi encontrada, um número total de sete diferentes variantes (descritas e numeradas na tabela 6) foi observada no total de sete indivíduos estudados.

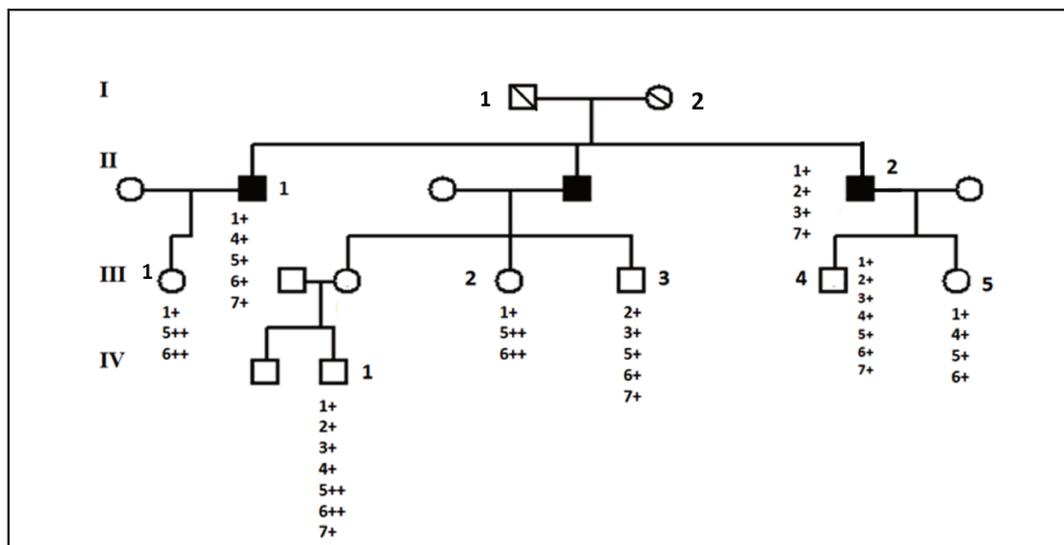


Figura 8. Heredograma da família, oito indivíduos de 4 diferentes gerações (I, II, III), apresentando as mutações (1 a 7 de acordo com a tabela 1) no gene *CYP1B1*. (+) um alelo mutado, (++) dois alelos mutados.

Tabela 7. Dados clínicos dos indivíduos pertencentes à família.

Indivíduo	Idade	PIO OD (mmHg)	PIO OE (mmHg)	FO OD	FO OE
II-1	82	-	18	1,0	-
II-2	75	19	14	0,9	0,9
III-1	43	10	10	0,2	0,3
III-2	54	10	12	0,2	0,6x0,5
III-3	48	14	14	0,7	0,3
III-4	39	14	14	0,5	0,2
III-5	40	10	10	0,6	0,3
IV-1	23	12	12	0,2	0,2

Dois indivíduos (I-1 e I-6) foram diagnosticados com GPAA e os indivíduos II-2, II-4, II-7 e II-8 apresentaram assimetria de escavação, que é uma característica de suspeição de lesão glaucomatosa do disco óptico podendo ser um indicativo de morte das células ganglionares da retina. Os indivíduos III-3 e II-5 apresentaram pigmentação aumentada no trabeculado, no entanto, a avaliação da quantidade do pigmento na estrutura do trabeculado demonstra que os níveis elevados não comprometem, necessariamente, o funcionamento das células componentes da malha trabecular (MT), estrutura envolvida na manutenção da pressão intraocular e conseqüentemente na patogênese do GPAA.

Assim, ainda não foi possível observar associação entre os polimorfismos encontrados e o fenótipo de GPAA ou qualquer relação genótipo/fenótipo. Um exemplo do sequenciamento das variantes observadas no gene *CYP11B1* e que forma o haplótipo mais estudado está representado na Figura 9.

A variante L432V em um estudo em famílias foi considerada um fator de suscetibilidade para o GPAA sendo um potencial fator de risco associado à doença e o genótipo GG referente a esta mutação foi considerado um genótipo de risco (Bhattacharjee et al., 2008).

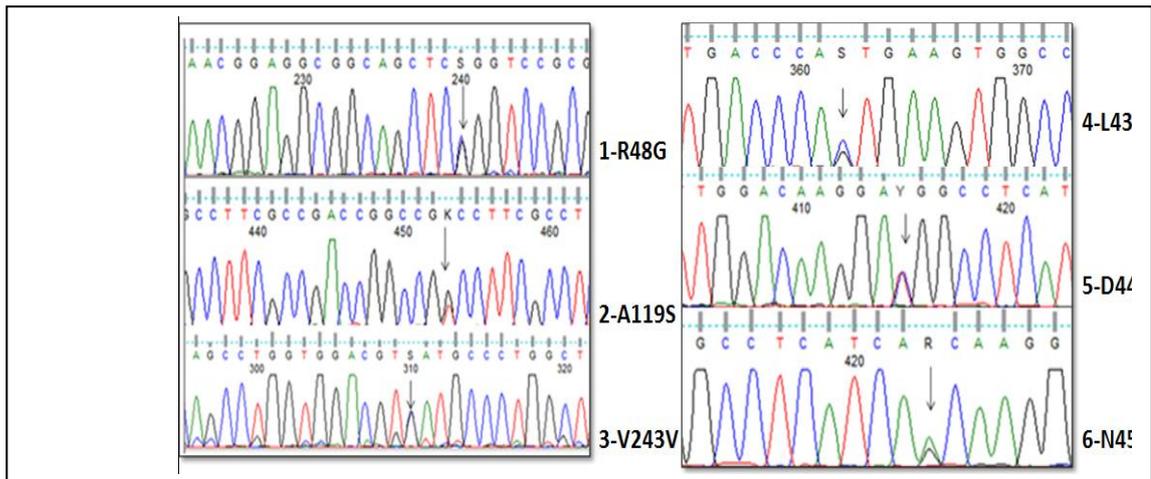


Figura 9. Eletroferograma do sequenciamento do gene *CYP11B1* apresentando as alterações encontradas neste estudo que formam o haplótipo mais relatado na literatura.

A variante D449D encontra-se em desequilíbrio de ligação com a L432V em diversos estudos, contradizendo os dados de Bhattacharjee em 2008 (Bhattacharjee et al., 2008). Atualmente, ambas podem ser consideradas apenas polimorfismos e as alterações não implicam necessariamente no fenótipo de GPAA ou em patogenicidade da proteína.

A mutação P400S (Figura 10) já foi observada em outro estudo com indivíduos apresentando o GCP com um padrão de herança autossômico recessivo (Dimasi et al., 2007). Neste estudo foi demonstrado que a P400S estava associada a outra mutação no mesmo gene, ocasionando o desenvolvimento de GCP. Foi observado que a mutação acarreta instabilidade da proteína madura, no entanto a atividade enzimática permanece semelhante à atividade da proteína sem esta troca de aminoácidos (Campos-Mollo et al., 2009). A mutação P400S apresenta penetrância incompleta sendo considerada, assim como as mutações P52L, G61E, Y81N e E229K, alelos hipomórficos (Campos-Mollo et al., 2009).

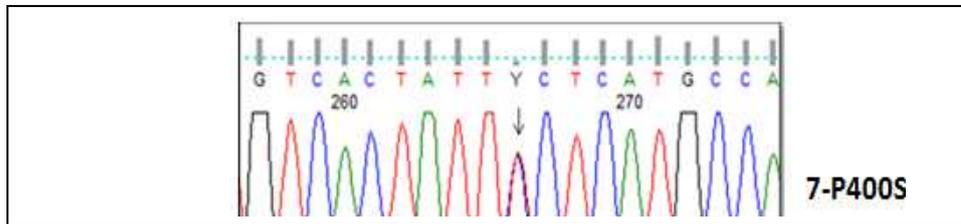


Figura 10. Eletroferograma representando a mutação P400S no gene *CYP1B1*.

Mutações que levam à instabilidade ou diminuição da função enzimática da proteína *CYP1B1* são consideradas fatores de predisposição para o GPAA (Pasutto et al., 2010), adicionalmente, genótipos de *CYP1B1* apresentaram expressividade variável a alta penetrância em indivíduos com GCP (Suri et al., 2009) (Micheal et al., 2015). Existem haplótipos que levam à predisposição ao glaucoma, e as mutações que causam GCP variam entre as populações étnicas de acordo com o aparecimento de mutações fundadoras (Li et al., 2011). Nas populações latino-americanas não brasileiras a relevância da relação entre as mutações no *CYP1B1* e GCP é pequena contabilizando menos de 10% dos casos (Zenteno et al., 2008). Há cerca de 20 anos já se especulava a atuação da proteína codificada pelo gene *CYP1B1* no desenvolvimento dos tecidos oculares através do metabolismo de outras moléculas ativas atuantes no desenvolvimento do olho (Stoilov et al., 1997). Posteriormente, foi sugerido que *CYP1B1* e *MYOC* poderiam interagir em uma via comum. Assim o glaucoma poderia ser uma doença multialélica em alguns casos. Desta maneira alterações no gene *CYP1B1* poderiam interferir na função da miocilina (Vincent et al., 2002), alterando a expressão do gene *MYOC* (Bagiyeva et al., 2007), hipótese melhor elucidada em um recente estudo após a compreensão da importância de alterações na capacidade enzimática da proteína citocromo P450 sobre o metabolismo do 17β estradiol. A *CYP1B1* é uma enzima multifatorial envolvida no metabolismo de ácidos graxos, ácido retinóico e do 17β estradiol. Desta maneira vários estudos demonstraram que mutações no gene *CYP1B1* que resultam na perda de uma ou mais das suas atividades enzimáticas de estabilidade e diminuição da abundância relativa poderiam explicar a associação do *CYP1B1* com o GPAA em caráter monogênico ou digênico com a influência do *MYOC*. A proteína *CYP1B1* pode interferir na expressão do gene *MYOC* através do metabolismo do 17β estradiol em 4-hidroxi estradiol nas células da malha trabecular levando à perda da capacidade de metabolizar esta molécula. O acúmulo de 17β estradiol no meio celular acarreta uma ativação prolongada da expressão do gene via

elementos responsivos a estrógenos, aos quais se liga o 17β estradiol. Os elementos responsivos a estrógenos estão localizados na região promotora do gene *MYOC* e ativam a transcrição do gene (Mookherjee et al., 2012). No entanto para melhor compreensão da real influência destas alterações em relação ao GPAA necessita-se de maior investigação, havendo então a necessidade do estudo das regiões codificadoras do gene *CYP1B1* em um maior número de indivíduos relacionados nestas famílias, afetados e não afetados pelo GPAA.

3.4.2 : Estudo de sequenciamento total de exomas em 2 famílias portadoras de GPAA

3.4.2.1 Análise do sequenciamento total de exomas

Este estudo utilizou o método denominado *Whole Exome Sequencing* (WES) ou sequenciamento completo de exomas. Foi considerado o modelo de herança autossômica dominante ou monogênica,. Para que isto seja possível um grande número de variantes, com reconhecida relevância médica ou sem relevância ainda conhecida foram analisadas individualmente.

Uma análise em todo o exoma dos indivíduos foi efetuada também com o objetivo de reconhecer novas variantes possivelmente envolvidas na fisiopatologia do glaucoma nestas famílias. Foram utilizadas ferramentas que permitem avaliar os dados gerados que correspondem às sequências codificadoras e regulatórias dos genes. As variantes identificadas foram procuradas em bancos de dados de variações genéticas como do projeto ESP5400 (evs.gs.washington.edu/EVS/), *1000 genomes* (www.1000genomes.org/) e HGMD (www.hgmd.org/). As mutações novas foram avaliadas em relação ao impacto estrutural e funcional na proteína (SIFT, Polyphen2). As regiões funcionais foram verificadas, pois alterações podem ocorrer em sítios catalíticos relacionados com a função da proteína e desta maneira seria possível entender o efeito molecular que apresentasse relação com o desenvolvimento do GPAA. Os genes selecionados nas etapas finais de análise foram estudados com relação ao seu nível de expressão nos diferentes tecidos oculares com base nas informações contidas no banco de dados de expressão em tecidos do olho *Ocular tissue database* (<https://genome.uiowa.edu/otdb>).

Adicionalmente, foi obtida uma extensa lista de genes que foram selecionados em diversas populações por estudos de ligação e de associação. O levantamento bibliográfico foi executado em publicações acessadas no endereço do banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed). Como referência principal o artigo de revisão recente de Janssen e colaboradores (Janssen et al., 2013) foi utilizado na busca do principais genes candidatos. Desde a descoberta do envolvimento da miocilina por Stone e colaboradores (Stone et al., 1997) poucos genes foram sugeridos como causadores do GPAA, dentre eles o *WDR36*, *OTPN*, *ASB10*, *TBK1* e *NTF4*. No entanto, muitos outros estudos reconhecem regiões cromossômicas em famílias ou amostras representativas de uma

população, estudos de ligação e associação respectivamente, que nos fornecem dicas importantes a respeito de genes envolvidos na modulação dos fenótipos relacionados ao GPAA, como aumento da escavação e elevação da PIO.

Nas famílias estudadas (dez indivíduos) foram obtidas as sequências referentes a todo conjunto de regiões traduzidas em proteínas, além de algumas regiões regulatórias localizadas nas proximidades dos limites da posição de início e final da região codificadora. Foram obtidas sequências de cerca de 50 milhões de pares de bases de cada um dos indivíduos, referentes aos dois componentes genômicos presentes em um indivíduo diplóide. As etapas de obtenção das sequências, alinhamento, processamento e obtenção das variantes foram efetuadas, restando apenas reconhecer as variantes de importância médica e fenotípica para o GPAA descartando variantes comuns ou que não interferissem no funcionamento da proteína.

Foram avaliadas também as mutações encontradas dentro da região previamente selecionada pelo estudo de ligação. A figura 11 apresenta o resultado inicial obtido no experimento. As notas obtidas em relação à qualidade das sequências foram consideradas satisfatórias para todos os indivíduos. A porcentagem de GC para os indivíduos 1 e 2 foi de 50%, enquanto que para os indivíduos 3 e 4 foi de 49%. Para o parâmetro de qualidade relacionado ao conteúdo de bases nitrogenadas todas as amostras foram aprovadas. Em relação à qualidade das sequências super-representadas novamente nenhuma amostra foi reprovada. Os parâmetros de conteúdo de Kmer, de análises de qualidade por bases e sequências GC, nível de duplicação de sequências e controle de qualidade a respeito do conteúdo de base sequenciada foram classificados como reprovados ou em alerta, no entanto para as análises pretendidas nenhum destes parâmetros influenciou no prosseguimento do estudo.

Efetuuou-se a comparação entre os dois sentidos do DNA capturado (a metodologia *paired end* forma fragmentos nos dois sentidos da fita de DNA) em 2 indivíduos diferentes (Figura 11A e 11B), com o intuito de exemplificar a análise. Foi possível observar que os valores das notas referentes à qualidade (acima de 29, área verde considerada satisfatória) foram considerados suficientes em todas as amostras. Apenas um pequeno trecho que contém segmentos com mais de 85 pares de bases em um indivíduo apresentou qualidade abaixo do esperado, no entanto não influenciou na qualidade final das análises.

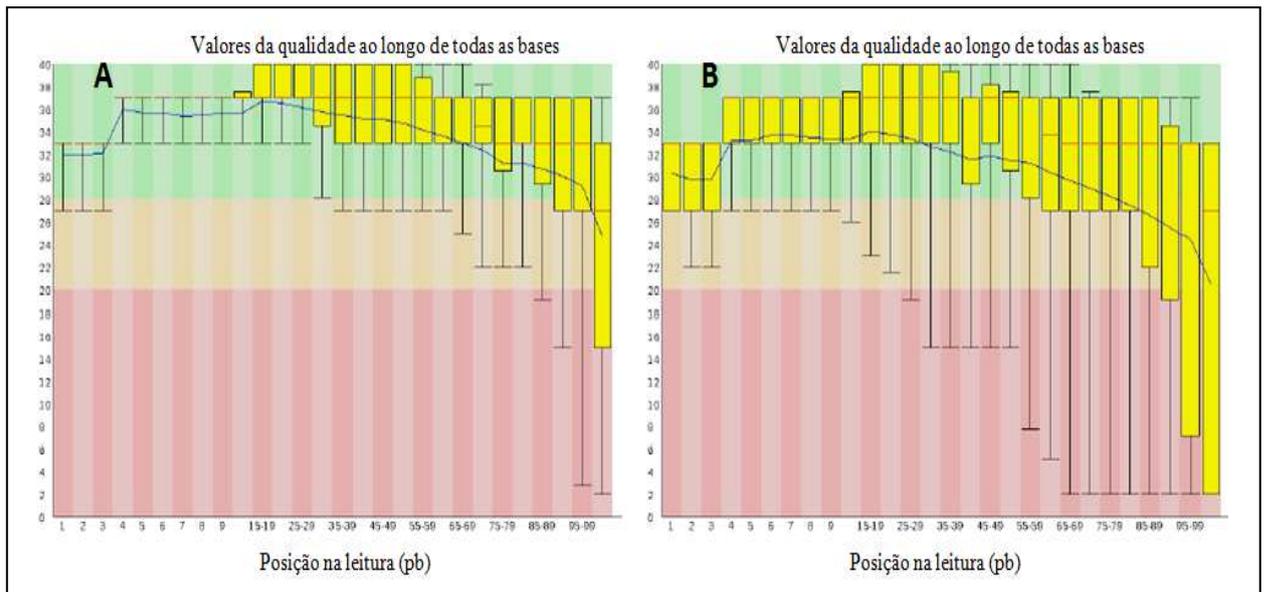


Figura 11. Exemplo de comparação entre os fragmentos em ambos os sentidos em um indivíduo. A) *forward*; B) *reverse*. Pb: pares de bases.

