



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

MARCELO LUÍS OCCHIUTTO

**AVALIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS E2, E3, e E4 NO GENE *APOE* EM
RELAÇÃO À ETIOLOGIA DO GLAUCOMA PRIMÁRIO DE ÂNGULO ABERTO EM
UMA AMOSTRA DA POPULAÇÃO BRASILEIRA**

CAMPINAS

2021

MARCELO LUÍS OCCHIUTTO

**AVALIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS E2, E3, e E4 NO GENE APOE EM
RELAÇÃO À ETIOLOGIA DO GLAUCOMA PRIMÁRIO DE ÂNGULO ABERTO EM
UMA AMOSTRA DA POPULAÇÃO BRASILEIRA**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de doutor em Ciências, na área de concentração Oftalmologia

ORIENTADOR: PROF. DR. VITAL PAULINO COSTA
COORIENTADORA: Prof.^a. DR^a. MÔNICA BARBOSA DE MELO

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO MARCELO LUÍS OCCHIUTTO, E ORIENTADA PELO PROF. DR. VITAL PAULINO COSTA

CAMPINAS

2021

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Occhiutto, Marcelo Luís, 1966-
Oc14a Avaliação dos polimorfismos E2, E3 e E4 no gene *APOE* em relação à etiologia do glaucoma primário de ângulo aberto em uma amostra da população brasileira / Marcelo Luís Occhiutto. – Campinas, SP : [s.n.], 2021.

Orientador: Vital Paulino Costa.

Coorientador: Mônica Barbosa de Melo.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Apolipoproteína E2. 2. Apolipoproteína E3. 3. Apolipoproteína E4. 4. Polimorfismo de nucleotídeo único. 5. Glaucoma primário de ângulo aberto. 6. Genética. I. Costa, Vital Paulino, 1965-. II. Melo, Mônica Barbosa, 1968-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of E2, E3 and E4 polymorphisms in the *APOE* gene in relation to the etiology of primary open-angle glaucoma in a sample of the Brazilian population

Palavras-chave em inglês:

Apolipoprotein E2

Apolipoprotein E3

Apolipoprotein E4

Polymorphism single nucleotide

Primary open-angle glaucoma

Genetics

Área de concentração: Oftalmologia

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora:

Vital Paulino Costa [Orientador]

Fábio Nishimura Kanadani

Rui Barroso Schimiti

Edi Lúcia Sartorato

Mônica de Cássia Alves de Paula

Data de defesa: 17-05-2021

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-4744-5894>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/8399028141034316>

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

MARCELO LUÍS OCCHIUTTO

ORIENTADOR: PROF. DR. VITAL PAULINO COSTA

COORDENADOR: PROF^a. DR^a. MÔNICA BARBOSA DE MELO

MEMBROS TITULARES:

1. PROF. DR. VITAL PAULINO COSTA

2. PROF. DR. FÁBIO NISHIMURA KANADANI

3. PROF. DR. RUI BARROSO SCHIMITI

4. PROF^a. DR^a. EDI LÚCIA SARTORATO

5. PROF^a. DR^a. MÔNICA DE CÁSSIA ALVES DE PAULA

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

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Faculdade de Ciências Médicas

Data de Defesa: 17/05/2021

DEDICATÓRIA

“A todos os pacientes portadores de glaucoma, que, como todos nós, desejam continuar com a possibilidade de ver todas as paisagens e todos os seus afetos.”

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Vital Paulino Costa, meu muito obrigado pela honrosa oportunidade a mim duplamente concedida, desde a saga de meu mestrado. Pela confiança permanente, por compartilhar seu imenso cabedal de conhecimento sempre com desprendimento intelectual, pela condução lúcida de meus passos durante tantos anos e, especialmente, por me fazer reverenciar a Ciência, pelo seu singular exemplo.

À Dra. Mônica Barbosa de Melo, agradeço imensamente pela chance de contato com um mundo novo, pelos escaninhos infinitos de nossas inscrições divinas – os genes. Pela sua paciência e compreensão com minhas limitações, por ampliar minha admiração por todos os sinceros e grandes cientistas brasileiros, como a senhora, que miraculosamente e por esforço próprio, permitem o avanço científico, mesmo em um país ainda incipiente no incentivo à Ciência.

Ao Dr. José Paulo C. Vasconcellos, por sua disponibilidade, por sua inalterável disposição em ajudar, por seu constante sorriso incentivador, por ser meu maior exemplo de simplicidade aliada à sua nobreza como ser humano.

Ao Dr. Bruno Batista de Souza, que, além de ser um grande cientista escondido em um disfarce de homem comum, concedeu-me todas as provas de uma amizade profunda, que espero possa perdurar por toda uma vida.

Aos todos os companheiros do CBMEG, especialmente à Dani Stancato e Flávia Bajano, pela inestimável ajuda em meu projeto.

Aos residentes, fellows, pós-graduandos e assistentes do Departamento de Glaucoma da Unicamp, especialmente os colegas Thaís Helena Passos, Leonardo Shigueoka, Camila Zangalli e Alexandre Reis, meu muitíssimo obrigado por toda ajuda.

Às queridas Eli e Karla, pela cordialidade, empenho, prontidão, participação fundamental em todas as etapas desta história, e pelo carinho que me sustentou em cada dia, sem exceção, que com elas convivi.

À minha mãe, que repetiu infinitas vezes: “vá em frente”, mesmo suportando tanta dor, e ainda assim se despedindo de mim a cada viagem à Campinas com um sorriso; e ao meu pai, que, por não mais estar entre nós, não terá a chance de presenciar este momento, mas estará presente de alguma forma, e feliz, eu creio, de onde quer que me veja.

Aos meus amigos mais sinceros, os tesouros que mais prezo, pelo essencial esteio durante esta jornada. Agradeço especialmente e, eternamente, a Renato Sanches, que foi o farol a me guiar durante toda a travessia desta jornada, não tendo me permitido esmorecer um só dia.

A todos os pacientes e participantes voluntários que cederam uma parcela de seu sangue e de seu tempo, em um nobre gesto de solidariedade e magnânimo contributo à Ciência.

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) que me proporcionou toda estrutura e apoio integrais para a construção desta tese.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro concedido ao CEBMEG – UNICAMP, onde foram realizados os testes genéticos desta pesquisa, através do processo nº 2010/18353-9.

“Adormeci e sonhei que a vida era alegria;
Despertei e vi que a vida era serviço;
Servi e vi que o serviço era alegria.”

Rabindranath Tagore

RESUMO

Introdução: O glaucoma primário de ângulo aberto (GPAA) é uma doença ocular complexa que afeta milhões de indivíduos em todo o mundo. O GPAA é uma das principais causas de cegueira entre adultos acima da quarta década de vida. Embora a pressão intraocular elevada seja reconhecida como o maior fator de risco no GPAA, múltiplos outros fatores, incluindo genéticos, estão provavelmente envolvidos na patogênese da neuropatia óptica glaucomatosa. A apolipoproteína E (APOE) é a mais frequente apolipoproteína no sistema nervoso central, e algumas variantes do gene *APOE* estão associadas a doenças neurológicas como a doença de Alzheimer, doença de Parkinson e esclerose amiotrófica lateral. Como o glaucoma é uma doença neurodegenerativa, é possível que variantes genéticas do gene *APOE* possam estar associadas a essa enfermidade. Os estudos já realizados investigando a possível correlação entre variantes no gene *APOE* (E2, E3 ou E4) e glaucoma revelaram resultados controversos, dependendo da população específica investigada. Não há relatos de investigação da associação entre variantes no gene *APOE* e o GPAA na população brasileira. **Objetivo:** Investigar a frequência das variantes do gene *APOE*, e se há uma associação entre os polimorfismos E2/ E3/ E4 do gene *APOE* e o GPAA, em uma amostra da população brasileira. O objetivo complementar foi pesquisar se há associação entre os genótipos analisados e a gravidade do glaucoma, indicada pela necessidade ou o número de cirurgias antiglaucomatosas realizadas. **Métodos:** As variantes genéticas do gene *APOE* (rs429358; rs7412) foram genotipadas em uma amostra de 402 pacientes portadores de GPAA e 401 controles. Avaliou-se a associação entre as variantes do gene *APOE* e o risco de GPAA, assim como a correlação entre a necessidade de cirurgia antiglaucomatosa e as respectivas variantes genéticas estudadas. **Resultados:** As frequências de variantes (alelos) do gene *APOE* encontradas em nossa população foram 80,88%, 11,76% e 7,34% para E3, E4 e E2, respectivamente. Os resultados demonstraram que os portadores do alelo E2 (*Odds ratio* (OR)=1,516; p=0,04) e o genótipo E2-E3 (OR=1,655; p=0,02) apresentavam maior risco de GPAA, quando comparados com o genótipo de referência E3-E3. O modelo genético aditivo ratificou a influência do alelo E2 no risco de GPAA nesta amostra da população brasileira (OR=1,502; p=0,04). Não houve associação significativa entre os genótipos analisados e a necessidade ou o número de cirurgias antiglaucomatosas realizadas (p>0,05). **Conclusão:** As frequências de variantes do gene *APOE* encontradas em nossa população (*APOE*-E2=7,34%; *APOE*-E3=80,88%; e *APOE*-E4=11,76%) foram similares às relatadas na maioria dos estudos já publicados no Brasil, e também correspondentes às abrangências alélicas mundiais descritas sobre este gene. Portadores do alelo *APOE*-E2 e portadores do genótipo E2-E3 apresentaram risco aumentado para o desenvolvimento de GPAA, nesta amostra da população brasileira. Não houve associação significativa entre quaisquer portadores de alelos *APOE* específicos ou genótipos analisados e a necessidade ou número de cirurgias de glaucoma realizadas.

Palavras-chave: Apolipoproteína E2; Apolipoproteína E3; Apolipoproteína E4; Polimorfismo de Nucleotídeo Único; Glaucoma primário de ângulo aberto; Genética; rs429358; rs7412.

ABSTRACT

Introduction: Primary Open-Angle Glaucoma (POAG) is a complex eye disease that affects millions of people around the world. POAG is one of the leading causes of blindness for adults aged over 40 years. Although high intraocular pressure is recognized as a major risk factor for glaucoma development, multiple other factors, including genetic factors, are likely to be involved in the pathogenesis of glaucomatous optic neuropathy. Apolipoprotein E (APOE) is the most common apolipoprotein in the central nervous system, and some of its gene variants are associated with neurological diseases such as Alzheimer's, Parkinson's, and amyotrophic lateral sclerosis. Since glaucoma is a neurodegenerative disease, APOE gene variants may be associated with this disease. Studies investigating the correlation between APOE gene variants (E2, E3 or E4) and glaucoma have delivered controversial results, depending on the population investigated. There are no reports on the association between APOE gene variants and POAG in the Brazilian population. **Objective:** To investigate the frequency of APOE gene variants, and the association between the polymorphisms E2/ E3/ E4 of the APOE gene and POAG in a sample of the Brazilian population. The secondary objective is to investigate the association between the analyzed genotypes and glaucoma severity, indicated by the need for, or number of glaucoma surgeries performed. **Methods:** The APOE gene variants (rs429358; rs7412) were genotyped from 402 POAG patients and 401 controls. The association between APOE gene variants and POAG was evaluated, as well as the correlation between the need for glaucoma surgery and the genetic variants studied. **Results:** The frequencies of APOE gene variants (alleles) found in this population were 80.88%, 11.76%, and 7.34% for variants E3, E4, and E2, respectively. The results showed that E2 allele carriers (odds ratio (OR) = 1.516, p-value = 0.04) and the E2-E3 genotype (OR = 1.655, p-value = 0.02) showed increased risk for POAG when compared to the reference E3-E3 genotype. The additive genetic model ratified the influence of the E2 allele on POAG risk in this sample of the Brazilian population (OR = 1.502; p-value = 0.04). There was no significant association between the analyzed genotypes and the need for or number of glaucoma surgeries performed (p-value > 0.05). **Conclusion:** The frequencies of APOE gene variants found in our population (APOE-E2=7,34%; APOE-E3=80,88%; and APOE-E4=11,76%) were similar to most studies published in Brazil, and also corresponded to the reported worldwide allelic ranges of this gene. APOE-E2 allele carriers, especially those with E2-E3 genotype, may present increased risk for the development of POAG in this sample of the Brazilian population. There was no significant association between any specific APOE allele carriers or genotypes analyzed, and the need for or number of glaucoma surgeries performed.