A recalibração de bases foi efetuada e a quantidade de bases lidas pode ser observada na figura 12, como exemplo do que foi realizado para todos os indivíduos das duas famílias. Partindo de um total de cerca de 50 milhões de bases lidas, após o primeiro alinhamento cerca de 40 milhões de bases foram selecionadas.

Após a recalibração uma redução pequena levou à obtenção de cerca de 35 milhões de bases. A cobertura esperada para este experimento é de cerca de 30 vezes para que seja considerado válido; esta cobertura permite a observação completa das sequências. As médias das coberturas obtidas de quatro indivíduos estudados ficaram acima do valor de cobertura de 50 vezes, o que permitiu que todos os indivíduos fossem utilizados para a análise.

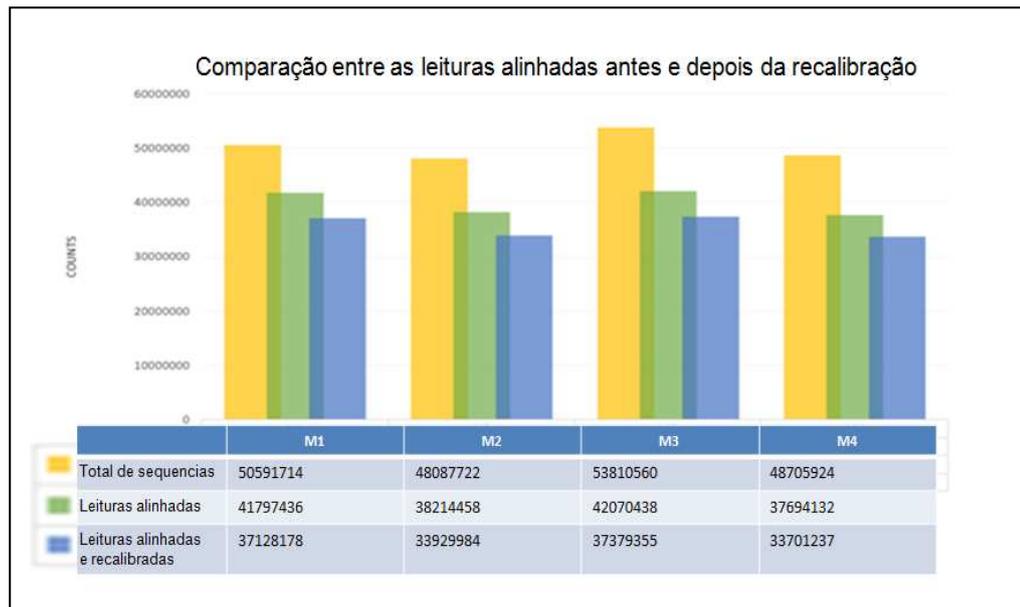


Figura 12. Comparação entre o número de bases das leituras alinhadas antes e após a recalibração.

3.4.2.2 Família 1

Na família 1, um estudo anterior, de ligação, foi efetuado por meio de um experimento que possibilita avaliar marcadores distribuídos por todo o genoma (*10K SNP Array, Affymetrix, Santa Clara, Califórnia, EUA*), com a intenção de encontrar regiões cromossômicas responsáveis pela doença. Obteve-se um valor de *LOD Score* de 2.4 em uma região do cromossomo 2p22-23 que contém 32 SNPs, do rs718152 ao rs717806 (Santos BAC, 2013). Na região selecionada são encontrados os seguintes genes: *Calcium-activated neutral proteinase 13 (CAPN13)*, *UDP-N-acetylalpha-D-galactosamine polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 14 (GALNT14)*, *Xanthine dehydrogenase (XDH)*, *Steroid-5-alpha-reductase alpha polypeptide 2 (SRD5A2)*, e *Latent transforming growth factor beta binding protein 1 (LTBP1)*. Com este resultado tornou-se justificável a utilização de técnicas de sequenciamento em larga escala. O WES foi o procedimento de escolha por apresentar uma proporção custo benefício satisfatório devido à quantidade de informação obtida com este experimento. A região cromossômica selecionada contém genes que podem ser avaliados em suas regiões codificadoras da mesma maneira que todos os outros genes de cada um dos integrantes da família estudada.

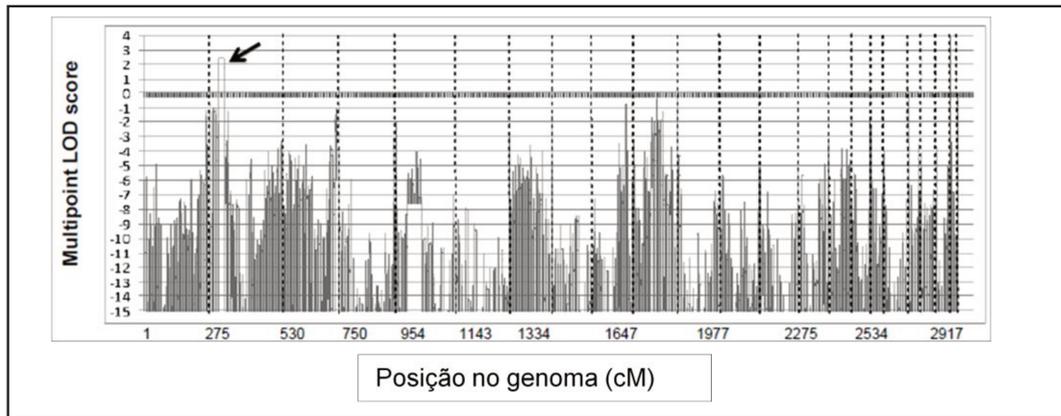


Figura 13. *Multipoint genome wide LOD score* da família 1. A seta indica a região de pico ($LOD = 2.4$) na região 2p22-23 (Santos 2013, Dissertação de Mestrado, FCM, Unicamp).

Observou-se que a região cromossômica contém diferentes genes que possivelmente estão envolvidos na fisiopatologia do glaucoma. Todo o exoma dos indivíduos afetados e não afetados da família foi avaliado, com ênfase nos genes localizados na região identificada pelo estudo de ligação (*LTBP1*, *XDH*, *SRD5A2*, *CAPN13* e *GALNT14*) e nos loci identificados em estudos anteriores (*GLC1A-Q*), assim como em genes moduladores ou relacionados por estudos de associação. Não foram observadas variantes que segregassem com a doença nos genes localizados na região 2p22-23. De fato, para que esta região fosse considerada ligada à doença o *LOD score* deveria ser acima de 3,0. No entanto, a família era pouco informativa e esta região não poderia deixar de ser confirmada.

Considerou-se para esta análise o modelo de herança autossômica dominante. Para que isto fosse possível, uma grande quantidade de variantes com reconhecida relevância médica ou sem relevância ainda conhecida foi analisada.

Desta maneira diante da grande quantidade de variantes reconhecidas no processo de sequenciamento completo de exomas algumas etapas de filtragem foram delineadas com o intuito de reduzir a quantidade de genes candidatos a serem causadores da doença nesta família.

O aumento da PIO seria um fator de suscetibilidade praticamente decisivo para o GPAA nesta família. Para montar um modelo de herança autossômica dominante, uma seleção inicial de variantes foi efetuada, considerando-se apenas as alterações com frequências baixas nas diferentes populações de acordo com os bancos de dados (Exac,

HGMD, ESP5400, *1000genomes*) ou ainda alterações que estivessem em genes previamente relacionados ao GPAA. A análise (modelo dominante, Figura 14) buscou variantes raras ($MAF < 1\%$) e deletérias presentes em heterozigose que segregassem com a doença nos dois indivíduos afetados e que não estivessem presentes nas pessoas não afetadas.

Os valores de predição de potencial deletério, com dano estrutural em região conservada das proteínas foram obtidos por meio dos programas SIFT e Polyphen2 na plataforma Ensemble (VEP). Nesta etapa também foram selecionados apenas genes com informação sobre expressão em tecidos oculares ou em tecido nervoso que justificasse a existência da neuropatia ótica.

O fluxograma da análise de exomas iniciou-se com a obtenção das informações mais relevantes sobre a alteração de acordo com o banco de dados do genoma de referência humano (GRCh38) disponibilizado no banco de dados.

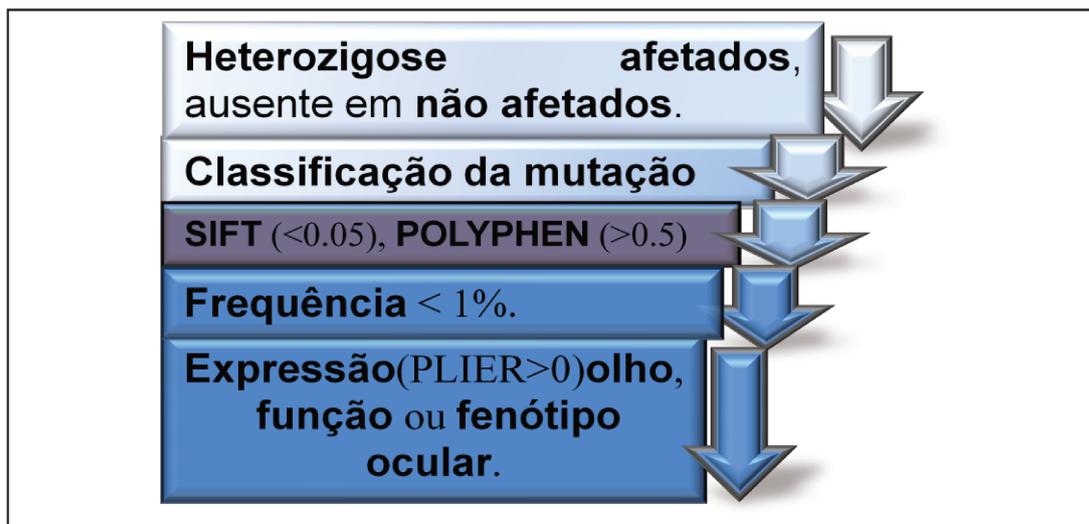


Figura 14. Fluxograma da análise para seleção de variantes do modelo dominante.

O modelo dominante reduziu o número de variantes para cerca de 7951, dentre as quais 136 eram mutações novas. Entre as 136 mutações não descritas 7 obtiveram pontuação nos sites SIFT e Polyphen2 e 3 estão localizadas em sítio de *splicing*. Partindo das 7815 mutações restantes, considerando-se aquelas que representam alterações em regiões codificantes não sinônimas ou em região de *splicing* ou ganho e perda de códon de parada, obtivemos 2346 variantes. Destas, 367 obtiveram pontuações significativas nos programas SIFT (< 0.05) e Polyphen2 (> 0.5) e 42 possuem frequência menor do que 1% na média da população geral. Posteriormente, foram testadas por sequenciamento direto em outros

membros da família, as alterações selecionadas de acordo com os critérios descritos na tabela 8.

Tabela 8. Informações relevantes sobre os genes que contêm alterações selecionadas para avaliar a segregação na família 1.

Gene	PLIER	Função	Possível papel na doença
<i>FNI</i>	648	Glicoproteína presente na superfície da matriz extracelular	Envolvida na adesão e mobilidade celular
<i>GPR179</i>	63	Domínio “EGF-like” de ligação de cálcio	Cegueira noturna estacionária congênita (recessivo)
<i>ADAMTSL4</i>	42	Desintegrina, metaloproteinase com motivo de trombospondina	<i>Ectopia lentis</i> (recessivo)
<i>ICAIL</i>	67	Domínio homólogo a arfaptina, presente tanto no citosol como ligado a membrana do aparato de Golgi	Esclerose lateral amiotrófica (recessivo)
<i>GALC</i>	126	Proteína lisossomal que hidrolisa diversas moléculas como a galactose	Doença de Krabbe, leucodistrofia com perda de visão e audição.
<i>GOSR1</i>	67	Proteína de transporte no retículo endoplasmático e aparato de Golgi.	Proteção contra citotoxicidade induzida por peróxido de hidrogênio, em condições de ausência de glutatona em células neuronais, regulando os níveis de “ROS” via inibição do p38 e MAPK
<i>COL15A1</i>	31	Componente da matriz extracelular	Previamente relacionado ao GPAA com efeito modulador

A avaliação da segregação das variantes indicou que nenhuma das sete variantes testadas até o momento segregou com a doença na família, como observado no heredograma da figura 15.

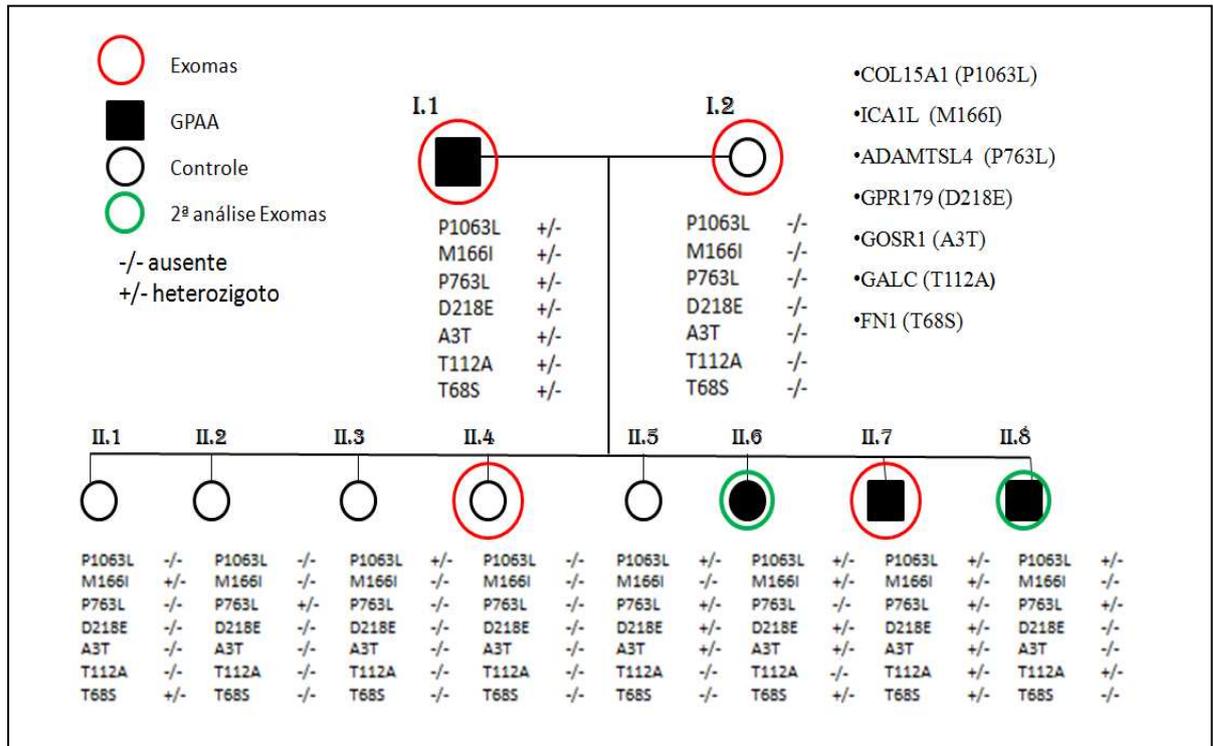


Figura 15. Heredograma da família 1 com os genótipos das mutações em pacientes e controles.

3.4.2.3 Família 2:

Neste estudo, também realizado com o *SNP Array 10K* da *Affymetrix* uma região do cromossomo 5 (5q31.2) obteve *LOD Score* de 2,08 na região 5q31.2 (Figura 16). Apesar de não ter sido obtido o *LOD score* mínimo de 3,0, esta região contém uma série de genes de interesse em relação ao fenótipo do glaucoma.

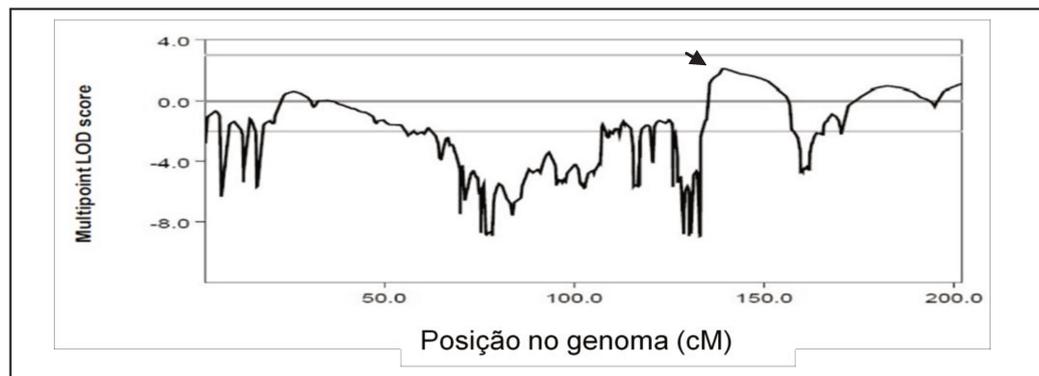


Figura 16. Multipoint genome wide *LOD score* da família 2. A seta indica a região de pico ($LOD = 2,08$) na região 5q31.2. (Santos 2013, Dissertação de Mestrado, FCM, Unicamp).

A proteína produzida pelo gene *SPARC* tem função regulatória na hipertensão ocular mediada por TGF-beta 2 (Swaminathan et al., 2014), como componente da matriz extracelular o aumento da expressão da proteína *SPARC* pode levar ao aumento da PIO (Oh et al., 2013). A região também contém o gene da neuroregulina 2, *NRG2* da família do gene *NRG3* previamente considerado candidato por estar na região de ligação a doença *GLC1M*, além dos genes *PCDHGB4* e *CTNNA1*, ambos os genes codificam proteínas do tipo caderinas com função de adesão e comunicação entre células.

Nesta família existe um grande número de indivíduos afetados, o que aponta para um provável caráter mendeliano do GPAA. Inicialmente trabalhou-se com a hipótese de herança autossômica dominante e uma seleção de variantes foi efetuada, considerando-se apenas as alterações com frequências baixas nas diferentes populações de acordo com os bancos de dados (Exac, HGMD, ESP5400, 1000genomes) ou ainda alterações que estivessem em genes previamente relacionados ao GPAA. Na análise (modelo dominante, Figura 14), foram selecionados apenas genes com informação sobre expressão em tecidos oculares que justificasse a existência da neuropatia óptica.

Diante da quantidade de genes obtidos no processo de sequenciamento completo de exomas algumas etapas de filtragem foram delineadas com o intuito de reduzir a quantidade de genes candidatos a serem causadores da doença nesta família. O modelo dominante reduziu o número de variantes para 16987. Foram selecionadas as alterações que obtiveram pontuações significativas nos programas SIFT (<0.05) e Polyphen2 (>0.5) e que possuem frequência menor do que 1% na média da população geral totalizando 79 mutações. Posteriormente, foram testadas por sequenciamento direto em outros membros da família, as alterações selecionadas de acordo com os critérios descritos na tabela 9.

Tabela 9. Informações relevantes sobre os genes que contêm alterações selecionadas para avaliar a segregação na família 2.

Gene	PLIER	Função	Possível papel na doença
<i>DNMBP</i>	62	Fator de troca de nucleotídeo de guanina, leva ativação de GTPases	Regulação das junções celulares
<i>PRSS12</i>	36	Serina protease da família das tripsinas	Reorganização estrutural de neurônios envolvidos com aprendizado
<i>NID2</i>	42	Membro das proteínas da membrana basal da família das nideinas	Manutenção da estrutura da MB via interação com colágeno I e IV e lâminina.
<i>NINL</i>	34	Função na organização de microtúbulos	Envolvimento com a doença de Usher
<i>TMTC3</i>	71	Proteína transmembrana	Envolvido com o estresse do retículo endoplasmático, família do <i>TMTC2</i> previamente relacionado ao GPAA

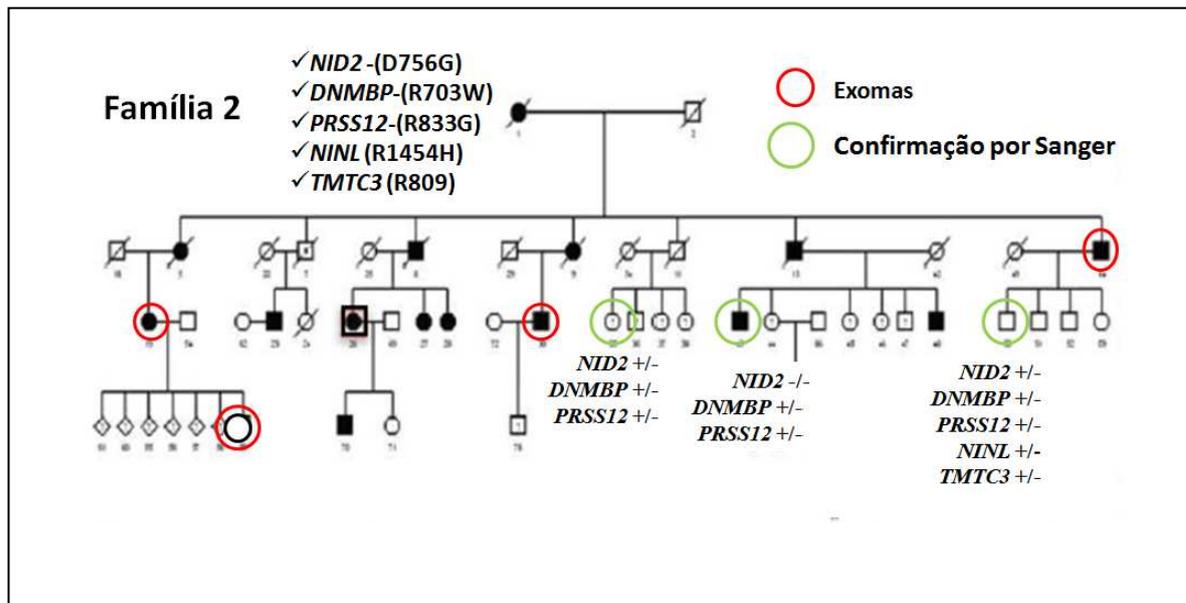


Figura 17. Heredograma da família 2 com os genótipos das mutações em pacientes e controles.

A avaliação da segregação das variantes indicou que nenhuma das 5 variantes testadas até o momento segregou com a doença na família, como observado no heredograma da figura 17 em que um controle apresenta todas as mutações em heterozigose.

Estudos de ligação em famílias com GPAA descreveram alguns genes causais para esta afecção. As técnicas utilizadas neste tipo de abordagem evoluíram nos últimos anos, passando da utilização de marcadores microssatélites à utilização de variantes comuns do tipo SNP e atualmente as ferramentas de sequenciamento de nova geração também são utilizadas neste desenho de estudo com a vantagem de descrever variações funcionais raras com maior possibilidade de envolvimento com a doença. No entanto, alguns outros eventos genéticos também estão associados à etiologia do GPAA, por exemplo, a variação do número de cópias de genes. Dentre as limitações da técnica de sequenciamento de exomas destaca-se a variação da cobertura obtida entre os indivíduos e a falta de cobertura em regiões cromossômicas que podem ser importantes para a determinação da herança genética responsável pelo aparecimento do GPAA. Desta maneira, além dos estudos de exomas e de ligação é possível que outras técnicas, como a detecção de CNVs em genes candidatos e sequenciamento total do genoma, possam elucidar as causas genéticas do glaucoma nas duas famílias.

Muito embora a história familiar seja considerada um fator de risco importante para o GPAA esta doença é considerada, em grande parte dos casos, de etiologia complexa e apresenta grande variação em seus componentes clínicos que podem ser influenciados por fatores genéticos. Já foram relatadas mutações em genes que apresentaram efeito conhecido na modulação do fenótipo da doença, como é o caso do *CYP11B*. Desta maneira, reconhecer uma maior quantidade de variantes permite avaliar o possível efeito de proteínas alteradas em relação à proteína selvagem. O ganho de função de diferentes proteínas mutantes pode influenciar os mecanismos de desenvolvimento da doença. A técnica utilizada anteriormente nesta família (*Linkage*) não permite reconhecer as variantes encontradas em região codificadora, mas permite reconhecer marcadores genéticos relacionados ao GPAA na família. Assim, devido ao poder de avaliar tanto a região identificada pelo estudo de ligação como outras regiões do genoma o sequenciamento de exomas foi utilizado. O desenvolvimento de novas tecnologias no campo da genética e biologia molecular permitiu que novos estudos na busca pelas causas da degeneração óptica glaucomatosa fossem desenvolvidos. Atualmente os estudos que buscam determinar as causas desta doença dispõem de ferramentas, como por exemplo, edição gênica com o sistema CRISPR/Cas9 (Sluch et al., 2015) e indução de pluripotência em fibroblastos e diferenciação em células ganglionares da retina de pacientes com GPAA (Ohlemacher et al., 2016). Estas ferramentas associadas a modelos animais podem definir novas causas moleculares da cegueira. O entendimento das causas de aumento de pressão intraocular e da degeneração das CGR permitiria o desenvolvimento de novas formas de tratamento para esta moléstia (Fernandes et al., 2015). É possível que estudos funcionais consigam responder ou confirmar o papel de determinadas alterações genéticas na fisiopatologia do GPAA e das outras formas primárias de glaucoma.

4.0 Conclusões

O gene *NTF4* até o momento não foi associado ao GPAA nesta amostra da população brasileira. Para se confirmar a associação deste gene com a doença ainda são necessários estudos que avaliem regiões regulatórias deste gene, como o promotor.

A investigação dos alelos de risco e proteção relacionados ao GPAA por meio de *GWAS* aponta para a associação de 2 regiões gênicas (*CAVI/2* e *CDKN2B*) nunca antes descritas na população brasileira.

Alterações no gene *MYOC* são mais relevantes em GPAA-J e não foram encontradas nas 13 famílias com GPAA na forma adulta.

A alteração P400S no gene *CYP1B1* pode estar envolvida com o GPAA. No entanto, para se elucidar o envolvimento deste gene com o GPAA na família mais indivíduos deverão ser avaliados em relação ao fenótipo de glaucoma buscando-se uma melhor determinação da relação genótipo-fenótipo.

As análises por WES não apontaram, até o momento, as causas genéticas do GPAA nas 2 famílias avaliadas.

5.0 Bibliografias

- Abu-Amero, K.K., Kondkar, A.A., Mousa, A., Osman, E.A., Al-Obeidan, S.A., 2012. Lack of association of SNP rs4236601 near CAV1 and CAV2 with POAG in a Saudi cohort. *Mol. Vis.* 18, 1960–1965.
- Acharya, M., Mukhopadhyay, A., Bhattacharjee, A., Thakur, S.K.D., Bandyopadhyay, A.K., Ray, K., 2008. Complex genetics of glaucoma: defects in CYP1B1, and not MYOC, cause pathogenesis in an early-onset POAG patient with double variants at both loci. *J. Genet.* 87, 265–269.
- Adzhubei, I.A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V.E., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A.S., Sunyaev, S.R., 2010. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat. Methods* 7, 248–249. doi:10.1038/nmeth0410-248
- Allingham, R.R., Wiggs, J.L., Hauser, E.R., Larocque-Abramson, K.R., Santiago-Turla, C., Broomer, B., Del Bono, E.A., Graham, F.L., Haines, J.L., Pericak-Vance, M.A., Hauser, M.A., 2005. Early Adult-Onset POAG Linked to 15q11-13 Using Ordered Subset Analysis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46, 2002–2005. doi:10.1167/iovs.04-1477
- Alsbirk, P.H., 1976. Primary angle-closure glaucoma. Oculometry, epidemiology, and genetics in a high risk population. *Acta Ophthalmol. Suppl.* 5–31.
- Alvarado, J., Murphy, C., Juster, R., 1984. Trabecular meshwork cellularity in primary open-angle glaucoma and nonglaucomatous normals. *Ophthalmology* 91, 564–579.
- Azmanov, D.N., Dimitrova, S., Florez, L., Cherninkova, S., Draganov, D., Morar, B., Saat, R., Juan, M., Arostegui, J.I., Ganguly, S., Soodyall, H., Chakrabarti, S., Padh, H., López-Nevot, M.A., Chernodranska, V., Angelov, B., Majumder, P., Angelova, L., Kaneva, R., Mackey, D.A., Tournev, I., Kalaydjieva, L., 2011. LTBP2 and CYP1B1 mutations and associated ocular phenotypes in the Roma/Gypsy founder population. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 19, 326–333. doi:10.1038/ejhg.2010.181
- Bagiyeva, S., Marfany, G., Gonzalez-Angulo, O., Gonzalez-Duarte, R., 2007. Mutational screening of CYP1B1 in Turkish PCG families and functional analyses of newly detected mutations. *Mol. Vis.* 13, 1458–1468.
- Bailey, J.N.C., Loomis, S.J., Kang, J.H., Allingham, R.R., Gharahkhani, P., Khor, C.C., Burdon, K.P., Aschard, H., Chasman, D.I., Igo, R.P., Hysi, P.G., Glastonbury, C.A., Ashley-Koch, A., Brilliant, M., Brown, A.A., Budenz, D.L., Buil, A., Cheng, C.-Y., Choi, H., Christen, W.G., Curhan, G., De Vivo, I., Fingert, J.H., Foster, P.J., Fuchs, C., Gaasterland, D., Gaasterland, T., Hewitt, A.W., Hu, F., Hunter, D.J., Khawaja, A.P., Lee, R.K., Li, Z., Lichten, P.R., Mackey, D.A., McGuffin, P., Mitchell, P., Moroi, S.E., Perera, S.A., Pepper, K.W., Qi, Q., Realini, T., Richards, J.E., Ridker, P.M., Rimm, E., Ritch, R., Ritchie, M., Schuman, J.S., Scott, W.K., Singh, K., Sit, A.J., Song, Y.E., Tamimi, R.M., Topouzis, F., Viswanathan, A.C., Verma, S.S., Vollrath, D., Wang, J.J., Weisschuh, N., Wissinger, B., Wollstein, G., Wong, T.Y., Yaspan, B.L., Zack, D.J., Zhang, K., Study, E.-N.E., ANZRAG Consortium, Weinreb, R.N., Pericak-Vance, M.A., Small, K., Hammond, C.J., Aung, T., Liu, Y., Vithana, E.N., MacGregor, S., Craig, J.E., Kraft, P., Howell, G., Hauser, M.A., Pasquale, L.R., Haines, J.L., Wiggs, J.L., 2016. Genome-wide association analysis identifies TXNRD2, ATXN2 and FOXC1 as susceptibility loci for primary open-angle glaucoma. *Nat. Genet.* 48, 189–194. doi:10.1038/ng.3482
- Baird, P.N., Foote, S.J., Mackey, D.A., Craig, J., Speed, T.P., Bureau, A., 2005. Evidence for a novel glaucoma locus at chromosome 3p21-22. *Hum. Genet.* 117, 249–257. doi:10.1007/s00439-005-1296-x
- Banerjee, D., Bhattacharjee, A., Ponda, A., Sen, A., Ray, K., 2012. Comprehensive analysis of myocilin variants in east Indian POAG patients. *Mol. Vis.* 18, 1548–1557.
- Banfield, M.J., Naylor, R.L., Robertson, A.G., Allen, S.J., Dawbarn, D., Brady, R.L., 2001. Specificity in Trk receptor:neurotrophin interactions: the crystal structure of TrkB-d5 in complex with neurotrophin-4/5. *Struct. Lond. Engl.* 1993 9, 1191–1199.