Keywords: Apolipoprotein E2; Apolipoprotein E3; Apolipoprotein E4; Polymorphism, Single Nucleotide; Glaucoma, Open-Angle; Genetics; rs429358; rs7412.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|-----------|
| Figura 1 – Principais eventos patogênicos envolvidos na progressão neurodegenerativa do glaucoma..... | 24 |
| Figura 2 – Tamanho do efeito biológico e frequência de variantes genéticas no GPAA..... | 25 |
| Figura 3 – Polimorfismos subjacentes às três principais variantes do <i>APOE</i> em humanos..... | 32 |
| Figura 4 – Distribuição da frequência dos alelos <i>APOE</i> em 82 países..... | 34 |
| Figura 5 – Biossíntese da <i>APOE</i> | 36 |
| Figura 6 – Proposição teórica da influência de variante(s) do gene <i>APOE</i> na patogenia do glaucoma..... | 50 |
| Figura 7 – <i>Box-plot</i> representando a estatística descritiva da variável idade nos grupos caso e controle..... | 63 |
| Figura 8 – Frequência geral dos genótipos <i>APOE</i> em toda a amostra (casos e controles)..... | 65 |
| Figura 9 – Frequência dos genótipos <i>APOE</i> nos grupos caso e controle..... | 65 |
| Figura 10 – Frequência específica de alelos e genótipos <i>APOE</i> nos grupos caso e controle..... | 66 |
| Quadro 1 – Polimorfismos de nucleotídeo único (<i>SNPs</i>) associados com GPAA descobertos por meio de GWAS..... | 26 |
| Quadro 2 – As três variantes comuns do gene <i>APOE</i> | 31 |
| Quadro 3 – Estudos que investigaram a relação das variantes do gene <i>APOE</i> com glaucoma..... | 77 |
| Gráfico 1 – Resultados do cálculo amostral prévio..... | 61 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----------|
| Tabela 1 – Sistemas biológicos, genes e proteínas codificadas envolvidos no glaucoma hereditário..... | 28 |
| Tabela 2 – Haplótipos e combinações de resíduos correspondentes associadas a cada alelo <i>APOE</i> | 32 |
| Tabela 3 – Estatística descritiva da frequência mundial dos alelos do gene <i>APOE</i> | 33 |
| Tabela 4 – Resultados do cálculo amostral prévio..... | 60 |
| Tabela 5 – Frequência da variável gênero na amostra..... | 62 |
| Tabela 6 – Estatística descritiva da variável idade em casos e controles..... | 62 |
| Tabela 7 – Frequência de alelos do gene <i>APOE</i> em pacientes com GPAA e controles | 64 |
| Tabela 8 – Frequência de genótipos do gene <i>APOE</i> em pacientes GPAA e controles | 64 |
| Tabela 9 – Regressão logística para avaliação do risco de apresentar GPAA entre os portadores de alelos E2 e E4 <i>versus</i> genótipo E3-E3; entre cada genótipo <i>APOE</i> , e através de modelo genético aditivo..... | 67 |
| Tabela 10 – Necessidade de cirurgia antiglaucomatosa dos portadores dos alelos <i>APOE</i> - E2, E3 e E4..... | 68 |
| Tabela 11 – Números de cirurgias antiglaucomatosas realizadas dentre os genótipos e portadores dos alelos <i>APOE</i> - E2, E3 e E4..... | 68 |
| Tabela 12 – Frequência alélica do <i>APOE</i> em amostra deste estudo comparada a outros estudos brasileiros e à abrangência da frequência alélica mundial..... | 70 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------------------|--|
| ABCA1, G1 | <i>Adenison binding cassette transportes A1 and G1</i> |
| ADAGES | <i>African Descent and Glaucoma Evaluation Study</i> |
| APOA-I | Apolipoproteína-I |
| APOA-II | Apolipoproteína II |
| ApoAi | Apolipoproteína Ai |
| APOE | Apolipoproteína E |
| Arg | Arginina |
| B48 | Apolipoproteína B48 |
| B100 | Apolipoproteína B100 |
| bFGF | <i>basic fibroblast growth factor</i> |
| CGR | Células ganglionares da retina |
| col. | Colaboradores |
| CSF | Líquido cefalorraquidiano |
| Cys | Cisteína |
| DA | Doença de Alzheimer |
| DMRI | Degeneração macular relacionada à idade |
| DP | Desvio-padrão |
| DSAEK | <i>Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty</i> |
| GERA | <i>Genetic Epidemiology Research in Adult Health and Aging</i> |
| GPAA | Glaucoma Primário de Ângulo Aberto |
| GWAS | Estudo de Associação de Amplitude Genômica |
| HDL | Lipoproteína de alta densidade |
| HSPG | <i>Heparan sulphate proteoglycan</i> |
| IGHG1 | <i>Immunoglobulin heavy constant gamma 1 protein</i> |
| kda | kilodalton |
| LCAT | <i>Lecithin: cholesterol acyltransferase</i> |
| LDL | Lipoproteína de densidade baixa |
| LDRL | <i>Low density lipoprotein receptor</i> |
| LPL | <i>Lipoprotein lipase</i> |
| LRP1 | <i>LDL receptor related protein 1</i> |
| HTRA1 | <i>Serine Protease HTRA1</i> |
| MAPK | <i>Mitogen-activated protein kinase</i> |
| NEFA | Ácidos graxos não-esterificados |
| OR | <i>Odds ratio</i> |
| PDGF-BB | <i>Platelet-derived growth factor-BB</i> |
| PIO | Pressão intraocular |
| POAG | <i>Primary Open-Angle Glaucoma</i> |
| PL | <i>Phospholipid</i> |
| S | Serina |
| SCRB1 | <i>Scavenger receptor B1</i> |
| SNP | Polimorfismo de nucleotídeo único |
| T | Treonina |
| TrkB | <i>Tropomyosin receptor kinase B</i> |
| UC | Colesterol não-esterificado |
| VEGF | <i>Vascular endothelial growth factor</i> |
| VLDL | Lipoproteína de densidade muito baixa |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 16 |
| 1.1. Glaucoma – definição..... | 16 |
| 1.1.1. Glaucoma primário de ângulo aberto (GPAA)..... | 16 |
| 1.2. Epidemiologia do GPAA..... | 20 |
| 1.3. A patogênese do glaucoma..... | 22 |
| 1.4. Genética e GPAA..... | 24 |
| 1.4.1. A participação genética e os mecanismos biológicos envolvidos no glaucoma..... | 28 |
| 1.5. O gene <i>APOE</i> e a proteína APOE..... | 30 |
| 1.5.1. A frequência mundial e brasileira das variantes do gene <i>APOE</i> | 33 |
| 1.5.2. A evolução da APOE..... | 34 |
| 1.5.3. Uma visão geral da APOE e suas funções..... | 36 |
| 1.5.4. O polimorfismo do gene <i>APOE</i> em estados orgânicos patológicos..... | 38 |
| 1.6. Justificativa..... | 51 |
| 2. OBJETIVOS..... | 52 |
| 2.1. Objetivo geral..... | 52 |
| 2.2. Objetivo secundário..... | 52 |
| 3. MÉTODOS..... | 53 |
| 3.1. Desenho do estudo..... | 53 |
| 3.2. Casuística..... | 53 |
| 3.2.1. Seleção dos pacientes..... | 53 |
| 3.3. Aspectos éticos..... | 54 |
| 3.4. Entrevista e anamnese clínica e oftalmológica..... | 55 |
| 3.5. Avaliação oftalmológica..... | 56 |
| 3.6. Métodos laboratoriais..... | 56 |
| 3.6.1. Coleta de sangue e extração de ácido desoxirribonucleico (DNA)..... | 56 |
| 3.6.2. Avaliação dos polimorfismos..... | 56 |
| 3.6.3. PCR..... | 57 |
| 3.6.4. Reação de sequenciamento..... | 58 |
| 3.7. Análise estatística..... | 59 |

| | |
|--|------------|
| 3.8. Cálculo amostral..... | 60 |
| 4. RESULTADOS..... | 62 |
| 4.1. Dados demográficos e estatística descritiva..... | 62 |
| 4.2. Análise dos polimorfismos rs429358 e rs7412 do gene <i>APOE</i> | 63 |
| 4.2.1. Avaliação do Equilíbrio de Hardy-Weinberg em casos e controles..... | 63 |
| 4.2.2. Frequência alélica..... | 63 |
| 4.2.3. Frequência genotípica..... | 64 |
| 4.2.4. Modelos de regressão logística..... | 66 |
| 5. DISCUSSÃO..... | 69 |
| 6. CONCLUSÃO..... | 79 |
| 7. REFERÊNCIAS..... | 80 |
| 8. ANEXOS..... | 111 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 Glaucoma – definição

O glaucoma é definido como um grupo de doenças que cursam com uma neuropatia óptica característica, associada ao desenvolvimento de defeitos progressivos no campo visual (1). A neuropatia óptica glaucomatosa tem origem multifatorial, causada pela interação entre fatores genéticos, ambientais e sistêmicos (2).

O glaucoma é a principal causa de cegueira irreversível no mundo (3), estimando-se ser responsável pela existência de 80 milhões de indivíduos cegos em 2020 (4) e 111,8 milhões em 2040 (3).

1.1.1. Glaucoma primário de ângulo aberto (GPAA)

O GPAA é o mais frequente entre os tipos de glaucoma (75-90%) (3–5). Trata-se de uma neuropatia óptica crônica, lentamente progressiva, multifatorial, usualmente bilateral, mas não necessariamente simétrica, caracterizada pelo aumento da escavação e atrofia do disco óptico, que resulta em defeitos no campo visual, pela presença de um ângulo camerular aberto, na ausência de outras causas de dano aos feixes de fibras nervosas (6). A pressão intraocular (PIO) elevada é o principal fator de risco associado ao GPAA (7).

A suscetibilidade individual ao GPAA está relacionada a vários fatores clínicos conhecidos como: PIO elevada, idade avançada, raça, espessura corneana fina, e uma história familiar positiva para a doença. Outros fatores provavelmente envolvidos no desenvolvimento do GPAA, mas que ainda carecem de comprovação definitiva, incluem: baixa histerese corneana, baixa pressão do fluido cérebro-espinhal, anormalidades dos axônios ou do metabolismo das células ganglionares, assim como distúrbios da matriz extracelular da lâmina cribrosa (6).

A evolução do GPAA possui, em geral, cinco estágios: 1) uma alteração ultraestrutural inicial da malha trabecular e do canal de Schlemm; 2) alterações no sistema de drenagem do humor aquoso; 3) elevação da PIO; 4) atrofia do nervo óptico;

e 5) perda progressiva do campo visual. A perda visual, avaliada pela perimetria computadorizada, apresenta, progressivamente, três formas clínicas: 1) defeitos localizados na área de Bjerrum ($\approx 25^\circ$ do campo visual a partir do ponto de fixação); 2) defeitos difusos (depressão difusa de sensibilidade, sem escotomas, correspondente à contração concêntrica das isópteras campimétricas; e 3) defeitos mistos, que incluem defeitos difusos sobrepondo-se aos escotomas localizados (8,9).

As manifestações clínicas do GPAA variam consideravelmente. Na maioria dos casos, o GPAA se desenvolve acima da quarta década de vida, e seu início é gradual e assintomático.