- Bayat, B., Yazdani, S., Alavi, A., Chiani, M., Chitsazian, F., Tusi, B.K., Suri, F., Narooie-Nejhad, M., Sanati, M.H., Elahi, E., 2008. Contributions of MYOC and CYP1B1 mutations to JOAG. *Mol. Vis.* 14, 508–517.
- Bhattacharjee, A., Banerjee, D., Mookherjee, S., Acharya, M., Banerjee, A., Ray, A., Sen, A., Ray, K., 2008. Leu432Val polymorphism in CYP1B1 as a susceptible factor towards predisposition to primary open-angle glaucoma. *Mol. Vis.* 14, 841–850.
- Burdon, K.P., Crawford, A., Casson, R.J., Hewitt, A.W., Landers, J., Danoy, P., Mackey, D.A., Mitchell, P., Healey, P.R., Craig, J.E., 2012. Glaucoma risk alleles at CDKN2B-AS1 are associated with lower intraocular pressure, normal-tension glaucoma, and advanced glaucoma. *Ophthalmology* 119, 1539–1545. doi:10.1016/j.ophtha.2012.02.004
- Burdon, K.P., Macgregor, S., Hewitt, A.W., Sharma, S., Chidlow, G., Mills, R.A., Danoy, P., Casson, R., Viswanathan, A.C., Liu, J.Z., Landers, J., Henders, A.K., Wood, J., Souzeau, E., Crawford, A., Leo, P., Wang, J.J., Rochtchina, E., Nyholt, D.R., Martin, N.G., Montgomery, G.W., Mitchell, P., Brown, M.A., Mackey, D.A., Craig, J.E., 2011. Genome-wide association study identifies susceptibility loci for open angle glaucoma at TMCO1 and CDKN2B-AS1. *Nat. Genet.* 43, 574–578. doi:10.1038/ng.824
- Campos-Mollo, E., López-Garrido, M.-P., Blanco-Marchite, C., Garcia-Feijoo, J., Peralta, J., Belmonte-Martínez, J., Ayuso, C., Escribano, J., 2009. CYP1B1 mutations in Spanish patients with primary congenital glaucoma: phenotypic and functional variability. *Mol. Vis.* 15, 417–431.
- Cao, D., Jiao, X., Liu, X., Hennis, A., Leske, M.C., Nemesure, B., Hejtmancik, J.F., 2012. CDKN2B polymorphism is associated with primary open-angle glaucoma (POAG) in the Afro-Caribbean population of Barbados, West Indies. *PloS One* 7, e39278. doi:10.1371/journal.pone.0039278
- Carbone, M.A., Ayroles, J.F., Yamamoto, A., Morozova, T.V., West, S.A., Magwire, M.M., Mackay, T.F.C., Anholt, R.R.H., 2009. Overexpression of Myocilin in the Drosophila Eye Activates the Unfolded Protein Response: Implications for Glaucoma. *PLOS ONE* 4, e4216. doi:10.1371/journal.pone.0004216
- Carnes, M.U., Liu, Y.P., Allingham, R.R., Whigham, B.T., Havens, S., Garrett, M.E., Qiao, C., NEIGHBORHOOD Consortium Investigators, Katsanis, N., Wiggs, J.L., Pasquale, L.R., Ashley-Koch, A., Oh, E.C., Hauser, M.A., 2014. Discovery and functional annotation of SIX6 variants in primary open-angle glaucoma. *PLoS Genet.* 10, e1004372. doi:10.1371/journal.pgen.1004372
- Chen, F., Klein, A.P., Klein, B.E.K., Lee, K.E., Truitt, B., Klein, R., Iyengar, S.K., Duggal, P., 2015. Exome Array Analysis Identifies CAV1/CAV2 as a Susceptibility Locus for Intraocular Pressure. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 56, 544–551. doi:10.1167/iovs.14-15204
- Chen, L.J., Ng, T.K., Fan, A.H., Leung, D.Y.L., Zhang, M., Wang, N., Zheng, Y., Liang, X.Y., Chiang, S.W.Y., Tam, P.O.S., Pang, C.P., 2012. Evaluation of NTF4 as a causative gene for primary open-angle glaucoma. *Mol. Vis.* 18, 1763–1772.
- Chen, Y., Lin, Y., Vithana, E.N., Jia, L., Zuo, X., Wong, T.Y., Chen, L.J., Zhu, X., Tam, P.O.S., Gong, B., Qian, S., Li, Z., Liu, X., Mani, B., Luo, Q., Guzman, C., Leung, C.K.S., Li, X., Cao, W., Yang, Q., Tham, C.C.Y., Cheng, Y., Zhang, X., Wang, N., Aung, T., Khor, C.C., Pang, C.P., Sun, X., Yang, Z., 2014. Common variants near ABCA1 and in PMM2 are associated with primary open-angle glaucoma. *Nat. Genet.* 46, 1115–1119. doi:10.1038/ng.3078
- Cheng, J.-W., Cheng, S.-W., Ma, X.-Y., Cai, J.-P., Li, Y., Lu, G.-C., Wei, R.-L., 2012. Myocilin polymorphisms and primary open-angle glaucoma: a systematic review and meta-analysis. *PloS One* 7, e46632. doi:10.1371/journal.pone.0046632
- Cornes, B.K., Khor, C.C., Nongpiur, M.E., Xu, L., Tay, W.-T., Zheng, Y., Lavanya, R., Li, Y., Wu, R., Sim, X., Wang, Y.-X., Chen, P., Teo, Y.Y., Chia, K.-S., Seielstad, M., Liu, J., Hibberd, M.L., Cheng, C.-Y., Saw, S.-M., Tai, E.-S., Jonas, J.B., Vithana, E.N., Wong, T.Y., Aung, T., 2012. Identification of four novel variants that influence central corneal thickness in multi-ethnic Asian populations. *Hum. Mol. Genet.* 21, 269–279. doi:10.1093/hmg/ddr269
- Dimasi, D.P., Hewitt, A.W., Straga, T., Pater, J., MacKinnon, J.R., Elder, J.E., Casey, T., Mackey, D.A., Craig, J.E., 2007. Prevalence of CYP1B1 mutations in Australian patients with primary congenital glaucoma. *Clin. Genet.* 72, 255–260. doi:10.1111/j.1399-0004.2007.00864.x

- Duggal, P., Klein, A.P., Lee, K.E., Iyengar, S.K., Klein, R., Bailey-Wilson, J.E., Klein, B.E.K., 2005. A genetic contribution to intraocular pressure: the beaver dam eye study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46, 555–560. doi:10.1167/iovs.04-0729
- Fan, B.J., Wang, D.Y., Lam, D.S.C., Pang, C.P., 2006. Gene mapping for primary open angle glaucoma. *Clin. Biochem.* 39, 249–258. doi:10.1016/j.clinbiochem.2005.11.001
- Fan, B.J., Wang, D.Y., Pasquale, L.R., Haines, J.L., Wiggs, J.L., 2011. Genetic variants associated with optic nerve vertical cup-to-disc ratio are risk factors for primary open angle glaucoma in a US Caucasian population. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* doi:10.1167/iovs.10-6339
- Fan, B.J., Wiggs, J.L., 2010. Glaucoma: genes, phenotypes, and new directions for therapy. *J. Clin. Invest.* 120, 3064–3072. doi:10.1172/JCI43085
- Fernandes, K.A., Harder, J.M., Williams, P.A., Rausch, R.L., Kiernan, A.E., Nair, K.S., Anderson, M.G., John, S.W.M., Howell, G.R., Libby, R.T., 2015. Using genetic mouse models to gain insight into glaucoma: Past results and future possibilities. *Exp. Eye Res.* 141, 42–56. doi:10.1016/j.exer.2015.06.019
- Fingert, J.H., Héon, E., Liebmann, J.M., Yamamoto, T., Craig, J.E., Rait, J., Kawase, K., Hoh, S.T., Buys, Y.M., Dickinson, J., Hockey, R.R., Williams-Lyn, D., Trope, G., Kitazawa, Y., Ritch, R., Mackey, D.A., Alward, W.L., Sheffield, V.C., Stone, E.M., 1999. Analysis of myocilin mutations in 1703 glaucoma patients from five different populations. *Hum. Mol. Genet.* 8, 899–905.
- Fingert, J.H., Robin, A.L., Stone, J.L., Roos, B.R., Davis, L.K., Scheetz, T.E., Bennett, S.R., Wassink, T.H., Kwon, Y.H., Alward, W.L.M., Mullins, R.F., Sheffield, V.C., Stone, E.M., 2011. Copy number variations on chromosome 12q14 in patients with normal tension glaucoma. *Hum. Mol. Genet.* 20, 2482–2494. doi:10.1093/hmg/ddr123
- Flammer, J., Orgül, S., Costa, V.P., Orzalesi, N., Krieglstein, G.K., Serra, L.M., Renard, J.-P., Stefánsson, E., 2002. The impact of ocular blood flow in glaucoma. *Prog. Retin. Eye Res.* 21, 359–393.
- Foster, P.J., Buhrmann, R., Quigley, H.A., Johnson, G.J., 2002. The definition and classification of glaucoma in prevalence surveys. *Br. J. Ophthalmol.* 86, 238–242. doi:10.1136/bjo.86.2.238
- Fuchshofer, R., Tamm, E.R., 2009a. Modulation of extracellular matrix turnover in the trabecular meshwork. *Exp. Eye Res.* 88, 683–688.
- Fuchshofer, R., Tamm, E.R., 2009b. Modulation of extracellular matrix turnover in the trabecular meshwork. *Exp. Eye Res.* 88, 683–688.
- Gao, S., Jakobs, T.C., 2016. Mice Homozygous for a Deletion in the Glaucoma Susceptibility Locus INK4 Show Increased Vulnerability of Retinal Ganglion Cells to Elevated Intraocular Pressure. *Am. J. Pathol.* doi:10.1016/j.ajpath.2015.11.026
- García-Cardena, G., Martasek, P., Masters, B.S., Skidd, P.M., Couet, J., Li, S., Lisanti, M.P., Sessa, W.C., 1997. Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the nos caveolin binding domain in vivo. *J. Biol. Chem.* 272, 25437–25440.
- Gauthier, A.C., Liu, J., 2016. Neurodegeneration and Neuroprotection in Glaucoma. *Yale J. Biol. Med.* 89, 73–79.
- Gharahkhani, P., Burdon, K.P., Fogarty, R., Sharma, S., Hewitt, A.W., Martin, S., Law, M.H., Cremin, K., Bailey, J.N.C., Loomis, S.J., Pasquale, L.R., Haines, J.L., Hauser, M.A., Viswanathan, A.C., McGuffin, P., Topouzis, F., Foster, P.J., Graham, S.L., Casson, R.J., Chohade, M., White, A.J., Zhou, T., Souzeau, E., Landers, J., Fitzgerald, J.T., Klebe, S., Ruddle, J.B., Goldberg, I., Healey, P.R., Wellcome Trust Case Control Consortium 2, NEIGHBORHOOD Consortium, Mills, R.A., Wang, J.J., Montgomery, G.W., Martin, N.G., Radford-Smith, G., Whiteman, D.C., Brown, M.A., Wiggs, J.L., Mackey, D.A., Mitchell, P., MacGregor, S., Craig, J.E., 2014. Common variants near ABCA1, AFAP1 and GMDS confer risk of primary open-angle glaucoma. *Nat. Genet.* 46, 1120–1125. doi:10.1038/ng.3079
- Greene, L.A., Liu, D.X., Troy, C.M., Biswas, S.C., 2007. Cell cycle molecules define a pathway required for neuron death in development and disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1772, 392–401. doi:10.1016/j.bbadis.2006.12.003
- Harada, C., Harada, T., Quah, H.-M.A., Namekata, K., Yoshida, K., Ohno, S., Tanaka, K., Parada, L.F., 2005. Role of neurotrophin-4/5 in neural cell death during retinal development and

- ischemic retinal injury in vivo. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46, 669–673. doi:10.1167/iovs.04-0826
- Helgadóttir, A., Thorleifsson, G., Magnusson, K.P., Grétarsdóttir, S., Steinthorsdóttir, V., Manolescu, A., Jones, G.T., Rinkel, G.J.E., Blankensteijn, J.D., Ronkainen, A., Jääskeläinen, J.E., Kyo, Y., Lenk, G.M., Sakalihasan, N., Kostulas, K., Gottsäter, A., Flex, A., Stefansson, H., Hansen, T., Andersen, G., Weinsheimer, S., Borch-Johnsen, K., Jorgensen, T., Shah, S.H., Quyyumi, A.A., Granger, C.B., Reilly, M.P., Austin, H., Levey, A.I., Vaccarino, V., Palsdóttir, E., Walters, G.B., Jonsdóttir, T., Snorraddóttir, S., Magnúsdóttir, D., Gudmundsson, G., Ferrell, R.E., Sveinbjörnsdóttir, S., Hernesniemi, J., Niemelä, M., Limet, R., Andersen, K., Sigurdsson, G., Benediktsson, R., Verhoeven, E.L.G., Teijink, J.A.W., Grobbee, D.E., Rader, D.J., Collier, D.A., Pedersen, O., Pola, R., Hillert, J., Lindblad, B., Valdimarsson, E.M., Magnadóttir, H.B., Wijmenga, C., Tromp, G., Baas, A.F., Ruigrok, Y.M., van Rij, A.M., Kuivaniemi, H., Powell, J.T., Matthiasson, S.E., Gulcher, J.R., Thorgeirsson, G., Kong, A., Thorsteinsdóttir, U., Stefansson, K., 2008. The same sequence variant on 9p21 associates with myocardial infarction, abdominal aortic aneurysm and intracranial aneurysm. *Nat. Genet.* 40, 217–224. doi:10.1038/ng.72
- Hysi, P.G., Cheng, C.-Y., Springelkamp, H., Macgregor, S., Bailey, J.N.C., Wojciechowski, R., Vitart, V., Nag, A., Hewitt, A.W., Höhn, R., Venturini, C., Mirshahi, A., Ramdas, W.D., Thorleifsson, G., Vithana, E., Khor, C.-C., Stefansson, A.B., Liao, J., Haines, J.L., Amin, N., Wang, Y.X., Wild, P.S., Ozel, A.B., Li, J.Z., Fleck, B.W., Zeller, T., Staffieri, S.E., Teo, Y.-Y., Cuellar-Partida, G., Luo, X., Allingham, R.R., Richards, J.E., Senft, A., Karssen, L.C., Zheng, Y., Bellenguez, C., Xu, L., Iglesias, A.I., Wilson, J.F., Kang, J.H., van Leeuwen, E.M., Jonsson, V., Thorsteinsdóttir, U., Despret, D.D.G., Ennis, S., Moroi, S.E., Martin, N.G., Jansonius, N.M., Yazar, S., Tai, E.-S., Amouyel, P., Kirwan, J., van Koolwijk, L.M.E., Hauser, M.A., Jonasson, F., Leo, P., Loomis, S.J., Fogarty, R., Rivadeneira, F., Kearns, L., Lackner, K.J., de Jong, P.T.V.M., Simpson, C.L., Pennell, C.E., Oostra, B.A., Uitterlinden, A.G., Saw, S.-M., Lotery, A.J., Bailey-Wilson, J.E., Hofman, A., Vingerling, J.R., Maubaret, C., Pfeiffer, N., Wolfs, R.C.W., Lemij, H.G., Young, T.L., Pasquale, L.R., Delcourt, C., Spector, T.D., Klaver, C.C.W., Small, K.S., Burdon, K.P., Stefansson, K., Wong, T.-Y., BMES GWAS Group, NEIGHBORHOOD Consortium, Wellcome Trust Case Control Consortium 2, Viswanathan, A., Mackey, D.A., Craig, J.E., Wiggs, J.L., van Duijn, C.M., Hammond, C.J., Aung, T., 2014. Genome-wide analysis of multi-ancestry cohorts identifies new loci influencing intraocular pressure and susceptibility to glaucoma. *Nat. Genet.* 46, 1126–1130. doi:10.1038/ng.3087
- Iglesias, A.I., Springelkamp, H., van der Linde, H., Severijnen, L.-A., Amin, N., Oostra, B., Kockx, C.E.M., van den Hout, M.C.G.N., van Ijcken, W.F.J., Hofman, A., Uitterlinden, A.G., Verdijk, R.M., Klaver, C.C.W., Willemsen, R., van Duijn, C.M., 2014. Exome sequencing and functional analyses suggest that SIX6 is a gene involved in an altered proliferation-differentiation balance early in life and optic nerve degeneration at old age. *Hum. Mol. Genet.* 23, 1320–1332. doi:10.1093/hmg/ddt522
- Janssen, S.F., Gorgels, T.G.M.F., Ramdas, W.D., Klaver, C.C.W., van Duijn, C.M., Jansonius, N.M., Bergen, A.A.B., 2013. The vast complexity of primary open angle glaucoma: Disease genes, risks, molecular mechanisms and pathobiology. *Prog. Retin. Eye Res.* 37, 31–67. doi:10.1016/j.preteyeres.2013.09.001
- Johnson, M., 2006. What controls aqueous humour outflow resistance? *Exp. Eye Res.* 82, 545–557. doi:10.1016/j.exer.2005.10.011
- Ju, H., Zou, R., Venema, V.J., Venema, R.C., 1997. Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity. *J. Biol. Chem.* 272, 18522–18525.
- Kapetanakis, V.V., Chan, M.P.Y., Foster, P.J., Cook, D.G., Owen, C.G., Rudnicka, A.R., 2015. Global variations and time trends in the prevalence of primary open angle glaucoma (POAG): a systematic review and meta-analysis. *Br. J. Ophthalmol.* *bjophthalmol-2015-307223*. doi:10.1136/bjophthalmol-2015-307223
- Khor, C.C., Ramdas, W.D., Vithana, E.N., Cornes, B.K., Sim, X., Tay, W.-T., Saw, S.-M., Zheng, Y., Lavanya, R., Wu, R., Wang, J.J., Mitchell, P., Uitterlinden, A.G., Rivadeneira, F., Teo, Y.-Y., Chia, K.-S., Seielstad, M., Hibberd, M., Vingerling, J.R., Klaver, C.C.W., Jansonius, N.M.,