1.1.1.1 Fatores de risco para o GPAA

Os principais fatores de risco conhecidos para o GPAA são: 1) PIO elevada (10); 2) história familiar de GPAA (11); 3) etnia (12); 4) hemorragia do disco óptico (13); 5) idade (14); 6) baixa pressão de perfusão diastólica (15); e 7) miopia (16). Discorre-se, a seguir, sobre cada um dos sete fatores de risco citados anteriormente. Outros fatores como pressão arterial sistólica elevada, enxaqueca e diabetes mellitus, dentre outros, também são considerados fatores de risco para o GPAA, embora com menor nível de evidência (17).

1.1.1.1.1. PIO elevada

A PIO é o fator de risco mais relevante dentre os associados ao GPAA (18–20). Além disso, é o único sobre o qual se pode exercer ações terapêuticas eficazes (21). Ressalta-se, porém, que o GPAA pode ocorrer com ou sem PIO elevada, sendo possível uma forma menos comum, denominada glaucoma de pressão normal, mais comum em populações de etnia asiática (22).

Estudos populacionais demonstraram que o risco aumentado de desenvolvimento de GPAA está relacionado aos níveis basais da PIO, sendo que tal risco foi de 10% a 14% maior para cada 1 mmHg a mais da média da PIO basal (23–29).

1.1.1.1.2. História familiar de GPAA

Estudos demonstraram que parentes de primeiro grau de um indivíduo afetado por GPAA apresentam um risco aumentado de desenvolver glaucoma (30–32). Entretanto, histórias familiares negativas não excluem a possibilidade de herança familiar, devido ao significativo número de indivíduos de uma mesma família não-diagnosticados, assim como à dificuldade de obtenção de informação confiável (33). O padrão de herança familiar no GPAA é complexo, não sendo conhecidos todos os fatores influenciadores para a manifestação clínica da doença (34).

1.1.1.1.3. Etnia

A prevalência de GPAA é maior na população negra, em todas as faixas etárias (5,35,36). Além do suposto fator genético, outros fatores mais incidentes nesta classe racial como disco óptico relativamente maior, a hipertensão arterial, e a anemia podem promover uma maior isquemia na cabeça do nervo óptico (35) e, provavelmente, contribuir para a maior ocorrência desta doença em negros. Em uma metanálise contabilizando 2509 pacientes com GPAA, a prevalência média estimada nos indivíduos com mais de 70 anos de idade foi de 16% em populações negras, 6% nas populações brancas, 4,74% nas latinas, e 3% nas asiáticas (36,37).

A investigação da história familiar de glaucoma é relevante, especialmente quando se trata de parentesco de primeiro grau (1). Um parente de primeiro grau com diagnóstico de glaucoma apresenta um risco aumentado tanto para glaucoma primário de ângulo aberto, como glaucoma primário de ângulo fechado, segundo pesquisas de prevalência (1). Quando se trata de irmãos de indivíduos afetados, o risco de glaucoma primário de ângulo aberto é quase oito vezes maior, e cinco vezes maior para glaucoma primário de ângulo fechado quando comparados com irmãos de indivíduos não-afetados (1), sendo o risco entre irmãos maior que entre pais ou filhos (38,39).

1.1.1.1.4. Hemorragia no disco óptico

Vários estudos conduzidos na China, Japão, Índia, Austrália, Estados Unidos da América e Coreia, confirmaram que a presença de hemorragia do disco

óptico é um fator de risco significativo tanto para o desenvolvimento como para a progressão do GPAA (13,40-43). Hemorragias de disco óptico são fenômenos de natureza transitória que usualmente têm a duração de seis a 12 semanas (44). Há três teorias para se tentar explicar a patogênese das hemorragias de disco óptico: (a) a teoria mecânica, segundo a qual o estiramento vascular na cabeça do nervo óptico, devido ao deslocamento posterior da lâmina cribrosa, levaria à ruptura de pequenos vasos sanguíneos, causando hemorragias localizadas (44,45); (b) a teoria vascular, segundo a qual a desregulação vascular primária levaria à constrição arteriolar anômala e a dilatação venosa imprópria provocando microinfartos no interior da cabeça do nervo óptico (46); e (c) uma teoria alternativa mais recente que atribui à gliose proliferativa reativa a formação de tecido glial que causaria a disrupção dos capilares entre as fibras de células nervosas saudáveis e as danificadas (47).

1.1.1.1.5. Idade

O risco de GPAA aumenta com a idade (23,48,49). Embora as populações negras tenham a maior prevalência de GPAA em todas as faixas etárias, as populações brancas mostraram o aumento proporcional mais acentuado com o avançar da idade (36). Segundo Voogd e col. (50) a incidência de GPAA em pacientes com 55 anos ou mais foi de 1,8%, aumentando significativamente de 1,4% dos 55-59 anos, para 2,6% na faixa etária de 80 anos ou mais ($p < 0,001$). Rudnicka e col. (36) realizaram uma revisão sistemática que incluiu 103.567 participantes, dos quais 2509 eram portadores de GPAA provenientes de populações etnicamente distintas. Segundo esses autores, a prevalência média de GPAA aumentou em indivíduos acima de 70 anos de idade para 16% em populações negras, 6% em brancas, e 3% em asiáticas (36). Através de uma análise de meta-regressão de múltiplas variáveis, demonstrou-se que em populações brancas o *OR* de GPAA por década foi de 2,05 (IC95%: 1,91-2,18), indicando uma duplicação da prevalência de GPAA por década, enquanto nas populações negras o *OR* foi de 1,61 por década (IC95%: 1,53-1,70) e em populações asiáticas o *OR* foi de 1,57 por década (IC95%: 1,46 -1,68) (36).

1.1.1.1.6 Pressão de perfusão ocular

Costa e colaboradores conduziram uma extensa revisão concluindo que a pressão de perfusão ocular reduzida é um importante fator de risco para o desenvolvimento e progressão do glaucoma (51). Definida como a diferença entre a pressão arterial e a PIO, a pressão de perfusão ocular afeta diretamente o fluxo sanguíneo ocular e pode, uma vez reduzida, causar isquemia ao nervo óptico, aumentando a susceptibilidade à lesão glaucomatosa (51).

Vários estudos populacionais transversais demonstraram que a baixa pressão de perfusão ocular diastólica é um fator de risco independente para o desenvolvimento e progressão do GPAA (52-54).

1.1.1.1.7. Miopia

Diversos estudos demonstraram a maior prevalência de GPAA em olhos míopes (55,56). Mitchell e colaboradores (57) conduziram um estudo com 3654 participantes, onde uma correlação entre miopia e glaucoma foi confirmada. O GPAA foi detectado em 4,2% dos olhos com miopia baixa ($\geq -1,0$ D a $< -3,0$ D), e 4,4% dos olhos com miopia moderada a alta ($\geq -3,0$ D), comparados a 1,5% dos olhos sem miopia. A correlação entre miopia e GPAA foi mantida após o ajuste realizado para outros fatores de risco conhecidos para o glaucoma (por exemplo: história familiar de glaucoma, hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus, história de enxaqueca, uso de corticóides e presença de pseudoexfoliação) ($OR=2,3$; $IC\ 95\%=1,3-4,1$) (57). Alterações nas propriedades biomecânicas da lâmina cribrosa e da esclera (58,59) presentes nos alto míopes provavelmente explicam o aumento do gradiente de pressão translaminar entre os espaços intraocular e retrobulbar (60), influenciando a progressão do dano glaucomatoso.

1.2. Epidemiologia do GPAA

GPAA é uma doença ocular comum com uma prevalência global estimada de 3,05% (1,69–5,27%) em indivíduos no intervalo etário de 40–80 anos (3). Estima-se que aproximadamente 50% dos casos de GPAA não sejam adequadamente diagnosticados (50).

A prevalência de GPAA varia consideravelmente de acordo com a localização geográfica estudada, com relatos descrevendo valores de 2% a 3% na Austrália, 1% a 3% na Europa, 1% a 4% na Ásia, e 1% a 5% nos Estados Unidos (4,36,54,61-63). As maiores prevalências são encontradas em afrodescendentes. No *Baltimore Eye Survey*, foi demonstrada uma prevalência de glaucoma quatro vezes maior em afro-americanos do que em americanos brancos (64). De maneira similar, o *Barbados Eye Study* demonstrou uma alta prevalência de glaucoma na população afro-caribenha, de 7% em negros acima dos 40 anos, atingindo 12% da população negra acima dos 60 anos (65). Os dados epidemiológicos em países africanos são escassos (66), embora em países como Gana há relatos de altíssima incidência de GPAA, com aparecimento precoce, afetando aproximadamente 8% da população já a partir da terceira década de vida (67).

Em países da América Latina, a prevalência estimada de GPAA foi de 3,65% (1,90%-6,54%) (3), sendo alta a incidência de cegueira devido a estados terminais da neuropatia glaucomatosa, atingindo, por exemplo, a 13,7% e 21% dos indivíduos acometidos no Peru e Honduras, respectivamente (68,69). As estimativas atuais de prevalência de glaucoma entre indivíduos provenientes da América Latina que vivem nos Estados Unidos da América variam dependendo do estudo e da cidade correspondente (54,63), sugerindo uma influência geográfica/ambiental conjunta.

Há escassez de dados sobre a prevalência de GPAA na população brasileira. Sakata e colaboradores (70) relataram a prevalência de GPAA em 2,4% (IC 95%=1,7-3,2) da população estudada, composta por indivíduos acima de 40 anos. Indivíduos não-brancos tiveram maior prevalência de GPAA do que participantes brancos, embora esta diferença não tenha sido estatisticamente significativa (3,8% vs 2,1% respectivamente, $p=0.11$) (70). Urbano e colaboradores (71) descreveram prevalência de 56,2% de GPAA dentre pacientes (suspeitos de glaucoma e com glaucoma diagnosticado) referenciados ao Setor de Glaucoma da Unicamp. O GPAA foi o mais frequente dentre todos os tipos de glaucoma diagnosticados naquela amostra da população brasileira. O segundo tipo mais frequente foi o glaucoma primário de ângulo fechado, com 20,4% dos indivíduos afetados (71).

1.3. A patogênese do glaucoma

O glaucoma é uma neuropatia óptica progressiva caracterizada por uma degeneração lenta das células ganglionares da retina (CGR) (72). No glaucoma, a largura da rima neuroretiniana diminui com o aumento concomitante da escavação do disco óptico, fenômeno raramente visto em neuropatias ópticas não-glaucomatosas (73). Embora a fisiopatologia da neurodegeneração glaucomatosa ainda não seja completamente elucidada, há diversos processos patológicos potencialmente envolvidos, como o estresse mecânico e oxidativo, a disfunção da autorregulação do fluxo sanguíneo no nervo óptico, a hipóxia, o funcionamento irregular das bombas celulares, a alteração no sistema de transportadores de glutamato, a deficiência de neurotrofinas e a imunidade aberrante (73).

O evento fisiopatológico primordial no glaucoma é a degeneração primária das CGRs e de suas projeções axonais (74,75). Porém, a morte neuronal ocorrida no glaucoma não é limitada ao complexo de CGRs (76), mas também estende-se ao cérebro nos neurônios do núcleo geniculado lateral (77-79) e no córtex visual (79,80). Os resultados de estudos funcionais (testes psicofísicos) (81) e histológicos (77,79) sugerem que o processo patológico glaucomatoso acomete todos os subtipos de CGRs. Células gliais também são afetadas e é possível que os astrócitos, talvez ativados pela elevação da PIO, alterem o microambiente dos axônios e produzam o meio propício para provocar a degeneração axonal, ou ainda impedir a sobrevivência das CGRs saudáveis (82,83).

No glaucoma, alterações ultraestruturais na malha trabecular, além do aumento de sua rigidez tecidual, provocam resistência ao fluxo de drenagem do humor aquoso (9), sendo esta a principal causa de aumento da PIO (73). Quando a PIO aumenta acima de níveis fisiológicos, o gradiente pressórico através da lâmina cribrosa também se eleva, o que promove a deformação e o estresse mecânico desta região, por onde passam os axônios das CGRs (84). O remodelamento morfológico da lâmina cribrosa compromete a integridade dos axônios das CGRs que a atravessam (85), causando interrupção do fluxo axoplasmático e apoptose dessas células (86,87). Deste processo resulta o afinamento do tecido pré-laminar e o deslocamento posterior da sua inserção escleral, com conseqüente alargamento e ampliação da profundidade da escavação da cabeça do nervo óptico (82,85,88).