- Tai, E.-S., Wong, T.-Y., van Duijn, C.M., Aung, T., 2011. Genome-wide association studies in Asians confirm the involvement of ATOH7 and TGFBR3, and further identify CARD10 as a novel locus influencing optic disc area. *Hum. Mol. Genet.* 20, 1864–1872. doi:10.1093/hmg/ddr060
- Kim, Y.K., Choi, H.J., Jeoung, J.W., Park, K.H., Kim, D.M., 2014. Five-year incidence of primary open-angle glaucoma and rate of progression in health center-based Korean population: the Gangnam Eye Study. *PLoS One* 9, e114058. doi:10.1371/journal.pone.0114058
- Klein, B.E.K., Klein, R., Lee, K.E., 2004. Heritability of risk factors for primary open-angle glaucoma: the Beaver Dam Eye Study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45, 59–62.
- Klöcker, N., Kermer, P., Weishaupt, J.H., Labes, M., Ankerhold, R., Bähr, M., 2000. Brain-Derived Neurotrophic Factor-Mediated Neuroprotection of Adult Rat Retinal Ganglion Cells In Vivo Does Not Exclusively Depend on Phosphatidylinositol-3'-Kinase/Protein Kinase B Signaling. *J. Neurosci.* 20, 6962–6967.
- Ko, M.-L., Peng, P.-H., Ma, M.-C., Ritch, R., Chen, C.-F., 2005. Dynamic changes in reactive oxygen species and antioxidant levels in retinas in experimental glaucoma. *Free Radic. Biol. Med.* 39, 365–373. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2005.03.025
- Kroese, M., Burton, H., 2003. Primary open angle glaucoma. The need for a consensus case definition. *J. Epidemiol. Community Health* 57, 752–754. doi:10.1136/jech.57.9.752
- Kuehn, M.H., Wang, K., Roos, B., Stone, E.M., Kwon, Y.H., Alward, W.L.M., Mullins, R.F., Fingert, J.H., 2011. Chromosome 7q31 POAG locus: ocular expression of caveolins and lack of association with POAG in a US cohort. *Mol. Vis.* 17, 430–435.
- Kumar, S., Malik, M.A., Goswami, S., Sihota, R., Kaur, J., 2016. Candidate genes involved in the susceptibility of primary open angle glaucoma. *Gene* 577, 119–131. doi:10.1016/j.gene.2015.11.032
- Kwon, Y.H., Fingert, J.H., Kuehn, M.H., Alward, W.L.M., 2009. Primary Open-Angle Glaucoma. *N. Engl. J. Med.* 360, 1113–1124. doi:10.1056/NEJMra0804630
- Le, A., Mukesh, B.N., McCarty, C.A., Taylor, H.R., 2003. Risk factors associated with the incidence of open-angle glaucoma: the visual impairment project. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 3783–3789.
- Leske, M.C., 2007. Open-angle glaucoma -- an epidemiologic overview. *Ophthalmic Epidemiol.* 14, 166–172. doi:10.1080/09286580701501931
- Leske, M.C., 1983. The epidemiology of open-angle glaucoma: a review. *Am. J. Epidemiol.* 118, 166–191.
- Leske, M.C., Connell, A.M., Schachat, A.P., Hyman, L., 1994. The Barbados Eye Study. Prevalence of open angle glaucoma. *Arch. Ophthalmol.* 112, 821–829.
- Leske, M.C., Wu, S.-Y., Hennis, A., Honkanen, R., Nemesure, B., BESs Study Group, 2008. Risk factors for incident open-angle glaucoma: the Barbados Eye Studies. *Ophthalmology* 115, 85–93. doi:10.1016/j.ophtha.2007.03.017
- Leske, M.C., Wu, S.Y., Honkanen, R., Nemesure, B., Schachat, A., Hyman, L., Hennis, A., Barbados Eye Studies Group, 2007. Nine-year incidence of open-angle glaucoma in the Barbados Eye Studies. *Ophthalmology* 114, 1058–1064. doi:10.1016/j.ophtha.2006.08.051
- Li, N., Zhou, Y., Du, L., Wei, M., Chen, X., 2011. Overview of Cytochrome P450 1B1 gene mutations in patients with primary congenital glaucoma. *Exp. Eye Res.* 93, 572–579. doi:10.1016/j.exer.2011.07.009
- Li, Z., Allingham, R.R., Nakano, M., Jia, L., Chen, Y., Ikeda, Y., Mani, B., Chen, L.-J., Kee, C., Garway-Heath, D.F., Sriprya, S., Fuse, N., Abu-Amero, K.K., Huang, C., Namburi, P., Burdon, K., Perera, S.A., Gharahkhani, P., Lin, Y., Ueno, M., Ozaki, M., Mizoguchi, T., Krishnadas, S.R., Osman, E.A., Lee, M.C., Chan, A.S.Y., Tajudin, L.-S.A., Do, T., Goncalves, A., Reynier, P., Zhang, H., Bourne, R., Goh, D., Broadway, D., Husain, R., Negi, A.K., Su, D.H., Ho, C.-L., Blanco, A.A., Leung, C.K.S., Wong, T.T., Yakub, A., Liu, Y., Nongpiur, M.E., Han, J.C., Hon, D.N., Shantha, B., Zhao, B., Sang, J., Zhang, N., Sato, R., Yoshii, K., Panda-Jonas, S., Koch, A.E.A., Herndon, L.W., Moroi, S.E., Challa, P., Foo, J.N., Bei, J.-X., Zeng, Y.-X., Simmons, C.P., Chau, T.N.B., Sharmila, P.F., Chew, M., Lim, B., Tam, P.O.S., Chua, E., Ng, X.Y., Yong, V.H.K., Chong, Y.F., Meah, W.Y., Vijayan, S., Seongsoo, S., Xu, W., Teo, Y.Y., Bailey, J.N.C., Kang, J.H., Haines, J.L., Cheng, C.Y., Saw, S.-M., Tai, E.-S.,

- Consortium, I.-G., Consortium, N., Richards, J.E., Ritch, R., Gaasterland, D.E., Pasquale, L.R., Liu, J., Jonas, J.B., Milea, D., George, R., Al-Obeidan, S.A., Mori, K., Macgregor, S., Hewitt, A.W., Girkin, C.A., Zhang, M., Sundaresan, P., Vijaya, L., Mackey, D.A., Wong, T.Y., Craig, J.E., Sun, X., Kinoshita, S., Wiggs, J.L., Khor, C.-C., Yang, Z., Pang, C.P., Wang, N., Hauser, M.A., Tashiro, K., Aung, T., Vithana, E.N., 2015. A common variant near TGFBR3 is associated with primary open angle glaucoma. *Hum. Mol. Genet.* 24, 3880–3892. doi:10.1093/hmg/ddv128
- Liu, Y., Garrett, M.E., Yaspan, B.L., Bailey, J.C., Loomis, S.J., Brilliant, M., Budenz, D.L., Christen, W.G., Fingert, J.H., Gaasterland, D., Gaasterland, T., Kang, J.H., Lee, R.K., Lichter, P., Moroi, S.E., Realini, A., Richards, J.E., Schuman, J.S., Scott, W.K., Singh, K., Sit, A.J., Vollrath, D., Weinreb, R., Wollstein, G., Zack, D.J., Zhang, K., Pericak-Vance, M.A., Haines, J.L., Pasquale, L.R., Wiggs, J.L., Allingham, R.R., Ashley-Koch, A.E., Hauser, M.A., 2014. DNA Copy Number Variants of Known Glaucoma Genes in Relation to Primary Open-Angle Glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 55, 8251–8258. doi:10.1167/iovs.14-15712
- Liu, Y., Hauser, M.A., Akafo, S.K., Qin, X., Miura, S., Gibson, J.R., Wheeler, J., Gaasterland, D., Challa, P., Herndon, L., Ritch, R., Moroi, S.E., Girkin, C.A., Pasquale, L.R., Budenz, D.L., Wiggs, J.L., Richards, J.E., Ashley-Koch, A.E., Allingham, R.R., 2013. Investigation of Known Genetic Risk Factors for Primary Open Angle Glaucoma in Two Populations of African Ancestry. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* doi:10.1167/iovs.13-12779
- Liu, Y., Liu, W., Crooks, K., Schmidt, S., Allingham, R.R., Hauser, M.A., 2010. No evidence of association of heterozygous NTF4 mutations in patients with primary open-angle glaucoma. *Am. J. Hum. Genet.* 86, 498–499; author reply 500. doi:10.1016/j.ajhg.2009.11.018
- Loomis, S.J., Kang, J.H., Weinreb, R.N., Yaspan, B.L., Cooke Bailey, J.N., Gaasterland, D., Gaasterland, T., Lee, R.K., Lichter, P.R., Budenz, D.L., Liu, Y., Realini, T., Friedman, D.S., McCarty, C.A., Moroi, S.E., Olson, L., Schuman, J.S., Singh, K., Vollrath, D., Wollstein, G., Zack, D.J., Brilliant, M., Sit, A.J., Christen, W.G., Fingert, J., Kraft, P., Zhang, K., Allingham, R.R., Pericak-Vance, M.A., Richards, J.E., Hauser, M.A., Haines, J.L., Pasquale, L.R., Wiggs, J.L., 2014. Association of CAV1/CAV2 genomic variants with primary open-angle glaucoma overall and by gender and pattern of visual field loss. *Ophthalmology* 121, 508–516. doi:10.1016/j.ophtha.2013.09.012
- López-Garrido, M.-P., Sánchez-Sánchez, F., López-Martínez, F., Aroca-Aguilar, J.-D., Blanco-Marchite, C., Coca-Prados, M., Escribano, J., 2006. Heterozygous CYP1B1 gene mutations in Spanish patients with primary open-angle glaucoma. *Mol. Vis.* 12, 748–755.
- Mabuchi, F., Tang, S., Ando, D., Yamakita, M., Wang, J., Kashiwagi, K., Yamagata, Z., Iijima, H., Tsukahara, S., 2005. The apolipoprotein E gene polymorphism is associated with open angle glaucoma in the Japanese population. *Mol. Vis.* 11, 609–612.
- Mackay, D.S., Bennett, T.M., Shiels, A., 2015. Exome Sequencing Identifies a Missense Variant in EFEMP1 Co-Segregating in a Family with Autosomal Dominant Primary Open-Angle Glaucoma. *PLoS ONE* 10, e0132529. doi:10.1371/journal.pone.0132529
- Mason, R.P., Kosoko, O., Wilson, M.R., Martone, J.F., Cowan, C.L., Gear, J.C., Ross-Degnan, D., 1989. National survey of the prevalence and risk factors of glaucoma in St. Lucia, West Indies. Part I. Prevalence findings. *Ophthalmology* 96, 1363–1368.
- Melki, R., Colomb, E., Lefort, N., Brézina, A.P., Garchon, H.-J., 2004. CYP1B1 mutations in French patients with early-onset primary open-angle glaucoma. *J. Med. Genet.* 41, 647–651. doi:10.1136/jmg.2004.020024
- Micheal, S., Ayub, H., Zafar, S.N., Bakker, B., Ali, M., Akhtar, F., Islam, F., Khan, M.I., Qamar, R., den Hollander, A.I., 2015. Identification of novel CYP1B1 gene mutations in patients with primary congenital and primary open-angle glaucoma. *Clin. Experiment. Ophthalmol.* 43, 31–39. doi:10.1111/ceo.12369
- Monemi, S., Spaeth, G., DaSilva, A., Popinchalk, S., Ilitchev, E., Liebmann, J., Ritch, R., Héon, E., Crick, R.P., Child, A., Sarfarazi, M., 2005. Identification of a novel adult-onset primary open-angle glaucoma (POAG) gene on 5q22.1. *Hum. Mol. Genet.* 14, 725–733. doi:10.1093/hmg/ddi068

- Mookherjee, S., Acharya, M., Banerjee, D., Bhattacharjee, A., Ray, K., 2012. Molecular Basis for Involvement of CYP1B1 in MYOC Upregulation and Its Potential Implication in Glaucoma Pathogenesis. *PLoS One* 7, e45077. doi:10.1371/journal.pone.0045077
- Mozaffarieh, M., Grieshaber, M.C., Flammer, J., 2008. Oxygen and blood flow: players in the pathogenesis of glaucoma. *Mol. Vis.* 14, 224–233.
- Mukesh, B.N., McCarty, C.A., Rait, J.L., Taylor, H.R., 2002. Five-year incidence of open-angle glaucoma: the visual impairment project. *Ophthalmology* 109, 1047–1051.
- Murdoch, I.E., Cousens, S.N., Babalola, O.E., Yang, Y.F., Abiose, A., Jones, B.R., 2001. Glaucoma prevalence may not be uniformly high in all “black” populations. *Afr. J. Med. Med. Sci.* 30, 337–339.
- Nakano, M., Ikeda, Y., Taniguchi, T., Yagi, T., Fuwa, M., Omi, N., Tokuda, Y., Tanaka, M., Yoshii, K., Kageyama, M., Naruse, S., Matsuda, A., Mori, K., Kinoshita, S., Tashiro, K., 2009a. Three susceptible loci associated with primary open-angle glaucoma identified by genome-wide association study in a Japanese population. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 12838–12842. doi:10.1073/pnas.0906397106
- Nakano, M., Ikeda, Y., Taniguchi, T., Yagi, T., Fuwa, M., Omi, N., Tokuda, Y., Tanaka, M., Yoshii, K., Kageyama, M., Naruse, S., Matsuda, A., Mori, K., Kinoshita, S., Tashiro, K., 2009b. Three susceptible loci associated with primary open-angle glaucoma identified by genome-wide association study in a Japanese population. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 12838–12842. doi:10.1073/pnas.0906397106
- Nakazawa, T., Nakazawa, C., Matsubara, A., Noda, K., Hisatomi, T., She, H., Michaud, N., Hafezi-Moghadam, A., Miller, J.W., Benowitz, L.I., 2006. Tumor necrosis factor- α mediates oligodendrocyte death and delayed retinal ganglion cell loss in a mouse model of glaucoma. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 12633–12641. doi:10.1523/JNEUROSCI.2801-06.2006
- Nemesure, B., Honkanen, R., Hennis, A., Wu, S.Y., Leske, M.C., Barbados Eye Studies Group, 2007. Incident open-angle glaucoma and intraocular pressure. *Ophthalmology* 114, 1810–1815. doi:10.1016/j.ophtha.2007.04.003
- Nemesure, B., Jiao, X., He, Q., Leske, M.C., Wu, S.-Y., Hennis, A., Mendell, N., Redman, J., Garchon, H.-J., Agarwala, R., Schäffer, A.A., Hejtmancik, F., Barbados Family Study Group, 2003. A genome-wide scan for primary open-angle glaucoma (POAG): the Barbados Family Study of Open-Angle Glaucoma. *Hum. Genet.* 112, 600–609. doi:10.1007/s00439-003-0910-z
- Netland, P.A., Wiggs, J.L., Dreyer, E.B., 1993. Inheritance of glaucoma and genetic counseling of glaucoma patients. *Int. Ophthalmol. Clin.* 33, 101–120.
- Nielsen, D.M., Ehm, M.G., Weir, B.S., 1998. Detecting marker-disease association by testing for Hardy-Weinberg disequilibrium at a marker locus. *Am. J. Hum. Genet.* 63, 1531–1540. doi:10.1086/302114
- Ntim-Amponsah, C.T., Amoaku, W.M.K., Ofosu-Amaah, S., Ewusi, R.K., Idirisuriya-Khair, R., Nyatepe-Coo, E., Adu-Darko, M., 2004. Prevalence of glaucoma in an African population. *Eye* 18, 491–497. doi:10.1038/sj.eye.6700674
- Oh, D.-J., Kang, M.H., Ooi, Y.H., Choi, K.R., Sage, E.H., Rhee, D.J., 2013. Overexpression of SPARC in human trabecular meshwork increases intraocular pressure and alters extracellular matrix. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 54, 3309–3319. doi:10.1167/iovs.12-11362
- Ohlemacher, S.K., Sridhar, A., Xiao, Y., Hochstetler, A.E., Sarfarazi, M., Cummins, T.R., Meyer, J.S., 2016. Stepwise Differentiation of Retinal Ganglion Cells from Human Pluripotent Stem Cells Enables Analysis of Glaucomatous Neurodegeneration. *STEM CELLS* n/a-n/a. doi:10.1002/stem.2356
- Osman, W., Low, S.-K., Takahashi, A., Kubo, M., Nakamura, Y., 2012. A genome-wide association study in the Japanese population confirms 9p21 and 14q23 as susceptibility loci for primary open angle glaucoma. *Hum. Mol. Genet.* 21, 2836–2842. doi:10.1093/hmg/dds103
- Overby, D.R., Stamer, W.D., Johnson, M., 2009. The Changing Paradigm of Outflow Resistance Generation: Towards Synergistic Models of the JCT and Inner Wall Endothelium. *Exp. Eye Res.* 88, 656–670. doi:10.1016/j.exer.2008.11.033
- P Yu-Wai-Man, J.D.S., 2009. OPA1 increases the risk of normal but not high tension glaucoma. *J. Med. Genet.* 47, 120–5. doi:10.1136/jmg.2009.067512

- Palioura, S., G., D., 2013. Neuroprotection in Glaucoma, in: Rumelt, S. (Ed.), *Glaucoma - Basic and Clinical Aspects*. InTech.
- Pang, C.P., Fan, B.J., Canlas, O., Wang, D.Y., Dubois, S., Tam, P.O.S., Lam, D.S.C., Raymond, V., Ritch, R., 2006. A genome-wide scan maps a novel juvenile-onset primary open angle glaucoma locus to chromosome 5q. *Mol. Vis.* 12, 85–92.
- Pasquale, L.R., Loomis, S.J., Kang, J.H., Yaspan, B.L., Abdrabou, W., Budenz, D.L., Chen, T.C., DelBono, E., Friedman, D.S., Gaasterland, D., Gaasterland, T., Grosskreutz, C.L., Lee, R.K., Lichter, P.R., Liu, Y., McCarty, C.A., Moroi, S.E., Olson, L.M., Realini, T., Rhee, D.J., Schuman, J.S., Singh, K., Vollrath, D., Wollstein, G., Zack, D.J., Allingham, R.R., Pericak-Vance, M.A., Weinreb, R.N., Zhang, K., Hauser, M.A., Richards, J.E., Haines, J.L., Wiggs, J.L., 2013. CDKN2B-AS1 Genotype–Glaucoma Feature Correlations in Primary Open-Angle Glaucoma Patients From the United States. *Am. J. Ophthalmol.* 155, 342–353.e5. doi:10.1016/j.ajo.2012.07.023
- Pasutto, F., Chavarria-Soley, G., Mardin, C.Y., Michels-Rautenstrauss, K., Ingelman-Sundberg, M., Fernández-Martínez, L., Weber, B.H.F., Rautenstrauss, B., Reis, A., 2010. Heterozygous loss-of-function variants in CYP1B1 predispose to primary open-angle glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 249–254. doi:10.1167/iovs.09-3880
- Pasutto, F., Matsumoto, T., Mardin, C.Y., Sticht, H., Brandstatter, J.H., Michels-Rautenstrauss, K., Weisschuh, N., Gramer, E., Ramdas, W.D., van Koolwijk, L.M.E., Klaver, C.C.W., Vingerling, J.R., Weber, B.H.F., Kruse, F.E., Rautenstrauss, B., Barde, Y.-A., Reis, A., 2009. Heterozygous NTF4 Mutations Impairing Neurotrophin-4 Signaling in Patients with Primary Open-Angle Glaucoma. *Am. J. Hum. Genet.* 85, 447–456. doi:10.1016/j.ajhg.2009.08.016
- Pogue, A.I., Cui, J.G., Li, Y.Y., Zhao, Y., Culicchia, F., Lukiw, W.J., 2010. Micro RNA-125b (miRNA-125b) function in astrogliosis and glial cell proliferation. *Neurosci. Lett.* 476, 18–22. doi:10.1016/j.neulet.2010.03.054
- Polansky, J.R., Fauss, D.J., Chen, P., Chen, H., Lütjen-Drecoll, E., Johnson, D., Kurtz, R.M., Ma, Z.D., Bloom, E., Nguyen, T.D., 1997. Cellular pharmacology and molecular biology of the trabecular meshwork inducible glucocorticoid response gene product. *Ophthalmol. J. Int. Ophthalmol. Int. J. Ophthalmol. Z. Für Augenheilkd.* 211, 126–139.
- Porter, L.F., Urquhart, J.E., O'Donoghue, E., Spencer, A.F., Wade, E.M., Manson, F.D.C., Black, G.C.M., 2011. Identification of a novel locus for autosomal dominant primary open angle glaucoma on 4q35.1-q35.2. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52, 7859–7865. doi:10.1167/iovs.10-6581
- Quigley, H.A., 2011. Glaucoma. *Lancet* 377, 1367–1377. doi:10.1016/S0140-6736(10)61423-7
- Quigley, H.A., 1999. Neuronal death in glaucoma. *Prog. Retin. Eye Res.* 18, 39–57.
- Quigley, H.A., Broman, A.T., 2006. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br. J. Ophthalmol.* 90, 262–267. doi:10.1136/bjo.2005.081224
- Quigley, H.A., Nickells, R.W., Kerrigan, L.A., Pease, M.E., Thibault, D.J., Zack, D.J., 1995. Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma and after axotomy occurs by apoptosis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 36, 774–786.
- Quigley, H.A., West, S.K., Rodriguez, J., Munoz, B., Klein, R., Snyder, R., 2001. The prevalence of glaucoma in a population-based study of Hispanic subjects: Proyecto VER. *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill* 1960 119, 1819–1826.
- R: a language and environment for statistical computing [WWW Document]. GBIF.ORG. URL <http://www.gbif.org/resource/81287> (accessed 7.3.15)
- Ramdas, W.D., van Koolwijk, L.M.E., Cree, A.J., Janssens, A.C.J.W., Amin, N., de Jong, P.T.V.M., Wolfs, R.C.W., Gibson, J., Kirwan, J.F., Hofman, A., Rivadeneira, F., Oostra, B.A., Uitterlinden, A.G., Ennis, S., Lotery, A.J., Lemij, H.G., Klaver, C.C.W., Vingerling, J.R., Jansonius, N.M., van Duijn, C.M., 2011a. Clinical implications of old and new genes for open-angle glaucoma. *Ophthalmology* 118, 2389–2397. doi:10.1016/j.ophtha.2011.05.040
- Ramdas, W.D., van Koolwijk, L.M.E., Ikram, M.K., Jansonius, N.M., de Jong, P.T.V.M., Bergen, A.A.B., Isaacs, A., Amin, N., Aulchenko, Y.S., Wolfs, R.C.W., Hofman, A., Rivadeneira, F., Oostra, B.A., Uitterlinden, A.G., Hysi, P., Hammond, C.J., Lemij, H.G., Vingerling, J.R., Klaver, C.C.W., van Duijn, C.M., 2010. A Genome-Wide Association Study of Optic Disc Parameters. *PLoS Genet.* 6. doi:10.1371/journal.pgen.1000978

- Ramdas, W.D., van Koolwijk, L.M.E., Lemij, H.G., Pasutto, F., Cree, A.J., Thorleifsson, G., Janssen, S.F., Jacoline, T.B., Amin, N., Rivadeneira, F., Wolfs, R.C.W., Walters, G.B., Jonasson, F., Weisschuh, N., Mardin, C.Y., Gibson, J., Zegers, R.H.C., Hofman, A., de Jong, P.T.V.M., Uitterlinden, A.G., Oostra, B.A., Thorsteinsdottir, U., Gramer, E., Welgen-Lüssen, U.C., Kirwan, J.F., Bergen, A.A.B., Reis, A., Stefansson, K., Lotery, A.J., Vingerling, J.R., Jansonius, N.M., Klaver, C.C.W., van Duijn, C.M., 2011b. Common genetic variants associated with open-angle glaucoma. *Hum. Mol. Genet.* 20, 2464–2471. doi:10.1093/hmg/ddr120
- Ramdas, W.D., Wolfs, R.C.W., Hofman, A., de Jong, P.T.V.M., Vingerling, J.R., Jansonius, N.M., 2011. Ocular perfusion pressure and the incidence of glaucoma: real effect or artifact? The Rotterdam Study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52, 6875–6881. doi:10.1167/iovs.11-7376
- Rao, K.N., Kaur, I., Parikh, R.S., Mandal, A.K., Chandrasekhar, G., Thomas, R., Chakrabarti, S., 2010. Variations in NTF4, VAV2, and VAV3 genes are not involved with primary open-angle and primary angle-closure glaucomas in an Indian population. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 4937–4941. doi:10.1167/iovs.10-5553
- Raymond, V., 1997. Molecular genetics of the glaucomas: mapping of the first five “GLC” loci. *Am. J. Hum. Genet.* 60, 272–277.
- Resch, Z.T., Fautsch, M.P., 2009. Glaucoma-associated myocilin: a better understanding but much more to learn. *Exp. Eye Res.* 88, 704–712. doi:10.1016/j.exer.2008.08.011
- Resnikoff, S., Pascolini, D., Etya'ale, D., Kocur, I., Pararajasegaram, R., Pokharel, G.P., Mariotti, S.P., 2004. Global data on visual impairment in the year 2002. *Bull. World Health Organ.* 82, 844–851. doi:S0042-96862004001100009
- Rezaie, T., Child, A., Hitchings, R., Brice, G., Miller, L., Coca-Prados, M., Héon, E., Krupin, T., Ritch, R., Kreutzer, D., Crick, R.P., Sarfarazi, M., 2002. Adult-onset primary open-angle glaucoma caused by mutations in optineurin. *Science* 295, 1077–1079. doi:10.1126/science.1066901
- Ritch, R., Darbro, B., Menon, G., Khanna, C.L., Solivan-Timpe, F., Roos, B.R., Sarfarazi, M., Kawase, K., Yamamoto, T., Robin, A.L., Lotery, A.J., Fingert, J.H., 2014. TBK1 gene duplication and normal-tension glaucoma. *JAMA Ophthalmol.* 132, 544–548. doi:10.1001/jamaophthalmol.2014.104
- Robinson, R.C., Radziejewski, C., Spraggon, G., Greenwald, J., Kostura, M.R., Burtnick, L.D., Stuart, D.I., Choe, S., Jones, E.Y., 1999. The structures of the neurotrophin 4 homodimer and the brain-derived neurotrophic factor/neurotrophin 4 heterodimer reveal a common Trk-binding site. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 8, 2589–2597. doi:10.1110/ps.8.12.2589
- Rose, R., Balakrishnan, A., Muthusamy, K., Arumugam, P., Shanmugam, S., Gopalswamy, J., 2011. Myocilin mutations among POAG patients from two populations of Tamil Nadu, South India, a comparative analysis. *Mol. Vis.* 17, 3243–3253.
- Royston, J.P., 1982. An Extension of Shapiro and Wilk's W Test for Normality to Large Samples. *J. R. Stat. Soc. Ser. C Appl. Stat.* 31, 115–124. doi:10.2307/2347973
- Rudnicka, A.R., Mt-Isa, S., Owen, C.G., Cook, D.G., Ashby, D., 2006. Variations in primary open-angle glaucoma prevalence by age, gender, and race: a Bayesian meta-analysis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 4254–4261. doi:10.1167/iovs.06-0299
- Santos, Bibiana Amélia Cusim. Identificação de genes associados ao glaucoma primário de ângulo aberto. Campinas, 2012. 86p. Faculdade de Ciências Médicas Dissertação (mestrado em Clínica Médica) Programa de Pós-Graduação em Ciências Básicas, Universidade Estadual de Campinas 2014.
- Sarfarazi, M., Akarsu, N.A., Hossain, A., Turacli, E.M., Aktan, G.S., Barsoum-Homsy, M., Chevrette, L., Sayli, S.B., 1995. Assignment of a Locus (GLC3A) for Primary Congenital Glaucoma (Buphthalmos) to 2p21 and Evidence for Genetic Heterogeneity. *Genomics* 30, 171–177. doi:10.1006/geno.1995.9888
- Sarfarazi, M., Child, A., Stoilova, D., Brice, G., Desai, T., Trifan, O.C., Poinosawmy, D., Crick, R.P., 1998. Localization of the Fourth Locus (GLC1E) For Adult-Onset Primary Open-Angle Glaucoma to the 10p15-p14 Region. *Am. J. Hum. Genet.* 62, 641–652. doi:10.1086/301767
- Scheetz, T.E., Fingert, J.H., Wang, K., Kuehn, M.H., Knudtson, K.L., Alward, W.L.M., Boldt, H.C., Russell, S.R., Folk, J.C., Casavant, T.L., Braun, T.A., Clark, A.F., Stone, E.M., Sheffield,

- V.C., 2013. A Genome-Wide Association Study for Primary Open Angle Glaucoma and Macular Degeneration Reveals Novel Loci. *PLoS ONE* 8. doi:10.1371/journal.pone.0058657
- Scott, L.J., Mohlke, K.L., Bonnycastle, L.L., Willer, C.J., Li, Y., Duren, W.L., Erdos, M.R., Stringham, H.M., Chines, P.S., Jackson, A.U., Prokunina-Olsson, L., Ding, C.-J., Swift, A.J., Narisu, N., Hu, T., Pruim, R., Xiao, R., Li, X.-Y., Conneely, K.N., Riebow, N.L., Sprau, A.G., Tong, M., White, P.P., Hetrick, K.N., Barnhart, M.W., Bark, C.W., Goldstein, J.L., Watkins, L., Xiang, F., Saramies, J., Buchanan, T.A., Watanabe, R.M., Valle, T.T., Kinnunen, L., Abecasis, G.R., Pugh, E.W., Doheny, K.F., Bergman, R.N., Tuomilehto, J., Collins, F.S., Boehnke, M., 2007. A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. *Science* 316, 1341–1345. doi:10.1126/science.1142382
- Sheffield, V.C., Stone, E.M., Alward, W.L., Drack, A.V., Johnson, A.T., Streb, L.M., Nichols, B.E., 1993. Genetic linkage of familial open angle glaucoma to chromosome 1q21-q31. *Nat. Genet.* 4, 47–50. doi:10.1038/ng0593-47
- Shen, L., Melles, R.B., Metlapally, R., Barcellos, L., Schaefer, C., Risch, N., Herrinton, L.J., Wildsoet, C., Jorgenson, E., 2016. The Association of Refractive Error with Glaucoma in a Multiethnic Population. *Ophthalmology* 123, 92–101. doi:10.1016/j.ophtha.2015.07.002
- Shete, S., Hosking, F.J., Robertson, L.B., Dobbins, S.E., Sanson, M., Malmer, B., Simon, M., Marie, Y., Boisselier, B., Delattre, J.-Y., Hoang-Xuan, K., El Hallani, S., Idbaih, A., Zelenika, D., Andersson, U., Henriksson, R., Bergenheim, A.T., Feychting, M., Lönn, S., Ahlbom, A., Schramm, J., Linnebank, M., Hemminki, K., Kumar, R., Hepworth, S.J., Price, A., Armstrong, G., Liu, Y., Gu, X., Yu, R., Lau, C., Schoemaker, M., Muir, K., Swerdlow, A., Lathrop, M., Bondy, M., Houlston, R.S., 2009. Genome-wide association study identifies five susceptibility loci for glioma. *Nat. Genet.* 41, 899–904. doi:10.1038/ng.407
- Shibuya, E., Meguro, A., Ota, M., Kashiwagi, K., Mabuchi, F., Iijima, H., Kawase, K., Yamamoto, T., Nakamura, M., Negi, A., Sagara, T., Nishida, T., Inatani, M., Tanihara, H., Aihara, M., Araie, M., Fukuchi, T., Abe, H., Higashide, T., Sugiyama, K., Kanamoto, T., Kiuchi, Y., Iwase, A., Ohno, S., Inoko, H., Mizuki, N., 2008. Association of Toll-like receptor 4 gene polymorphisms with normal tension glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49, 4453–4457. doi:10.1167/iovs.07-1575
- Skowronska-Krawczyk, D., Zhao, L., Zhu, J., Weinreb, R.N., Cao, G., Luo, J., Flagg, K., Patel, S., Wen, C., Krupa, M., Luo, H., Ouyang, H., Lin, D., Wang, W., Li, G., Xu, Y., Li, O., Chung, C., Yeh, E., Jafari, M., Ai, M., Zhong, Z., Shi, W., Zheng, L., Krawczyk, M., Chen, D., Shi, C., Zin, C., Zhu, J., Mellon, P.L., Gao, W., Abagyan, R., Zhang, L., Sun, X., Zhong, S., Zhuo, Y., Rosenfeld, M.G., Liu, Y., Zhang, K., 2015. P16INK4a Upregulation Mediated by SIX6 Defines Retinal Ganglion Cell Pathogenesis in Glaucoma. *Mol. Cell* 59, 931–940. doi:10.1016/j.molcel.2015.07.027
- Sluch, V.M., Davis, C.O., Ranganathan, V., Kerr, J.M., Krick, K., Martin, R., Berlinicke, C.A., Marsh-Armstrong, N., Diamond, J.S., Mao, H.-Q., Zack, D.J., 2015. Differentiation of human ESCs to retinal ganglion cells using a CRISPR engineered reporter cell line. *Sci. Rep.* 5, 16595. doi:10.1038/srep16595
- Sommer, A., Tielsch, J.M., Katz, J., Quigley, H.A., Gottsch, J.D., Javitt, J., Singh, K., 1991. Relationship between intraocular pressure and primary open angle glaucoma among white and black Americans. The Baltimore Eye Survey. *Arch. Ophthalmol.* 109, 1090–1095.
- Springelkamp, H., Iglesias, A.I., Cuellar-Partida, G., Amin, N., Burdon, K.P., van Leeuwen, E.M., Gharahkhani, P., Mishra, A., van der Lee, S.J., Hewitt, A.W., Rivadeneira, F., Viswanathan, A.C., Wolfs, R.C.W., Martin, N.G., Ramdas, W.D., van Koolwijk, L.M., Pennell, C.E., Vingerling, J.R., Mountain, J.E., Uitterlinden, A.G., Hofman, A., Mitchell, P., Lemij, H.G., Wang, J.J., Klaver, C.C.W., Mackey, D.A., Craig, J.E., van Duijn, C.M., MacGregor, S., 2015a. ARHGEF12 influences the risk of glaucoma by increasing intraocular pressure. *Hum. Mol. Genet.* doi:10.1093/hmg/ddv027
- Springelkamp, H., Mishra, A., Hysi, P.G., Gharahkhani, P., Höhn, R., Khor, C.-C., Cooke Bailey, J.N., Luo, X., Ramdas, W.D., Vithana, E., Koh, V., Yazar, S., Xu, L., Forward, H., Kearns, L.S., Amin, N., Iglesias, A.I., Sim, K.-S., van Leeuwen, E.M., Demirkan, A., van der Lee, S., Loon, S.-C., Rivadeneira, F., Nag, A., Sanfilippo, P.G., Schillert, A., de Jong, P.T.V.M., Oostra, B.A., Uitterlinden, A.G., Hofman, A., NEIGHBORHOOD Consortium, Zhou, T., Burdon,