As partes superior e inferior da lâmina cribrosa, no nível da esclera, contêm poros mais largos e com tecido conectivo de suporte mais frágil para a passagem dos feixes de fibras nervosas. Por isso, os axônios das CGRs que passam nessas regiões são mais susceptíveis à lesão, explicando o formato verticalizado da escavação e, conseqüentemente, o padrão característico de comprometimento do campo visual em portadores de glaucoma (88).

Independente ou adicionalmente à PIO, outros fatores podem, individual ou conjuntamente, contribuir para a morte das CGR e das fibras do nervo óptico no glaucoma (73). A retina é dependente de suprimento sanguíneo constante para atender à sua alta necessidade metabólica, e o estado de isquemia/hipóxia local pode ser devido à deficiência da autorregulação do fluxo sanguíneo, um dos fatores implicados no dano às CGR (89).

As neurotrofinas exercem um papel fundamental na sobrevivência celular neuronal. A compressão dos axônios das CGRs pode prejudicar o transporte de fator trófico neuronal, causando a morte celular por insuficiência trófica (90,91). Em condições fisiológicas, as CGRs recebem o fornecimento de neurotrofinas das células de Müller ou através do transporte axonal retrógrado diretamente do cérebro (92,93). As neurotrofinas são responsáveis pela regulação do crescimento, funcionamento e sobrevivência neuronal (75). No glaucoma, devido à PIO elevada, o transporte retrógrado é bloqueado na região da cabeça do nervo óptico e as CGRs não recebem adequadamente o fator neurotrófico derivado cerebral (*brain derived neurotrophic factor (BDNF)* e o *tropomyosin receptor kinase B (TrkB)* para sua sobrevivência (94,95). Esta privação causa uma alteração no transporte axoplasmático de neurotrofinas dos neurônios-alvo no núcleo geniculado lateral e no colículo superior no cérebro (96).

A PIO elevada é considerada o maior fator de risco para o desenvolvimento da neuropatia glaucomatosa, porém, outros fatores provavelmente também estão envolvidos, como: imunidade alterada, deficiências microcirculatórias, estresse oxidativo, e excitotoxicidade celular por citocinas inflamatórias, óxido nítrico e glutamato (73).

A Figura 1 resume a fisiopatogenia do glaucoma, provavelmente envolvendo tanto uma axônioptia evolutiva, como também componentes de uma degeneração Walleriana (97-99).

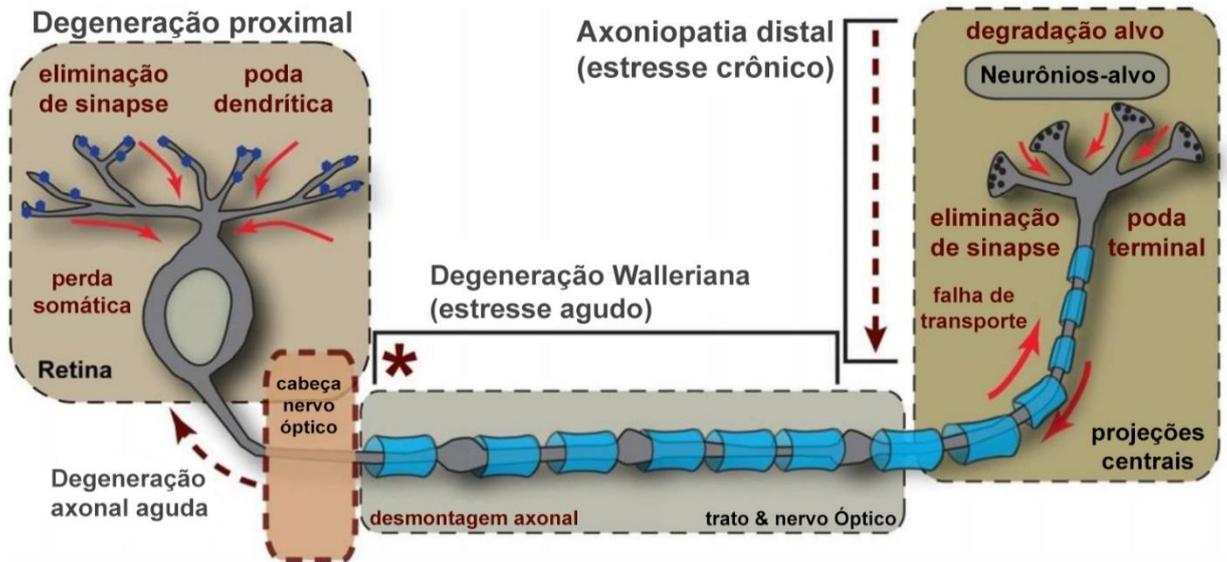


Figura 1 - Principais eventos patogênicos envolvidos na progressão neurodegenerativa do glaucoma

Os eventos que definem a degeneração do CCG da retina no glaucoma abrangem quatro regiões críticas: retina, cabeça do nervo óptico, nervo óptico, trato óptico, e projeção central para o cérebro. O estresse patológico originado na cabeça do nervo (marcado por * na figura) induz uma axiopatía distal, incluindo falha de transporte intra-axonal e subsequente perda de zonas ativas pré-sinápticas de CGRs e terminais de axônios em áreas de projeção central, seguido por processo degenerativo dos neurônios-alvo. As características patogênicas seguem de uma progressão distal para proximal, padrão também conhecido em outras neuropatias denominadas “*dying back*”. No nervo óptico e no trato óptico, a degeneração dos axônios das CGRs mielinizadas (indicado por bainhas de oligodendrócitos azuis) abrange tanto características de axiopatía distal como de degeneração Walleriana. A adicional “desmontagem” axonal aguda começa distalmente à cabeça do nervo óptico. A degeneração proximal é marcada pela eliminação de sinapses para as CGRs, poda dendrítica e pelo eventual fenômeno denominado “abandono somático na retina”. Em alguns modelos, a retração do segmento não-mielinizado da cabeça do nervo óptico pode surgir da degeneração aguda do axônio.

Fonte: Reproduzido de Calkins e col. (74); sob licença da Editora Elsevier nº 4980740075923

1.4. Genética e GPAA

É consenso que o GPAA tem uma significativa herdabilidade (100), e pode afetar indivíduos de todas as idades. Os casos de GPAA de aparecimento precoce tipicamente são transmitidos por meio de herança mendeliana autossômica dominante, enquanto os de início tardio manifestam-se a partir da quarta década de vida e se apresentam como traços geneticamente complexos (101). A base genética desses traços complexos não demonstra padrões de herança definidos (102).

As mutações em genes associados ao GPAA de aparecimento precoce são raras e têm um expressivo impacto biológico, enquanto as variantes genéticas envolvidas nas formas de glaucoma mais tardias promovem efeitos somatórios na

patogênese da doença, embora isoladamente não sejam promotoras da mesma (Figura 2).

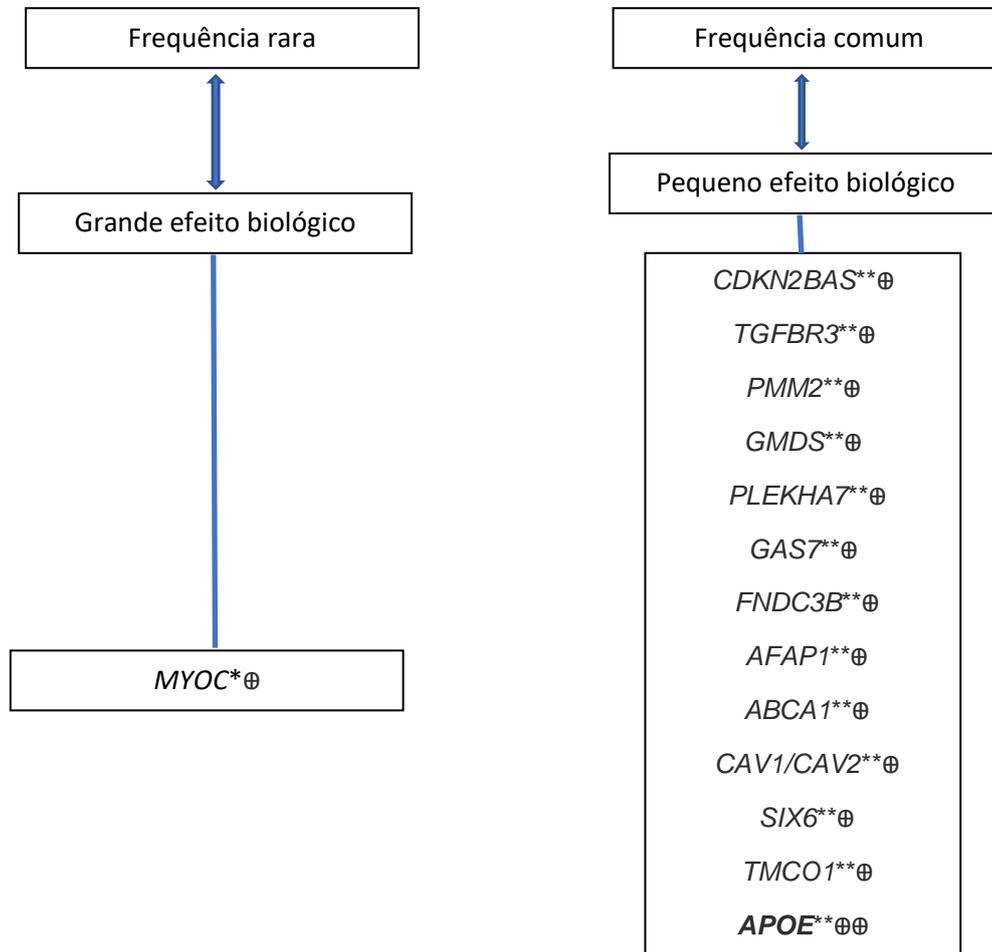


Figura 2 - Frequência e tamanho do efeito de variantes genéticas no GPAA

*Mutação rara.

**geralmente variante relativamente comum; ⊕ efeito demonstrado; ⊕⊕ efeito provável a ser comprovado.

Mutações em genes causadores de formas mendelianas de GPAA, são de início precoce e raras, mas produzem grandes efeitos biológicos. Variantes genéticas influenciando a suscetibilidade ao GPAA de início na idade adulta, possuem herança complexa, são relativamente comuns e, individualmente, exercem discretos efeitos biológicos.

Fonte: Modificado de Wiggs (103)

A análise de ligação genética (*Genetic linkage analysis*) é um método utilizado para localizar regiões cromossômicas que estão associadas a um fenótipo específico dentro de grupos familiares relacionados. É utilizada para investigação genética de herança mendeliana, ou para procurar por características genéticas com alta herdabilidade que são normalmente causadas por mutações em um único gene.

Dentre os genes associados ao GPAA estão: *MYOC*, *OPTN*, *TBK1*, *WD repeat domain 36 (WDR36)*, *IL20RB*, *ASB10* e *EFEMP1* (104).

Enquanto uma mutação em um desses genes pode ter um grande efeito no desenvolvimento do GPAA em algumas famílias, coletivamente mutações nesses genes contribuem para apenas cerca de 6% dos casos de GPAA na população geral (105-107). Recentemente, estudos em famílias portadoras de GPAA identificaram a ligação TANK-quinase 1 (*TBK1*) como outra causa de GPAA de herança mendeliana (108). Ao invés de uma mutação na sequência do gene, é a duplicação do mesmo e o aumento resultante de sua função que parecem ser a causa do processo glaucomatoso.

Inúmeros estudos de associação e do tipo caso-controle identificaram *loci* onde variantes são atribuídas como fatores de risco para o GPAA. Estudos de associação de amplitude genômica (GWAS) complementaram estas investigações, buscando identificar variantes comuns (com a frequência acima de 5% na população geral, associada à doença) (109).

Os genes identificados por GWAS até hoje, associados a um maior risco de desenvolvimento do GPAA incluem: *CAV1*, *SIX6*, *ABCA1*, *OPTN*, *TXNRD2*, *WDR36*, *CDKN2B-AS1*, *TMC01*, *FOXC1*, *GMDS*, *AFAP1*, *TXNRD2*, *GAS7*, e *ATXN2* e *TGFBR3* (104,110-120). Muitas das associações desses genes com GPAA em diversas populações de diferentes etnias, além de outros GWAS demonstraram 28 novas variantes associadas ao glaucoma (Quadro 1).

Quadro 1 – SNPs associados com GPAA descobertos por meio de GWAS

| Gene | Single Nucleotide Polymorphism (SNP) | OR | Etnia | Referência |
|----------------------------------|--------------------------------------|------|----------|-----------------------|
| <i>MECOM</i> | rs73174345 | 0.84 | Europeia | MacGregor e col.(121) |
| <i>ANGPT1</i> | rs10505100 | 0.84 | Europeia | MacGregor e col.(121) |
| <i>THSD7A</i> | rs12699251 | 0.90 | Europeia | MacGregor e col.(121) |
| <i>LOC107986141-LOC107986142</i> | rs11710139 | 0.90 | Europeia | MacGregor e col.(121) |
| <i>CADM2</i> | rs9284802 | 0.90 | Europeia | MacGregor e col.(121) |
| <i>ANKH</i> | rs61394862 | 0.90 | Europeia | MacGregor e col.(121) |
| <i>BICC1</i> | rs4141671 | 0.91 | Europeia | MacGregor e col.(121) |
| <i>ETS1</i> | rs7924522 | 1.09 | Europeia | MacGregor e col.(121) |
| <i>CTTNBP2-CFTR</i> | rs1013278 | 1.09 | Europeia | MacGregor e col.(121) |
| <i>EXOC2</i> | rs2073006 | 1.14 | Europeia | MacGregor e col.(121) |

(Cont.)

(Cont.)

| | | | | |
|----------------------------------|-------------|------|------------------------------------|---------------------------|
| <i>LOC101929614-LOC105378153</i> | rs2935057 | 1.15 | Europeia | MacGregor e col.(121) |
| <i>EXOC4</i> | rs141186647 | 0.90 | Africana | Bonnemaijer et col. (113) |
| <i>MEIS2</i> | rs28480457 | 1.14 | Japonesa | Shiga et col. (122) |
| <i>HMGA2</i> | rs343093 | 1.11 | Japonesa | Shiga et col. (122) |
| <i>LMX1B</i> | rs10819187 | 1.21 | Japonesa, leste asiático, europeia | Shiga et col. (122) |
| <i>ANKRD55-MAP3K1</i> | rs61275591 | 1.13 | Japonesa, europeia | Shiga et col. (122) |
| <i>LOXL1</i> | rs1048661 | 1.13 | Japonesa, europeia | Shiga et col. (122) |
| <i>FNDC3E</i> | rs7636836 | 1.12 | Japonesa, leste asiático, europeia | Shiga et col. (122) |
| <i>LHPF</i> | rs12262706 | 1.11 | Japonesa, leste asiático | Shiga et col. (122) |
| <i>EXOC2</i> | rs2073006 | 0.86 | Multiétnica | Choquet et col. (116) |
| <i>LMX1B</i> | rs55770306 | 0.87 | Multiétnica | Choquet et col. (116) |
| <i>FMNL2</i> | rs56117902 | 0.91 | Multiétnica | Choquet et col. (116) |
| <i>TMTC2-SLC6A15</i> | rs324794 | 1.08 | Multiétnica | Choquet et col. (116) |
| <i>DGKG</i> | rs9853115 | 1.10 | Multiétnica | Choquet et col. (116) |
| <i>CADM2</i> | rs34201102 | 1.11 | Multiétnica | Choquet et col. (116) |
| <i>PDE7B</i> | rs9494457 | 1.12 | Multiétnica | Choquet et col. (116) |
| <i>ANKH</i> | rs76325372 | 1.12 | Multiétnica | Choquet et col. (116) |
| <i>IKZF2</i> | rs56335522 | 1.19 | Multiétnica | Choquet et col. (116) |

*Todos os *loci* demonstraram significância de amplitude genômica em sua descoberta ($p < 5,00E-08$), além de significância nominal em sua descoberta E na metanálise de replicação ($p < 0,05$). Os valores de razão de probabilidade (*OR*) foram retirados das metanálises de descoberta + replicação.

Fonte: Adaptado de Youngblood e col. (123)

Muitos GWAS, especialmente os mais antigos, foram realizados em amostras de populações asiáticas e europeias, limitando a contribuição para explicar a patogênese do GPAA em outras populações onde esta doença é mais prevalente (113). Somente mais recentemente houve um aumento do número de GWAS em populações afro-americanas e populações multiétnicas (124). Como exemplo tem-se os GERA (*Genetic Epidemiology Research in Adult Health and Aging*) – um GWAS realizado com populações de ancestralidade africana, asiática, hispânica e europeia não-hispânica, que pôde identificar cinco novas variantes que se mostraram associadas ao GPAA (116), sendo três destas replicadas no consórcio estabelecido com a coorte do UK Biobank ($p < 0.05$) (116). Outro estudo recente foi o *African Descent and Glaucoma Evaluation Study (ADAGES) III*, que identificou um novo *locus* (rs185815146) no gene ENO4 como sendo significativamente associado a formas

avançadas do GPAA, em indivíduos de ascendência africana (124). No Brasil, nosso grupo já conduziu diversos estudos investigando variantes em genes previamente identificados como associados ao desenvolvimento do glaucoma (125-128), e inicia agora um estudo multicêntrico tipo GWAS em brasileiros.

No entanto, mesmo com vários estudos (129-131) demonstrando a existência de muitos elementos genéticos contributivos para o glaucoma, mais de 90% dos GPAA permanecem geneticamente não explicados (102,104,132).

Outras variantes genéticas têm sido aventadas como possivelmente associadas ao desenvolvimento do GPAA em determinados grupos étnicos (133), incluindo o gene APOLIPOPROTEÍNA E (*APOE*) (134), objeto desta tese.

1.4.1. A participação genética e os mecanismos biológicos envolvidos no glaucoma

A exata participação dos genes acima descritos no processo fisiopatológico do glaucoma ainda não é totalmente conhecida, embora já seja possível constatar a sua participação em uma ampla gama de processos celulares e sistemas biológicos. Aproximadamente metade dos genes relacionados ao glaucoma até hoje descobertos exercem sua função biológica na matriz extracelular, embora já tenham sido identificadas proteínas codificadas por outros genes que atuam em vários outros sistemas (103), como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1 - Sistemas biológicos, genes e proteínas codificadas envolvidos no glaucoma hereditário

| Sistema ou processo biológico | Gene envolvido | Proteína codificada | Referências |
|---|----------------|--|------------------------------|
| Metabolismo lipídico | ABCA1 | <i>ATP-binding cassette, subfamily A(ABC1) member1</i> | Van Eck (135) Oram (136) |
| | APOE | Apolipoprotein-E | *** |
| Estresse no retículo endoplasmático; efeito = proteína não-desdobrada | MYOC | <i>Myocilin</i> | Zode (136) Zode (136) |
| Pressão do LCR | 8q22 | não disponível | Wiggs (112) |
| Regulação do desenvolvimento ocular | FOXC1 | <i>Forkhead box C1</i> | Saleem (139) Murphy (140) |
| | PITX2 | <i>Paired-like homeodomain 2</i> | Ephrussi (141) Gage (142) |

(Cont.)

(Cont.)

| | | | |
|--|------------------|--|---|
| | PAX6 | <i>Paired box 6</i> | Nishina (143) |
| | CYP1B1 | <i>Cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1</i> | Tsuchiya (144) Choudhary (145) |
| | LTBP2 | <i>Latent TGF-binding protein 2</i> | Inoue (146) |
| | SIX6 | <i>SIX homeobox 6</i> | Jusiak (147) Anderson (148) |
| Regulação da divisão celular | GAS7 | <i>Growth arrest-specific 7</i> | Schneider; Ju; You; Chao; e Hung (149–153) |
| | TMCO1 | <i>Transmembrane and coiled-coil domains-1</i> | Sharma (154) |
| | CDKN2BAS | <i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B antisense</i> | Pasmant; Jarinova; Harismendy (155–157) |
| Metabolismo da Frutose e manose | GMDS | <i>GDP-manose 4.6 desidratase</i> | Barone (158) Freeze (159) |
| | PMM2 | <i>Phosphomannomutase</i> | Freeze (159) Chen (115) |
| Sinalização eNOS e Caveolae | CAV1/CAV2 | <i>Caveolins 1 and 2</i> | Shvets (160) Trane (161) |
| Regulação da autofagia | OPTN | <i>Optineurin</i> | Shen (162) |
| | TBK1 | <i>Tank-binding kinase 1</i> | Galluzzi (163) |
| Sinalização TNF- α | OPTN | <i>Optineurin</i> | Sudhakar (164) Nagabhushana (165) |
| | TBK1 | <i>Tank-binding kinase 1</i> | Morton (166) Fingert (108) |
| Sinalização TNF- β | CDKN2BAS | <i>Cyclin-dependent kinase Inhibitor 2B antisense</i> | Pasmant; Jarinova; e Harismendy (155–157) |
| | TGFBR3 | <i>TGFbeta receptor 3</i> | Li (167) Khor (168) |
| Matriz extracelular, junções celulares, e adesão celular | LTBP2 | <i>Latent TGF-binding protein 2</i> | Kuchtey; Hyttiäinen Vehviläimen; Sideek (169–172) |
| | LOXL1 | <i>Lysyl oxidase like 1</i> | Liu (173) |
| | FNDC3B | <i>Fibronectin type III domain containing 3B</i> | Cai (174) |
| | AFAP1 | <i>Actin filament-associated protein 1</i> | Gharahkhani (118) |

(Cont.)

(Cont.)

| | | |
|----------------|--|---|
| PLEKHA7 | <i>Pleckstrin homology domain-containing protein 7</i> | Paschoud (175) |
| COL11A1 | <i>Collagen type XI, alpha 1</i> | Vithana (176) Richards (177) |
| COL15A1 | <i>Collagen type XV, alpha 1</i> | Liton; Hurskainen Ylikärppä (178–180) |
| COL18A1 | <i>Collagen type XVIII, alpha 1</i> | Liton; Hurskainen Ylikärppä (178–180) |

*** comprovação da via biológica do *APOE* no glaucoma ainda não estabelecida.
Fonte: Modificado de Wiggs JL (103)

Sugere-se que cada gene associado ao glaucoma de início precoce ou contributivo para o glaucoma de desenvolvimento tardio atue em diferentes processos celulares ou sistemas biológicos, que são impactados pelo efeito patológico da respectiva proteína ativa produzida.

1.5. O gene *APOE* e a proteína *APOE*¹

O gene *APOE* está localizado no cromossomo 19q13.2, sendo constituído por 4 exons. O gene *APOE* e seu ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) contêm, respectivamente, 3597 e 1163 nucleotídeos (181).

A apolipoproteína E (*APOE*) é uma glicoproteína plasmática de 34kDa, produzida pelo gene *APOE*, que contém 299 aminoácidos, e exerce um papel fundamental no metabolismo lipídico. As variantes genéticas que dão origem às isoformas da *APOE* são o rs429358 para o códon 112 e o rs7412 para o códon 158 (182).