- K.P., Spector, T.D., Lackner, K.J., Saw, S.-M., Vingerling, J.R., Teo, Y.-Y., Pasquale, L.R., Wolfs, R.C.W., Lemij, H.G., Tai, E.-S., Jonas, J.B., Cheng, C.-Y., Aung, T., Jansonius, N.M., Klaver, C.C.W., Craig, J.E., Young, T.L., Haines, J.L., MacGregor, S., Mackey, D.A., Pfeiffer, N., Wong, T.-Y., Wiggs, J.L., Hewitt, A.W., van Duijn, C.M., Hammond, C.J., 2015b. Meta-analysis of Genome-Wide Association Studies Identifies Novel Loci Associated With Optic Disc Morphology. *Genet. Epidemiol.* n/a-n/a. doi:10.1002/gepi.21886
- Stoilov, I., Akarsu, A.N., Sarfarazi, M., 1997. Identification of three different truncating mutations in cytochrome P4501B1 (CYP1B1) as the principal cause of primary congenital glaucoma (Buphthalmos) in families linked to the GLC3A locus on chromosome 2p21. *Hum. Mol. Genet.* 6, 641–647.
- Stoilova, D., Child, A., Trifan, O.C., Crick, R.P., Coakes, R.L., Sarfarazi, M., 1996. Localization of a locus (GLC1B) for adult-onset primary open angle glaucoma to the 2cen-q13 region. *Genomics* 36, 142–150. doi:10.1006/geno.1996.0434
- Stone, E.M., Fingert, J.H., Alward, W.L., Nguyen, T.D., Polansky, J.R., Sundén, S.L., Nishimura, D., Clark, A.F., Nystuen, A., Nichols, B.E., Mackey, D.A., Ritch, R., Kalenak, J.W., Craven, E.R., Sheffield, V.C., 1997. Identification of a gene that causes primary open angle glaucoma. *Science* 275, 668–670.
- Stone, E.M., Fingert, J.H., Alward, W.L., Nguyen, T.D., Polansky, J.R., Sundén, S.L., Nishimura, D., Clark, A.F., Nystuen, A., Nichols, B.E., Mackey, D.A., Ritch, R., Kalenak, J.W., Craven, E.R., Sheffield, V.C., 1997. Identification of a gene that causes primary open angle glaucoma. *Science* 275, 668–670.
- Sun, J., Zhou, X., Kang, Y., Yan, L., Sun, X., Sui, H., Qin, D., Yuan, H., 2012. Prevalence and risk factors for primary open-angle glaucoma in a rural northeast China population: a population-based survey in Bin County, Harbin. *Eye Lond. Engl.* 26, 283–291. doi:10.1038/eye.2011.243
- Suri, F., Yazdani, S., Narooie-Nejhad, M., Zargar, S.J., Paylakhi, S.H., Zeinali, S., Pakravan, M., Elahi, E., 2009. Variable expressivity and high penetrance of CYP1B1 mutations associated with primary congenital glaucoma. *Ophthalmology* 116, 2101–2109. doi:10.1016/j.ophtha.2009.04.045
- Suriyapperuma, S.P., Child, A., Desai, T., Brice, G., Kerr, A., Crick, R.P., Sarfarazi, M., 2007. A new locus (GLC1H) for adult-onset primary open-angle glaucoma maps to the 2p15-p16 region. *Arch. Ophthalmol.* 125, 86–92. doi:10.1001/archophth.125.1.86
- Swaminathan, S.S., Oh, D.-J., Kang, M.H., Shepard, A.R., Pang, I.-H., Rhee, D.J., 2014. TGF- β 2-mediated ocular hypertension is attenuated in SPARC-null mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 55, 4084–4097. doi:10.1167/iovs.13-12463
- Tavtigian, S.V., Deffenbaugh, A.M., Yin, L., Judkins, T., Scholl, T., Samollow, P.B., de Silva, D., Zharkikh, A., Thomas, A., 2006. Comprehensive statistical study of 452 BRCA1 missense substitutions with classification of eight recurrent substitutions as neutral. *J. Med. Genet.* 43, 295–305. doi:10.1136/jmg.2005.033878
- Thorleifsson, G., Magnusson, K.P., Sulem, P., Walters, G.B., Gudbjartsson, D.F., Stefansson, H., Jonsson, T., Jonasdottir, A., Jonasdottir, A., Stefansdottir, G., Masson, G., Hardarson, G.A., Petursson, H., Arnarsson, A., Motallebipour, M., Wallerman, O., Wadelius, C., Gulcher, J.R., Thorsteinsdottir, U., Kong, A., Jonasson, F., Stefansson, K., 2007. Common Sequence Variants in the LOXL1 Gene Confer Susceptibility to Exfoliation Glaucoma. *Science* 317, 1397–1400. doi:10.1126/science.1146554
- Thorleifsson, G., Walters, G.B., Hewitt, A.W., Masson, G., Helgason, A., DeWan, A., Sigurdsson, A., Jonasdottir, A., Gudjonsson, S.A., Magnusson, K.P., Stefansson, H., Lam, D.S.C., Tam, P.O.S., Gudmundsdottir, G.J., Southgate, L., Burdon, K.P., Gottfredsdottir, M.S., Aldred, M.A., Mitchell, P., St Clair, D., Collier, D.A., Tang, N., Sveinsson, O., Macgregor, S., Martin, N.G., Cree, A.J., Gibson, J., Macleod, A., Jacob, A., Ennis, S., Young, T.L., Chan, J.C.N., Karwatowski, W.S.S., Hammond, C.J., Thordarson, K., Zhang, M., Wadelius, C., Lotery, A.J., Trembath, R.C., Pang, C.P., Hoh, J., Craig, J.E., Kong, A., Mackey, D.A., Jonasson, F., Thorsteinsdottir, U., Stefansson, K., 2010a. Common variants near CAV1 and CAV2 are associated with primary open-angle glaucoma. *Nat. Genet.* 42, 906–909. doi:10.1038/ng.661
- Thorleifsson, G., Walters, G.B., Hewitt, A.W., Masson, G., Helgason, A., DeWan, A., Sigurdsson, A., Jonasdottir, A., Gudjonsson, S.A., Magnusson, K.P., Stefansson, H., Lam, D.S.C., Tam,

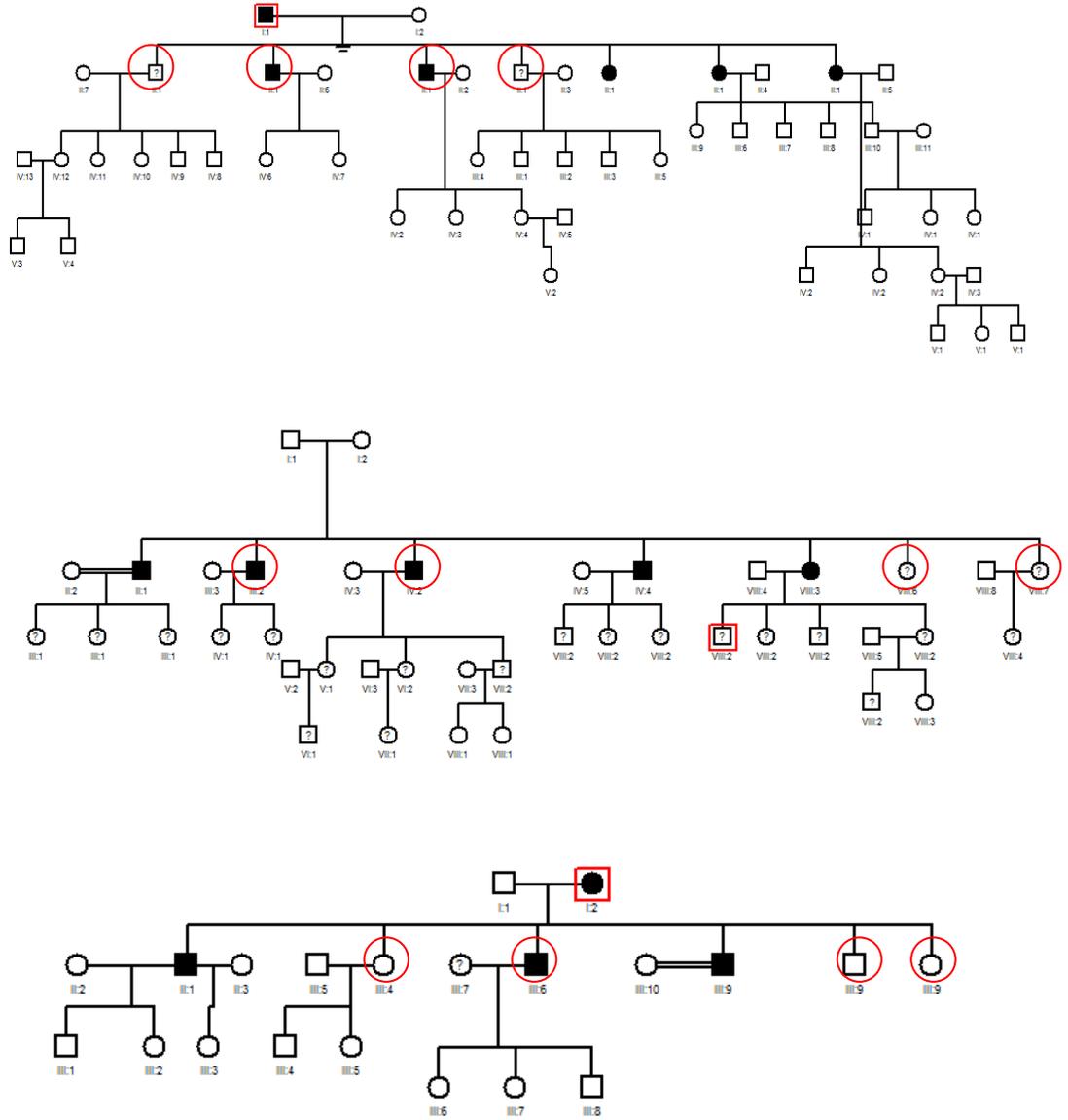
- P.O.S., Gudmundsdottir, G.J., Southgate, L., Burdon, K.P., Gottfredsdottir, M.S., Aldred, M.A., Mitchell, P., St Clair, D., Collier, D.A., Tang, N., Sveinsson, O., Macgregor, S., Martin, N.G., Cree, A.J., Gibson, J., Macleod, A., Jacob, A., Ennis, S., Young, T.L., Chan, J.C.N., Karwatowski, W.S.S., Hammond, C.J., Thordarson, K., Zhang, M., Wadelius, C., Lotery, A.J., Trembath, R.C., Pang, C.P., Hoh, J., Craig, J.E., Kong, A., Mackey, D.A., Jonasson, F., Thorsteinsdottir, U., Stefansson, K., 2010b. Common variants near CAV1 and CAV2 are associated with primary open-angle glaucoma. *Nat. Genet.* 42, 906–909. doi:10.1038/ng.661
- Tielsch JM, Katz J, Sommer A, Quigley HA, Javitt JC, 1995. Hypertension, perfusion pressure, and primary open-angle glaucoma: A population-based assessment. *Arch. Ophthalmol.* 113, 216–221. doi:10.1001/archophth.1995.01100020100038
- Tielsch, J.M., Sommer, A., Katz, J., Royall, R.M., Quigley, H.A., Javitt, J., 1991. Racial variations in the prevalence of primary open-angle glaucoma. The Baltimore Eye Survey. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 266, 369–374.
- Toda, N., Nakanishi-Toda, M., 2007a. Nitric oxide: ocular blood flow, glaucoma, and diabetic retinopathy. *Prog. Retin. Eye Res.* 26, 205–238. doi:10.1016/j.preteyeres.2007.01.004
- Toda, N., Nakanishi-Toda, M., 2007b. Nitric oxide: ocular blood flow, glaucoma, and diabetic retinopathy. *Prog. Retin. Eye Res.* 26, 205–238. doi:10.1016/j.preteyeres.2007.01.004
- Trifan, O.C., Traboulsi, E.I., Stoilova, D., Alozie, I., Nguyen, R., Raja, S., Sarfarazi, M., 1998. A third locus (GLC1D) for adult-onset primary open-angle glaucoma maps to the 8q23 region. *Am. J. Ophthalmol.* 126, 17–28. doi:10.1016/S0002-9394(98)00073-7
- Ulmer, M., Li, J., Yaspan, B.L., Ozel, A.B., Richards, J.E., Moroi, S.E., Hawthorne, F., Budenz, D.L., Friedman, D.S., Gaasterland, D., Haines, J., Kang, J.H., Lee, R., Lichter, P., Liu, Y., Pasquale, L.R., Pericak-Vance, M., Realini, A., Schuman, J.S., Singh, K., Vollrath, D., Weinreb, R., Wollstein, G., Zack, D.J., Zhang, K., Young, T., Allingham, R.R., Wiggs, J.L., Ashley-Koch, A., Hauser, M.A., 2012. Genome-wide analysis of central corneal thickness in primary open-angle glaucoma cases in the NEIGHBOR and GLAUGEN consortia. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53, 4468–4474. doi:10.1167/iovs.12-9784
- van Koolwijk, L.M.E., Despriet, D.D.G., van Duijn, C.M., Pardo Cortes, L.M., Vingerling, J.R., Aulchenko, Y.S., Oostra, B.A., Klaver, C.C.W., Lemij, H.G., 2007. Genetic contributions to glaucoma: heritability of intraocular pressure, retinal nerve fiber layer thickness, and optic disc morphology. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48, 3669–3676. doi:10.1167/iovs.06-1519
- van Koolwijk, L.M.E., Ramdas, W.D., Ikram, M.K., Jansonius, N.M., Pasutto, F., Hysi, P.G., Macgregor, S., Janssen, S.F., Hewitt, A.W., Viswanathan, A.C., ten Brink, J.B., Hosseini, S.M., Amin, N., Despriet, D.D.G., Willemse-Assink, J.J.M., Kramer, R., Rivadeneira, F., Struchalin, M., Aulchenko, Y.S., Weisschuh, N., Zenkel, M., Mardin, C.Y., Gramer, E., Welge-Lüssen, U., Montgomery, G.W., Carbonaro, F., Young, T.L., DCCT/EDIC Research Group, Bellenguez, C., McGuffin, P., Foster, P.J., Topouzis, F., Mitchell, P., Wang, J.J., Wong, T.Y., Czudowska, M.A., Hofman, A., Uitterlinden, A.G., Wolfs, R.C.W., de Jong, P.T.V.M., Oostra, B.A., Paterson, A.D., Wellcome Trust Case Control Consortium 2, Mackey, D.A., Bergen, A.A.B., Reis, A., Hammond, C.J., Vingerling, J.R., Lemij, H.G., Klaver, C.C.W., van Duijn, C.M., 2012. Common genetic determinants of intraocular pressure and primary open-angle glaucoma. *PLoS Genet.* 8, e1002611. doi:10.1371/journal.pgen.1002611
- Vincent, A.L., Billingsley, G., Buys, Y., Levin, A.V., Priston, M., Trope, G., Williams-Lyn, D., Héon, E., 2002. Digenic inheritance of early-onset glaucoma: CYP1B1, a potential modifier gene. *Am. J. Hum. Genet.* 70, 448–460. doi:10.1086/338709
- Vishal, M., Sharma, A., Kaurani, L., Alfano, G., Mookherjee, S., Narta, K., Agrawal, J., Bhattacharya, I., Roychoudhury, S., Ray, J., Waseem, N.H., Bhattacharya, S.S., Basu, A., Sen, A., Ray, K., Mukhopadhyay, A., 2016. Genetic association and stress mediated down-regulation in trabecular meshwork implicates MPP7 as a novel candidate gene in primary open angle glaucoma. *BMC Med. Genomics* 9. doi:10.1186/s12920-016-0177-6
- Vitart, V., Bencić, G., Hayward, C., Skunca Herman, J., Huffman, J., Campbell, S., Bućan, K., Navarro, P., Gunjaca, G., Marin, J., Zgaga, L., Kolčić, I., Polasek, O., Kirin, M., Hastie, N.D., Wilson, J.F., Rudan, I., Campbell, H., Vatavuk, Z., Fleck, B., Wright, A., 2010. New loci associated with central cornea thickness include COL5A1, AKAP13 and AVGR8. *Hum. Mol. Genet.* 19, 4304–4311. doi:10.1093/hmg/ddq349