A *APOE* atua primordialmente como reguladora dos níveis lipídicos plasmáticos e como ligante para receptores de lipoproteína de baixa-densidade (LDL) (182,183). A *APOE* funciona como um regulador-chave dos níveis de lipídios no plasma, como exemplificado em estudos utilizando camundongos e humanos sem a *APOE*, que apresentam níveis de colesterol muito elevados (184). A função anti-aterogênia da *APOE* é em grande parte resultado de sua função redutora dos níveis

¹ A sigla *APOE*, em grafia itálica, refere-se ao gene *APOE*; enquanto a denominação *APOE*, em caracteres normais, refere-se à proteína *APOE*.

de colesterol plasmático, promovendo a retirada de lipoproteínas ricas em triglicerídeos da circulação (185,186).

As variantes comuns de APOE foram descobertas há aproximadamente 40 anos, e sua presença foi confirmada no final da década de 1970 em vários estudos (187–193). Zannis e col. (194) demonstraram que as três isoformas da APOE são geneticamente determinadas, e sugeriram, inicialmente, que a sua nomenclatura fosse feita pela letra grega ϵ . Assim, as três proteínas pertencentes à classe β (β -II, β III e β -IV) correspondem à homozigose de três variantes genéticas idênticas do gene *APOE*, ao passo que as três proteínas da classe α (α -II, α -III e α -IV) representam heterozigose para as outras três variantes. Um estudo posterior sugeriu que E2, E3 e E4 fossem utilizados como nomenclatura para a identificação das isoformas proteicas da APOE (195).

As três isoformas da APOE humana são codificadas a partir de três alelos *APOE*-E2, *APOE*-E3 e *APOE*-E4 em um único *locus* do gene *APOE*, localizado no cromossomo 19 (19q13.2) (196). As três isoformas proteicas são o resultado de dois polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) rs429358 (C³⁹³⁷→T) e rs7412 (C⁴⁰⁷⁵→T), localizados no exon 4 do gene *APOE* (Genbank: AF261279)² (197). Em uma análise purista, as variantes *APOE*-E2, *APOE*-E3 e *APOE*-E4, comumente denominadas “alelos” na literatura, são na realidade haplótipos gerados pelas diferentes combinações possíveis dos dois SNPs no *locus* do *APOE* (198,199). Assim, o haplótipo T³⁹³⁷-T⁴⁰⁷⁵ gera a variante (“alelo”) E2, o haplótipo T³⁹³⁷-C⁴⁰⁷⁵ gera a variante (“alelo”) E3, e o haplótipo C³⁹³⁷-C⁴⁰⁷⁵ gera a variante (“alelo”) E4 (196). (Quadro 2)

Quadro 2 - As três variantes comuns do gene *APOE*, definidas pelos SNPs rs429358 e rs7412 são conhecidas como alelos *APOE*-E2, *APOE*-E3 e *APOE*-E4

| <u>rs429358</u> | <u>rs7412</u> | Denominação |
|-----------------|---------------|-------------|
| T | T | E2 |
| T | C | E3 |
| C | C | E4 |

Fonte: Seripa et al. (196)

Os nucleotídeos 3937 e o 4075 correspondem às primeiras bases dos dois códons CGC, que codificam a arginina (Arg). Cada transição C para T muda a primeira base desses códons CGC, resultando em códons TGC, que codificam a cisteína (Cys).

² <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/AF261279>

Assim, o alelo *E2* (T³⁹³⁷-T⁴⁰⁷⁵) codifica a isoforma *E2* (Cys¹¹²-Cys¹⁵⁸), enquanto o alelo *E3* (T³⁹³⁷- C⁴⁰⁷⁵) codifica a isoforma *E3* (Cys¹¹²-Arg¹⁵⁸), e o alelo *E4* (C³⁹³⁷-C⁴⁰⁷⁵) codifica a isoforma *E4* (Arg¹¹²-Arg¹⁵⁸) (196). A Figura 3 mostra a estrutura e características do gene *APOE*, e a Tabela 2 mostra os três haplótipos possíveis com as correspondentes combinações de resíduos de aminoácidos associadas para cada alelo *APOE*.

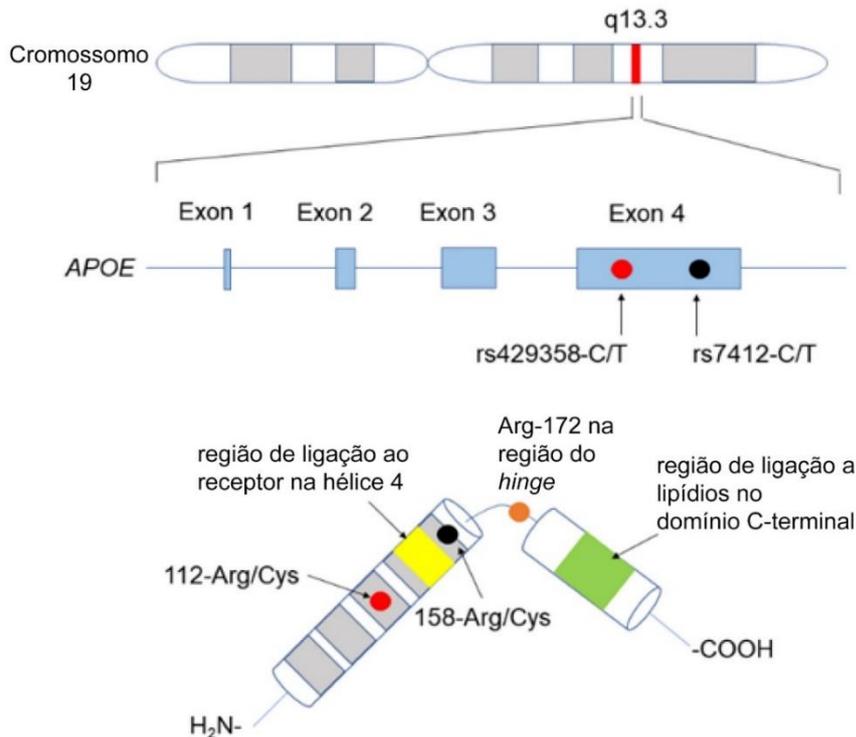


Figura 3 - Polimorfismos subjacentes às três principais variantes do *APOE* em humanos.

Localização do cromossomo 19, estrutura do gene, identificação das regiões de mutação no gene, e os resíduos variantes correspondentes no contexto da estrutura da proteína. Em amarelo, está a região de ligação ao receptor na hélice 4 e, em verde, a região de ligação de lipídios no domínio *C-terminal*. Os pontos vermelhos e pretos indicam as variantes genéticas no *APOE* e sua posição nas sequências genômica e proteica, respectivamente.

Fonte: Reproduzido de Abondio e col. (200); licença autorizada - modalidade *Open-Access*.

Tabela 2 - Haplótipos e combinações de resíduos correspondentes associadas a cada alelo *APOE*

| Alelo | <i>APOE-E2</i> | <i>APOE-E3</i> | <i>APOE-E4</i> |
|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Haplótipo | rs429358-T rs7412-T | rs429358-T rs7412-C | rs429358-C rs7412-C |
| Combinação de resíduos | 112-Cys 158-Cys | 112-Cys 158-Arg | 112-Arg 158-Arg |

Fonte: Reproduzido de Abondio e col. (200); licença autorizada - modalidade *Open-Access*.

Há um quarto haplótipo extremamente raro denominado E3r (C³⁹³⁷- T⁴⁰⁷⁵), que codifica a isoforma proteica E3r (Arg¹¹²-Cys¹⁵⁸), identificado exclusivamente em duas famílias italianas e em uma família nigeriana até hoje (196,201,202). Embora a base teórica da existência deste quarto alelo esteja em concordância com a hipótese evolutiva, geralmente aceita para as variantes do gene *APOE*, o papel fisiológico desta raríssima forma E3r ainda precisa ser esclarecido (196).

Pelo fato do *locus* do gene *APOE* ser polimórfico, seis genótipos são possíveis, formados pelas combinações dos três alelos: três homozigotos (*APOE*-E2-E2, *APOE*-E3-E3 e *APOE*-E4-E4); e três heterozigotos (*APOE*-E2-E3, *APOE*-E2-E4 e *APOE*-E3-E4) (189,194, 203).

1.5.1. A frequência mundial e brasileira das variantes do gene *APOE*

Segundo estudos conduzidos por Farrer (204) e Mahley (203), as médias da frequência mundial dos alelos E2, E3 e E4 do gene *APOE* foram, respectivamente, de 8,4%, 77,9% e 13,7%. Singh e col. (205) e Eisenberg e col. (206) confirmaram a proporcionalidade da distribuição mundial da frequência dos alelos *APOE* com médias muito próximas aos estudos anteriormente publicados, como mostra a Tabela 3. No entanto, as frequências dos alelos e genótipos diferem entre populações distintas (200, 205, 207, 208), como demonstra a Figura 4.

Tabela 3 - Estatística descritiva da frequência mundial dos alelos do gene *APOE*

| Alelo | n populações* | Média da frequência ± desvio padrão | Mín. | Máx. |
|-------------------|---------------|--|------|------|
| <i>APOE</i> -E2** | 225 | 6,4±5,1 | 0,0 | 37,5 |
| <i>APOE</i> -E3** | 225 | 78,3±12,1 | 8,5 | 98,0 |
| <i>APOE</i> -E4** | 268 | 14,5±8,5 | 0,0 | 49,0 |

*número de populações, não de indivíduos

**Frequência alélica (%)

Fonte: Modificado de Eisenberg e col. (206)

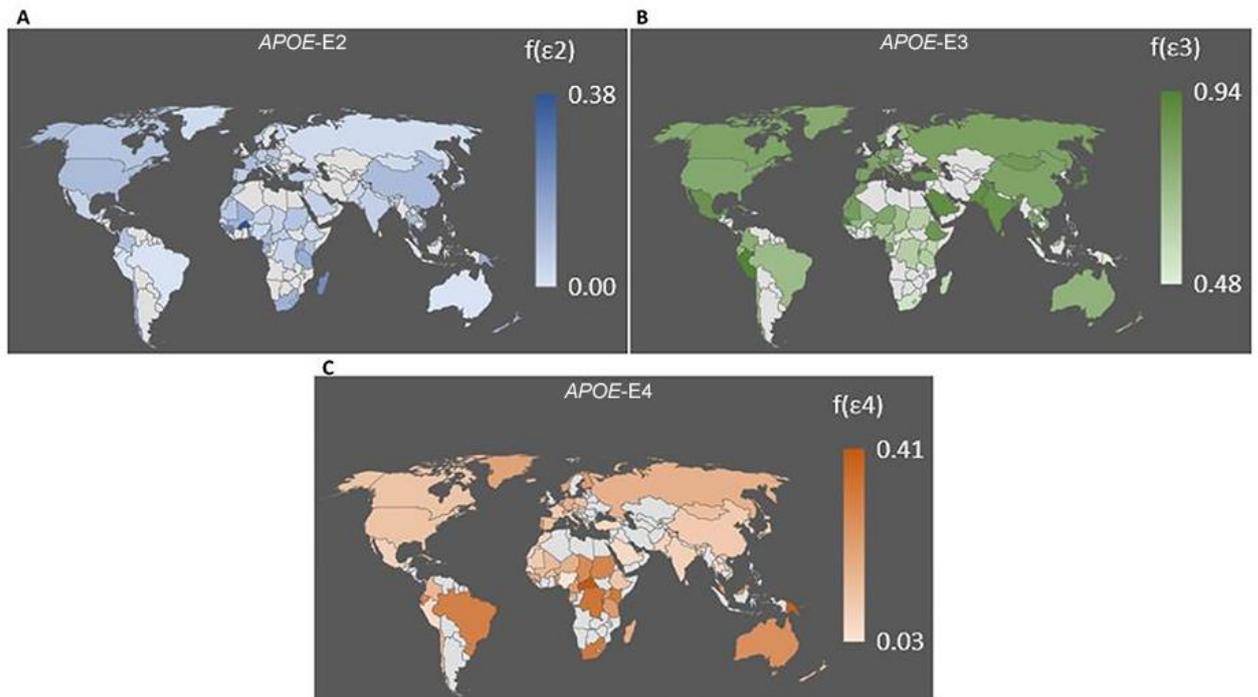


Figura 4 - Distribuição da frequência dos alelos *APOE* em 82 países

Fonte: Dados obtidos do *1000 Genome Project*³ integrados com os publicados por Singh e col. (205) - A) Frequência da variante *APOE*-E2; B) Frequência da variante *APOE*-E3; C) Frequência da variante *APOE*-E4.

Fonte: Reproduzido de Abondio e col. (200); licença autorizada - modalidade *Open-Access*

As publicações brasileiras sobre a frequência alélica do *APOE* (209–211) são concordantes com os intervalos de distribuição alélica mundial acima citada (200), com exceção do estudo de Alvim e col. realizado na cidade de Vitória – ES (210). Nesse estudo, os dados encontrados diferiram dos estudos brasileiros e estrangeiros até hoje publicados (*APOE*-E2, 0,3% acima do limite superior do intervalo de frequência mundial (0-12%); *APOE*-E3, 13,9% abaixo do limite inferior do intervalo de frequência mundial (75-80%); e o *APOE*-E4, 6,6% acima do limite superior do intervalo de frequência mundial (6-20%) (205,212-214).

1.5.2. A evolução da *APOE*

O gene *APOE* é considerado como parte de uma família de sete genes com origem evolucionária comum, geradores de apolipoproteínas (*APO*-E, *APO*-C-I, *APO*-C-II, *APO*-C-III, *APO*-A-I, *APO*-A-II e *APO*-A-IV), cuja função é permitir um controle metabólico adequado das lipoproteínas (215). A *APOE* permite a eliminação eficaz dos produtos remanescentes de lipoproteínas ricas em triglicerídeos, mas também

³ <https://www.internationalgenome.org/>

pode criar lipoproteínas para transportar lipídios entre as células, principalmente no sistema nervoso central (182). A APOE humana difere da APOE de outros mamíferos, inclusive primatas não-humanos, provavelmente devido às mutações ocorridas no decorrer de milênios (216).

Mahley e col. (203,217) sugerem que, embora a APOE3 seja usualmente a forma mais comum desta proteína em humanos, a isoforma APOE4 pode ser a real forma selvagem ancestral. Finch e Sapolsky (218) discutiram a complexidade evolucionária dos polimorfismos do gene *APOE*, segundo os quais exclusivamente o alelo E3 humano evoluiu do E4 dos seus ancestrais primatas, enquanto todos os outros primatas não-humanos, ainda hoje, são portadores do alelo E4 (216).

Em busca de um melhor entendimento dos dois elementos teóricos para conceber-se esta hipótese evolucionária relativamente à fisiologia do sistema nervoso central, atribui-se uma vantagem aos portadores do alelo *APOE-E3*, comparativamente aos portadores do alelo *APOE-E4*, devido às características neuronais deletérias relacionadas aos portadores desse último alelo. Um comprometimento da expressão do alelo *APOE-E4* e/ou das propriedades funcionais da proteína E4 pode(m) estar relacionado(s) às aberrações do reparo neuronal ocorridas na doença de Alzheimer e, portanto, poderia(m) explicar o efeito do polimorfismo do *APOE* no início e desenvolvimento desta doença em nível celular (219). Por sua vez, a presença do alelo *APOE-E4* está associada a uma maior quantidade de emaranhados neurofibrilares, que são um dos principais elementos que promovem a disfunção neuronal, em doença de Alzheimer de aparecimento precoce em jovens adultos (220-222). Sen e col. (223) demonstraram, experimentalmente, que a isoforma proteica APOE3, mas não a APOE4, previne a perda de redes sinápticas produzidas pelos oligômeros amiloide- β (amiloesferóides), confirmando sua atuação na manutenção da integridade sináptica (223). Além disso, os portadores do alelo *APOE-E3* produzem menor quantidade de proteína amiloide-beta que os portadores do alelo *APOE-E4* (224).

O fenômeno conhecido como “*grandmothering*” permitiu vantagens através do fenômeno de seleção natural, devido ao aumento do período pós-menopausa, que diferencia as mulheres humanas de outros primatas (225). A partilha do alimento mãe-filho ocorre entre muitos primatas, mas apenas mães humanas fornecem uma fração substancial de sua dieta para suas crianças após o desmame (226). Crianças pequenas não podem conseguir alimentos e recursos para sua sobrevivência de

forma eficiente (227,228), mas suas mães têm capacidade para consegui-los e, inclusive, sustentar mais de uma criança simultaneamente. Por sua vez, mulheres pós-menopausa continuam por um longo período com a mesma capacidade de obtenção de recursos para sua sobrevivência (227), mas, sem filhos pequenos para cuidar, elas ajudam a alimentar a prole de suas filhas (229). De acordo com Finch e Sapolsky (218), o fenômeno de “*grandmothering*” e o alelo *APOE-E3* evoluíram simultaneamente, no decorrer dos últimos 10.000 anos (216), permitindo que nas famílias portadoras de *APOE-E3* haja uma maior sobrevivência familiar.

1.5.3. Uma visão geral da APOE e suas funções

A APOE é produzida pelo fígado, cérebro, pulmões, baço, rins, tecidos musculares e em outros órgãos. As células do parênquima hepático produzem 2/3 a 3/4 da APOE presente no plasma (203). No sistema nervoso central, o RNAm da APOE está presente na micróglia, nos astrócitos, células de Schwann e neurônios (230). A biossíntese da APOE está representada na Figura 5.

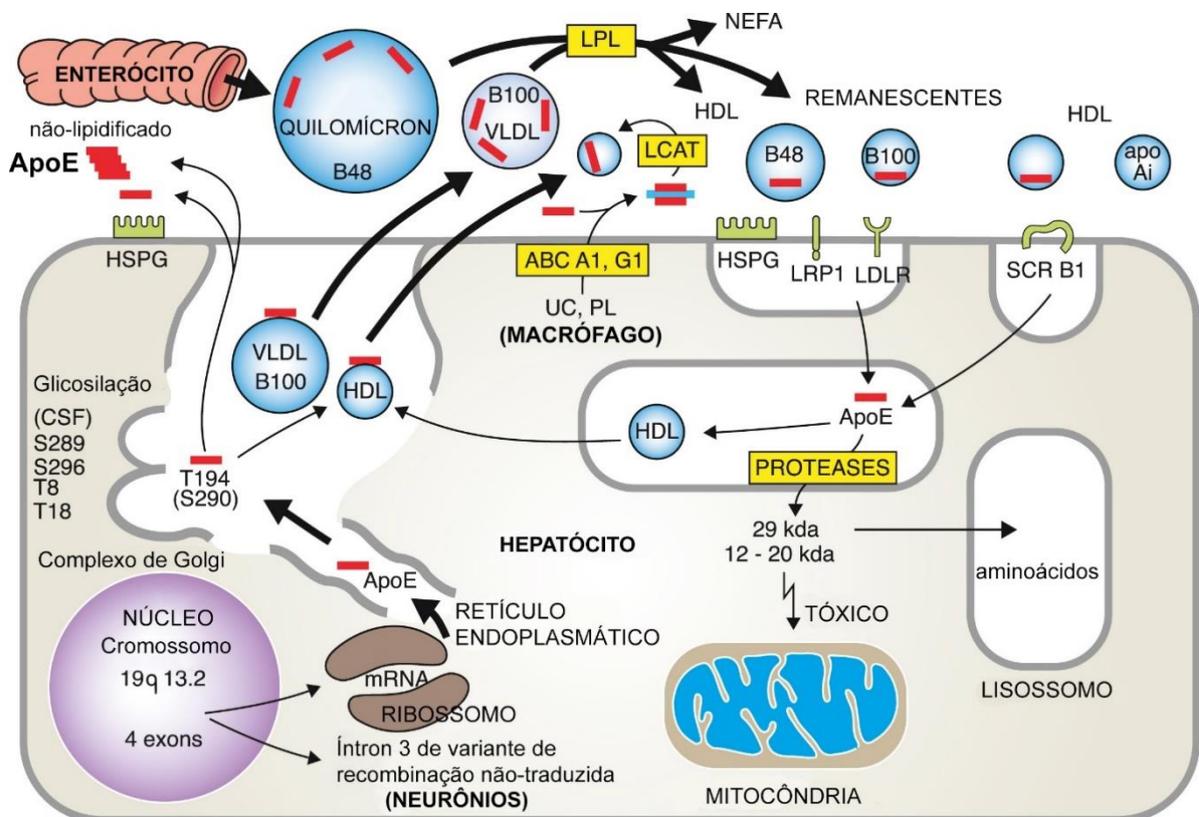


Figura 5 - Biossíntese da APOE

O gene *APOE* no cromossomo 19 contém 4 exons, mas pode ser dividido em uma variante minimamente traduzida nos neurônios. A glicosilação no aparelho de Golgi está

principalmente na treonina 194, mas também na serina 290, enquanto no LCR são encontradas outras formas glicosiladas. A APOE promove a síntese de *VLDL* e sua secreção pode ser estimulada com a aquisição de lipoproteínas pela célula. Algumas APOE se ligam aos proteoglicanos de sulfato de heparano extracelular, enquanto outras APOE podem se auto-associar em tetrâmeros. A APOE em lipoproteínas ricas em triglicerídeos permanece em remanescentes e promovem sua absorção pela ligação a proteoglicanos de heparano, receptor de LDL relacionado à proteína 1 e receptor de LDL. A APOE pode aceitar colesterol e fosfolípidios na superfície celular por meio dos transportadores ABC A1 e G1. Essas partículas discoidais adquirem éster de colesterol pela ação da LCAT. As lipoproteínas de alta densidade com APOE podem se ligar a receptores eliminadores para entregar a APOE no interior da célula, de onde ela pode ser secretada ou degradada (obs.: nesta fase, foi demonstrado que a variante APOE4 pode produzir peptídeos tóxicos para as mitocôndrias e os lisossomos). **Siglas:** **ABCA1,G1:** *Adenisonone binding cassette transportes A1 and G1*; **ApoAi:** Apolipoproteína Ai; **APOE:** Apolipoproteína E; **B48:** Apolipoproteína B48; **B100:** Apolipoproteína B100; **CSF:** Líquido cefalorraquidiano; **HDL:** Lipoproteína de alta densidade; **HSPG:** *Heparan sulphate proteoglycan*; **kda:** kilodalton; **LCAT:** *Lecithin: cholesterol acyltransferase*; **LDLR:** *Low density lipoprotein receptor*; **LRP1:** *LDL receptor related protein 1*; **LPL:** *Lipoprotein lipase*; **NEFA:** Ácidos graxos não-esterificados; **PL:** *Phospholipid*; **SCRB1:** *Scavenger receptor B1*; **S:** Serina; **T:** Treonina; **UC:** Colesterol não-esterificado; **VLDL:** lipoproteína de densidade muito baixa.

Fonte: Figura reproduzida sob a permissão da Editora Elsevier nº 4977770493403, de Marais AD. 2019 (182)

O polimorfismo estrutural da APOE influencia sua conformação e consequente ligação às lipoproteínas (231) e receptores celulares (232). O polimorfismo da APOE também interfere nas seguintes propriedades desta glicoproteína: anti-apoptótica (233), imunomoduladora (234), antioxidante (235) e capacidade protetora anti-aterosclerótica cardiovascular (236).

Em sua função biológica primordial, a APOE atua no transporte de lipídios, ligando-se aos receptores de lipoproteínas de baixa densidade (*LDLR*). Da família das lipoproteínas de baixa densidade, a *LDLR* é o principal receptor atuante no metabolismo do colesterol (237), e as isoformas APOE3 e APOE4 ligam-se com afinidade 50 vezes maior ao *LDLR* do que a APOE2 (233). A APOE é fundamental no metabolismo lipídico, ao promover o *clearance* de remanescentes de lipoproteínas ricas em triglicerídeos (contendo apolipoproteína-B) da circulação para o fígado (182), mantendo a homeostase de colesterol e triglicerídeos.