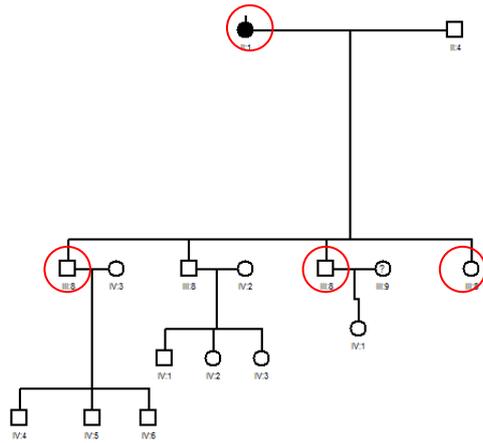
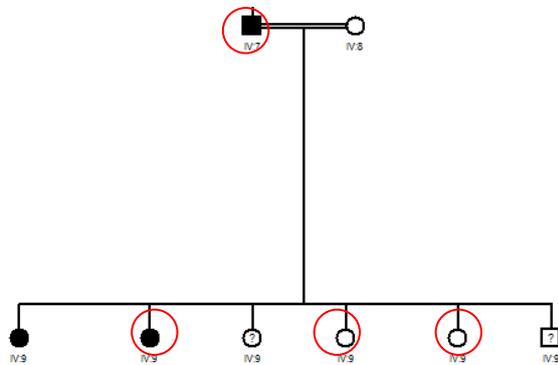
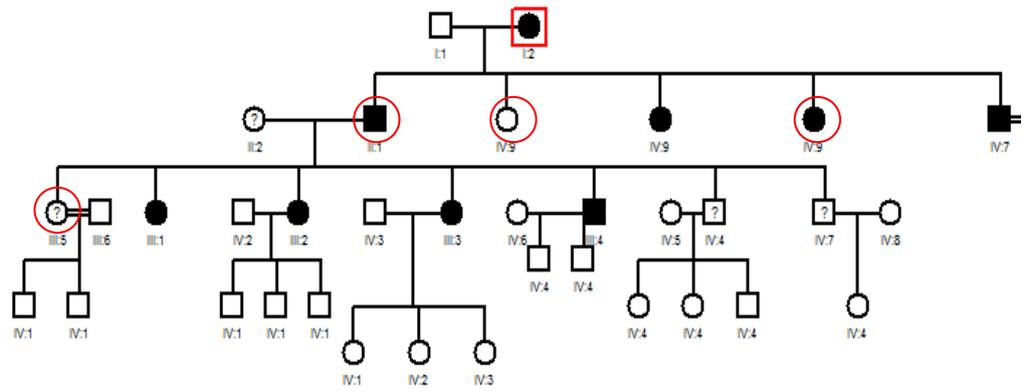
- Vithana, E.N., Aung, T., Khor, C.C., Cornes, B.K., Tay, W.-T., Sim, X., Lavanya, R., Wu, R., Zheng, Y., Hibberd, M.L., Chia, K.S., Seielstad, M., Goh, L.K., Saw, S.-M., Tai, E.S., Wong, T.Y., 2011. Collagen-related genes influence the glaucoma risk factor, central corneal thickness. *Hum. Mol. Genet.* 20, 649–658. doi:10.1093/hmg/ddq511
- Vithana, E.N., Nongpiur, M.E., Venkataraman, D., Chan, S.H., Mavinahalli, J., Aung, T., 2010. Identification of a novel mutation in the NTF4 gene that causes primary open-angle glaucoma in a Chinese population. *Mol. Vis.* 16, 1640–1645.
- Wallace, D.J., Chau, F.Y., Santiago-Turla, C., Hauser, M., Challa, P., Lee, P.P., Herndon, L.W., Allingham, R.R., 2014. Osteogenesis imperfecta and primary open angle glaucoma: genotypic analysis of a new phenotypic association. *Mol. Vis.* 20, 1174–1181.
- Wang, D.Y., Fan, B.J., Chua, J.K.H., Tam, P.O.S., Leung, C.K.S., Lam, D.S.C., Pang, C.P., 2006. A genome-wide scan maps a novel juvenile-onset primary open-angle glaucoma locus to 15q. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 5315–5321. doi:10.1167/iovs.06-0179
- Wang, Y.X., Xu, L., Yang, H., Jonas, J.B., 2010. Prevalence of glaucoma in North China: the Beijing Eye Study. *Am. J. Ophthalmol.* 150, 917–924. doi:10.1016/j.ajo.2010.06.037
- Weinreb, R.N., 2007. Glaucoma neuroprotection: What is it? Why is it needed? *Can. J. Ophthalmol. J. Can. Ophthalmol.* 42, 396–398. doi:10.3129/can_j_ophthalmol.i07-045
- Weinreb, R.N., Khaw, P.T., 2004. Primary open-angle glaucoma. *The Lancet* 363, 1711–1720. doi:10.1016/S0140-6736(04)16257-0
- Wiggs, J.L., 2012. The Cell and Molecular Biology of Complex Forms of Glaucoma: Updates on Genetic, Environmental, and Epigenetic Risk Factors. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* 53, 2467. doi:10.1167/iovs.12-9483e
- Wiggs JL, 2008. Association between lox11 and pseudoexfoliation. *Arch. Ophthalmol.* 126, 420–421. doi:10.1001/archophth.126.3.420
- Wiggs, J.L., Allingham, R.R., Hossain, A., Kern, J., Auguste, J., DelBono, E.A., Broome, B., Graham, F.L., Hauser, M., Pericak-Vance, M., Haines, J.L., 2000. Genome-wide scan for adult onset primary open angle glaucoma. *Hum. Mol. Genet.* 9, 1109–1117.
- Wiggs, J.L., Allingham, R.R., Vollrath, D., Jones, K.H., De La Paz, M., Kern, J., Patterson, K., Babb, V.L., Del Bono, E.A., Broome, B.W., Pericak-Vance, M.A., Haines, J.L., 1998. Prevalence of mutations in TIGR/Myocilin in patients with adult and juvenile primary open-angle glaucoma. *Am. J. Hum. Genet.* 63, 1549–1552. doi:10.1086/302098
- Wiggs, J.L., Howell, G.R., Linkroum, K., Abdrabou, W., Hodges, E., Braine, C.E., Pasquale, L.R., Hannon, G.J., Haines, J.L., John, S.W.M., 2013. Variations in COL15A1 and COL18A1 influence age of onset of primary open angle glaucoma. *Clin. Genet.* 84, 167–174. doi:10.1111/cge.12176
- Wiggs, J.L., Kang, J.H., Yaspan, B.L., Mirel, D.B., Laurie, C., Crenshaw, A., Brodeur, W., Gogarten, S., Olson, L.M., Abdrabou, W., DelBono, E., Loomis, S., Haines, J.L., Pasquale, L.R., 2011. Common variants near CAV1 and CAV2 are associated with primary open-angle glaucoma in Caucasians from the USA. *Hum. Mol. Genet.* 20, 4707–4713. doi:10.1093/hmg/ddr382
- Wiggs, J.L., Lynch, S., Ynagi, G., Maselli, M., Auguste, J., Del Bono, E.A., Olson, L.M., Haines, J.L., 2004. A Genomewide Scan Identifies Novel Early-Onset Primary Open-Angle Glaucoma Loci on 9q22 and 20p12. *Am. J. Hum. Genet.* 74, 1314–1320.
- Wiggs, J.L., Yaspan, B.L., Hauser, M.A., Kang, J.H., Allingham, R.R., Olson, L.M., Abdrabou, W., Fan, B.J., Wang, D.Y., Brodeur, W., Budenz, D.L., Caprioli, J., Crenshaw, A., Crooks, K., DelBono, E., Doheny, K.F., Friedman, D.S., Gaasterland, D., Gaasterland, T., Laurie, C., Lee, R.K., Lichter, P.R., Loomis, S., Liu, Y., Medeiros, F.A., McCarty, C., Mirel, D., Moroi, S.E., Musch, D.C., Realini, A., Rozsa, F.W., Schuman, J.S., Scott, K., Singh, K., Stein, J.D., Trager, E.H., VanVeldhuisen, P., Vollrath, D., Wollstein, G., Yoneyama, S., Zhang, K., Weinreb, R.N., Ernst, J., Kellis, M., Masuda, T., Zack, D., Richards, J.E., Pericak-Vance, M., Pasquale, L.R., Haines, J.L., 2012. Common Variants at 9p21 and 8q22 Are Associated with Increased Susceptibility to Optic Nerve Degeneration in Glaucoma. *PLoS Genet* 8, e1002654. doi:10.1371/journal.pgen.1002654
- Wirtz, M.K., Samples, J.R., Kramer, P.L., Rust, K., Topinka, J.R., Yount, J., Koler, R.D., Acott, T.S., 1997. Mapping a gene for adult-onset primary open-angle glaucoma to chromosome 3q. *Am. J. Hum. Genet.* 60, 296–304.

- Wirtz, M.K., Samples, J.R., Rust, K., Lie, J., Nordling, L., Schilling, K., Acott, T.S., Kramer, P.L., 1999. GLC1F, a new primary open-angle glaucoma locus, maps to 7q35-q36. *Arch. Ophthalmol.* 117, 237–241.
- Wirtz, M.K., Samples, J.R., Rust, K., Lie, J., Nordling, L., Schilling, K., Acott, T.S., Kramer, P.L., 1999. GLC1F, a new primary open-angle glaucoma locus, maps to 7q35-q36. *Arch. Ophthalmol.* 117, 237–241.
- Wittke-Thompson, J.K., Pluzhnikov, A., Cox, N.J., 2005. Rational inferences about departures from Hardy-Weinberg equilibrium. *Am. J. Hum. Genet.* 76, 967–986. doi:10.1086/430507
- Wu, J., Hewitt, A.W., Green, C.M., Ring, M.A., McCartney, P.J., Craig, J.E., Mackey, D.A., 2006. Disease severity of familial glaucoma compared with sporadic glaucoma. *Arch. Ophthalmol.* 124, 950–954. doi:10.1001/archophth.124.7.950
- Xu, L., Wang, Y., Wang, S., Wang, Y., Jonas, J.B., 2007. High myopia and glaucoma susceptibility the Beijing Eye Study. *Ophthalmology* 114, 216–220. doi:10.1016/j.ophtha.2006.06.050
- Yildirim, O., Ateş, N.A., Tamer, L., Oz, O., Yilmaz, A., Atik, U., Camdeviren, H., 2005. May glutathione S-transferase M1 positive genotype afford protection against primary open-angle glaucoma? *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. Albrecht Von Graefes Arch. Für Klin. Exp. Ophthalmol.* 243, 327–333. doi:10.1007/s00417-004-1013-9
- Zenteno, J.C., Hernandez-Merino, E., Mejia-Lopez, H., Matías-Florentino, M., Michel, N., Elizondo-Olascoaga, C., Korder-Ortega, V., Casab-Rueda, H., Garcia-Ortiz, J.E., 2008. Contribution of CYP1B1 mutations and founder effect to primary congenital glaucoma in Mexico. *J. Glaucoma* 17, 189–192. doi:10.1097/IJG.0b013e31815678c3
- Zhou, M., Wang, W., Huang, W., Zhang, X., 2014. Diabetes mellitus as a risk factor for open-angle glaucoma: a systematic review and meta-analysis. *PloS One* 9, e102972. doi:10.1371/journal.pone.0102972
- Zode, G.S., Sharma, A.B., Lin, X., Searby, C.C., Bugge, K., Kim, G.H., Clark, A.F., Sheffield, V.C., 2014. Ocular-specific ER stress reduction rescues glaucoma in murine glucocorticoid-induced glaucoma. *J. Clin. Invest.* 124, 1956–1965. doi:10.1172/JCI69774
- Zou, G.Y., Donner, A., 2006. The merits of testing Hardy-Weinberg equilibrium in the analysis of unmatched case-control data: a cautionary note. *Ann. Hum. Genet.* 70, 923–933. doi:10.1111/j.1469-1809.2006.00267.x

6.0 APÊNDICES

6.1 Apêndice 1: Heredogramas das famílias estudadas por meio do sequenciamento dos genes *MYOC* e *CYP11B1*.





6.2 Apêndice 2: Genes relacionados ao GPAA e endofenótipos, por meio de estudos de associação.

Cr.	Gene(s)	Fenótipo	GWAS	Local	Autores
1p22	<i>CDC7/TGFB3</i>	ADO	+	Reino Unido	(Ramdas et al., 2010)
1p34.3	<i>COL8A2</i> ,	GPAA	+	Malásia	(Vithana et al., 2011)
1p12.2	<i>GSTM1</i>	GPAA	-	Turquia	(Yildirim et al., 2005)
1q43	<i>ZP4</i>	GPAA	+	Japão	(Nakano et al., 2009b)
1q24	<i>TMCO1</i>	GPAA	+	Austrália	(Burdon et al., 2011)
2q11.21	<i>TXNRD2</i>	GPAA	+	EUA	(Bailey et al., 2016)
2q21	<i>NCKAP</i>	GPAA	+	EUA	(Osman et al., 2012)
2p21	<i>SRBD1</i>	GPAA	+	Japão	(Merugo et al 2010)
3q28-q29	<i>OPA1</i>	GPAA	-	Reino Unido	(P Yu-Wai-Man, 2009)
3q26.21	<i>FNDC3B</i>	PIO	+	Europa,Ásia	(Hysi et al., 2014)
4p16.1	<i>AFAP1</i>	GPAA	+	Austrália	(Gharahkhani et al., 2014)
5p13.1	<i>C7</i>	GPAA	+	EUA	(Scheetz et al., 2013)
6p12.1	<i>ELOVL5</i>	GPAA	+	Japão	(Merugo et al 2010)
6p21.3	<i>TNF alfa</i>	GPAA	-	Turquia	(M K Wirtz et al., 1999).
6p25.3	<i>FOXC1</i>	GPAA	+	EUA	(Bailey et al., 2016)
6p25.6	<i>GMDS</i>	GPAA	+	Austrália	(Gharahkhani et al., 2014)
7q11.21	<i>C7orf42</i>	ECC	+	Ásia	(Cornes et al., 2012)
7p21.3	<i>ICA1</i>	PIO	+	Europa	(BMES,WDTCCC2,2013)*
7q31.1	<i>CAVI2</i>	GPAA	+	Islândia	(Thorleifsson et al., 2010a)
8q22	<i>LRP12, ZFPM2</i>	GPAA	+	EUA	(Wiggs et al., 2012)
9q31.1	<i>ABCA1</i>	GPAA	+	China	(Chen et al., 2014)
9q33.1	<i>TLR4</i>	GPAA	-	Japão	(Shibuya et al., 2008)
9p21	<i>CDKN2B</i>	GPAA	+	Reino Unido	(Ramdas et al., 2010)
10q21.3	<i>ATOH7</i>	GPAA	+	Holanda	(Ramdas et al., 2010)
10p12.1	<i>MPP7</i>	GPAA	+	Índia	(Vishal et al., 2016)
10p12.31	<i>PLXDC2</i>	GPAA	+	Japão	(Nakano et al., 2009b)
11p13	<i>PAX6</i>	GPAA	+	Holanda	(Ramdas et al., 2010)
11q23.3	<i>ARHGEF12</i>	PIO	+	Holanda	(Springelkamp et al., 2015b)
11q25	<i>NTM</i>	ECC	+	EUA	(Ulmer et al., 2012)
12q21-23	<i>TMTC2</i>	GPAA	+	Japão	(Nakano et al., 2009b)
12q24.1	<i>ATXN2</i>	GPAA	+	EUA	(Bailey et al., 2016)
13q13.3	<i>DCLK1</i>	REDV	+	Reino Unido	(Ramdas et al., 2010)
14q22-23	<i>SIX1/6</i>	GPAA	+	Holanda	(Ramdas et al., 2010)
15q26.3	<i>CHSY1</i>	ECC	+	Ásia	(Cornes et al., 2012)
15q24-25	<i>AKAP13</i>	ECC	+	Croácia/Escócia	(Vitart et al., 2010)
16q24	<i>ZNF469</i>	ECC	+	Croácia/Escócia	(Vitart et al., 2010)
16q23	<i>CNTNAP4</i>	ECC	+	EUA	(Ulmer et al., 2012)
16p13.2	<i>PMM2</i>	GPAA	+	China	(Chen et al., 2014)
17q23	<i>BCAS3</i>	REDV	+	Reino Unido	(Ramdas et al., 2010)
17p13.1	<i>GAS7</i>	PIO	+	Canadá	(van Koolwijk et al., 2012)
19q13.2	<i>APOE</i>	GPAA	-	Japão	(Mabuchi et al., 2005)
22q12.1	<i>CHEK2</i>	RED	+	Reino Unido	(Ramdas et al., 2010)
22q13.1	<i>CARD10</i>	GPAA	+	Ásia	(Khor et al., 2011)

*The Blue Mountains Eye Study (BMES) and The Wellcome Trust Case Control Consortium 2 (WTCCC2). Cr.: cromossomo. ADO: área do disco óptico. ECC: espessura central da córnea. REDV: razão escavação disco vertical. PIO: pressão intraocular.

7.0 ANEXOS

7.1 Anexo 1: Parecer do comitê de ética em pesquisa.



CEP. 29/04/14.
(PARECER CEP: N° 243/2003)

Universidade Estadual de Campinas
Pró-Reitoria de Pesquisa
Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER

I – IDENTIFICAÇÃO:

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

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: José Paulo Cabral de Vasconcelos

II – PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou o adendo que inclui o subprojeto "ASPECTOS GENÉTICOS DO GLAUCOMA PRIMÁRIO DE ÂNGULO ABERTO NA POPULAÇÃO BRASILEIRA", com finalidade de doutorado do aluno Hugo Freira Nunes, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

Recomendamos que no modelo de Termo de Consentimento Livre sejam realizadas as correções destacadas, que seja numeradas as páginas e que o pesquisador e participantes rubriquem todas as páginas.

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.

III – DATA DA REUNIÃO.

Homologado na III-Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 29 de abril de 2014.

Profa. Dra. Fátima Aparecida Böttcher Luiz
COORDENADORA DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

7.2 Anexo 2: Declaração de direitos autorais.

Profa. Dra. Rachel Meneguello
Presidente
Comissão Central de Pós-Graduação
Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada “**Aspectos genéticos do glaucoma primário de ângulo aberto na população brasileira**”, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 20/07/2016

Assinatura : 
Nome do(a) autor(a): **Hugo Freire Nunes**
RG n.º 4708659

Assinatura : 
Nome do(a) orientador(a): **Mônica Barbosa de Melo**
RG n.º 319873