Os receptores da APOE são essenciais ao desenvolvimento do sistema nervoso central e influem na regulação da plasticidade sináptica, na função neuroprotetora, na inervação muscular e ainda na regulação do metabolismo da proteína precursora de amiloide em múltiplos níveis (239). No cérebro, a APOE assimila e transfere lipídios. Além disso, a APOE influencia a adipogênese a partir das lipoproteínas ricas em triglicerídeos (240). A APOE influencia os níveis de micro-RNA,

especialmente o miR146a, que é abundante no cérebro. Concentrações reduzidas de miR146a são encontradas no cérebro e plasma de portadores *APOE-E4* (241).

O metabolismo vascular é afetado de diversas formas pela *APOE*, desde a manutenção da integridade da barreira hemato-cerebral (242) às respostas inflamatórias (243), como no fenômeno de transformação de macrófagos em fenótipos anti-inflamatórios M2 (244), na transformação de linfócitos em células *T-helper* (242) e na agregação plaquetária (245).

A homeostase de organelas intracelulares também pode ser influenciada pela *APOE* (246), e algumas isoformas específicas, como a *APOE4*, já se provou capaz de aumentar o estresse do retículo endoplasmático por mimetizar o desdobramento incorreto da proteína (247).

Por fim, peptídeos biologicamente ativos da *APOE* podem também participar em infecções bacterianas (248). Zanfardino e col. (249) relataram a caracterização de um peptídeo, correspondendo aos resíduos 133 a 167 da *APOE* humana, que denominaram “*ApoE (133-167)*”. Este peptídeo, além de apresentar propriedades interessantes comparáveis a outros peptídeos derivados da *APOE*, apresentou outras características notáveis como atividade bactericida contra um amplo espectro de bactérias, e a habilidade de subregular a liberação de citocinas induzidas por lipopolissacarídeos, o que lhe confere propriedade anti-biofilme.

A *APOE* é expressa em diversas células (250), mas mais amplamente no sistema nervoso central (células gliais, astrócitos, plexo coróide e células vasculares), e no fígado. A *APOE* também é expressa em adipócitos e macrófagos (250). A ligação da *APOE* com proteoglicanos de sulfato de heparano (HSPG) e heparina nas membranas celulares ou nas matrizes extracelulares pode influenciar as respostas celulares aos sinais e ser a explicação do porquê a *APOE* é expressa nos nervos periféricos, rins, músculos, ovário, baço e pulmões (182).

1.5.4. O polimorfismo do gene APOE em estados orgânicos patológicos

A proteína *APOE* diminui o acúmulo lipídico nos monócitos circulantes e a expressão de moléculas inflamatórias nos monócitos e no endotélio vascular (251), fatos que suprimem a instalação da aterosclerose. Centa e col. (252) demonstraram que a deleção de *APOE* em camundongos adultos levou à hipercolesterolemia

acompanhada de respostas imunes adaptativas, como alterações nas populações de linfócitos T-helper tipo 1, subclasse T-reguladores e na produção de anticorpos.

Como exemplificação da complexidade de uma doença afetada por uma variante específica do *APOE*, pode-se citar a hiperlipoproteinemia tipo III - doença de origem genética altamente aterogênica, que afeta diretamente o metabolismo das lipoproteínas. A prevalência de hiperlipoproteinemia tipo III varia de 0,12 a 0,40%, dependendo da definição utilizada (253). Uma proporção significativa de hiperlipoproteinemia tipo III é causada pela mutação *APOE-E2* (Arg145 -> Cys), herdada de forma dominante e particularmente prevalente na comunidade negra (254). Das pessoas com genótipo E2-E3, 15% desenvolvem hiperlipoproteinemia tipo III familiar, que está associada a fatores de risco secundários, como obesidade e resistência à insulina (253).

Portadores do alelo *APOE-E4* são classicamente mais propensos ao desenvolvimento da doença de Alzheimer (255,256). Camundongos geneticamente deficientes para a *APOE* apresentaram perda sináptica, disfunção cognitiva e níveis elevados de lipídios plasmáticos, alterando a função cerebral e simulando a doença de Alzheimer (257). A patogênese da doença de Alzheimer correlaciona-se com a depuração comprometida das proteínas tau e β -amilóide (258), e a alta afinidade da *APOE4* por estas proteínas, sua baixa concentração no líquido e possível incremento de captação celular, juntamente aos seus fragmentos metabólicos tóxicos, fatores estes que parecem estar diretamente associados no processamento deste evento patológico neurodegenerativo (182). Os portadores do alelo *APOE-E4* também parecem estar associados a outras condições neurológicas, a) favorecendo a prevalência da angiopatia cerebral amilóide (259); b) aumentando a severidade da doença de Wilson, em que a *APOE4* é uma isoforma que induz uma menor ligação do cobre e conseqüentemente piora a reparação neuronal (260); c) aumentando a mortalidade após isquemia cerebral aguda (261); d) piorando o prognóstico após trauma encefálico agudo (262,263).

Teng e col. (264) demonstraram que, em camundongos, a *APOE* influencia no desfecho de dano cerebral pós-trauma. Após o dano cerebral provocado, déficits neurológicos mais severos e intensa quebra da barreira hemato-encefálica foram observados em animais transgênicos *APOE4* e camundongos deficientes em *APOE*, comparados com os animais *APOE3* ou com os selvagens (264). Por sua vez, Zheng e col. (265) demonstraram que, em animais com encefalomielite autoimune induzida

experimentalmente, a falta da proteína APOE em animais geneticamente modificados provocou a quebra da barreira hemato-encefálica, sugerindo que a APOE exerça um papel protetor na manutenção da integridade desta barreira.

Além disso, o gene *APOE* parece estar associado a algumas doenças oftalmológicas, como distrofias corneanas (distrofia lattice, distrofia de Fuch's, distrofia de Schnyder) (266–268), ametropias (miopia) (269), doenças inflamatórias (uveítes) (270), doenças retinianas (degeneração macular relacionada à idade) (271), alterações na microvasculatura retiniana (272) e retinite pigmentosa (273). Não há ainda um consenso na literatura de que o gene *APOE* possa estar associado ao glaucoma.

1.5.4.1. Os polimorfismos do gene *APOE* em doenças oculares

1.5.4.1.1. Degeneração macular relacionada à idade (DMRI)

A DMRI é a doença ocular com maior nível de evidência de associação com o gene *APOE* (274–278), apesar de polimorfismos de outros genes também estarem implicados no desenvolvimento desta condição (279–281).

As drusas, depósitos focais que se acumulam entre a membrana basal do epitélio pigmentar da retina e a parte colagenosa interna da membrana de Bruch (282,283), contêm abundante quantidade de APOE, o que sugere a participação ativa desta proteína na patogênese da DMRI (271).

Xiyang e col. (271) coordenaram uma ampla metanálise incluindo 13842 casos e 38647 controles, que demonstrou que o alelo *APOE*-E4 exerce um papel protetor para a DMRI precoce ($OR = 0,889$, $IC95\%: 0,817-0,967$), e também para a atrofia geográfica ($OR = 0,594$; $IC95\%: 0,428-0,825$) e DMRI neovascular ($OR = 0,670$, $IC95\%: 0,58-0,76$) (266). Por sua vez, uma associação de risco significativa foi sugerida nos portadores do alelo *APOE*-E2 na DMRI precoce ($OR = 1,115$, $IC95\%: 1,000-1,243$), atrofia geográfica ($OR = 1,277$, $IC95\%: 0,735-2,217$) e DMRI neovascular ($OR = 1,067$, $IC95\%: 0,941-1,210$) (271).

A isoforma proteica APOE4 é conhecida por ter uma capacidade reduzida de transporte de colesterol via HDL, o que poderia interferir no transporte intracelular de colesterol e diminuir o processo de depósito lipídico, que possivelmente faz parte da patogênese da DMRI precoce (284). Em estudos experimentais, camundongos

transgênicos que expressam APOE2 humana, demonstraram acúmulo de lipídios no epitélio pigmentar da retina, observado sob microscopia eletrônica, o que não ocorreu nos animais controle. Além do fato do acúmulo lipídico ocorrer tipicamente na DMRI, VEGF e bFGF também foram superexpressos no epitélio pigmentar da retina de olhos APOE2 em comparação com olhos do grupo controle. Estes padrões de expressão de VEGF e bFGF sugerem um estímulo ativo à angiogênese, por alteração nas citocinas angiogênicas, em olhos APOE2 (285). Por sua vez, Jo e colaboradores (286) demonstraram que camundongos *knockout* para APOE e APOE2 – animais tipicamente utilizados como modelos em DMRI seca -, apresentaram padrões de expressão gênica característicos, na análise do transcriptoma de células primárias do epitélio pigmentar da retina. Neste estudo, os genes associados ao metabolismo lipídico *Pparbp*, *Rxrb*, *Vldlr*, e *Edf1* se apresentaram supra-regulados, enquanto os genes *Tgfbr1* e *Pdgfb*, que são conhecidos pelo seu papel no processo de angiogênese patológica na DMRI, apresentaram-se infra-regulados nos perfis de expressão gênica das células primárias do epitélio pigmentar da retina desses camundongos transgênicos. Estes resultados sugerem que genes específicos associados ao metabolismo lipídico e a angiogênese estão envolvidos na patogênese e progressão da DMRI (286).

1.5.4.1.2. Sinais patológicos na microvasculatura retiniana

As alterações patológicas identificadas como sinais vasculares retinianos (por exemplo, hemorragias, microaneurismas, chanfraduras arteriovenosas) são achados relativamente comuns em adultos, mesmo em não-diabéticos (272). Liew e col. (272) conduziram um estudo amplo entre norte-americanos brancos e negros de meia-idade, e sugeriram que o alelo *APOE-E4* foi associado a retinopatias não-diabéticas em indivíduos brancos (*OR* multivariado ajustado=1,3, IC95%: 1,0-1,6) e negros (*OR* multivariado ajustado=1,4, IC95%:1,0-2,1).

1.5.4.1.3. Miopia

Himabindu e col. (269) relataram em um estudo tipo caso-controle que houve uma frequência aumentada de portadores do genótipo E3-E4 entre os probandos homens, alto míopes e entre os míopes de aparecimento precoce,

sugerindo que este genótipo pode conferir um risco aumentado ao desenvolvimento de miopia.

Em altos míopes, a peroxidação lipídica promove a liberação de radicais livres, e conseqüente instalação do processo de estresse oxidativo (287–289). O olho é um órgão repleto de espécies reativas ao oxigênio, o que requer um alto nível de antioxidantes para protegê-lo. O alelo *APOE*-E4 é conhecido por possuir uma menor habilidade de neutralizar o estresse oxidativo quando comparado aos alelos *APOE*-E2 e *APOE*-E3, o que pode justificar uma relação do *APOE*-E4 com o desenvolvimento da alta miopia (269).

1.5.4.1.4. Uveítes

Com o intuito de testar a hipótese de que diferentes tipos de proteínas são expressas em formas diversas de uveítes, Pepple e col. (270) conduziram um estudo para identificar o perfil proteico no humor aquoso com inflamação ativa induzida de animais. Dois modelos de uveítes foram induzidos em ratos Lewis: uveíte experimental autoimune (EAU) e uveíte micobacteriana preparada (PMU). O humor aquoso “inflamado” de ambos os modelos animais demonstrou um aumento na concentração total de proteínas, quando comparado ao humor aquoso natural. Detectou-se uma elevação nos níveis de *APOE* no humor aquoso de ambos os modelos de uveíte, mas esta foi especialmente elevada na EAU (270). Apesar de não se ter ainda a compreensão do significado clínico do aumento dos níveis de *APOE* em olhos sob processos inflamatórios ativos, há evidências da participação da *APOE* na cascata da inflamação (290,291).

1.5.4.1.5. Retinite pigmentosa

Algumas publicações têm sugerido que anormalidades no metabolismo plasmático de lipoproteínas podem estar associadas a algumas formas de retinite pigmentosa (RP) (292). Jahn e col. (273) compararam a prevalência de variantes genéticas do *APOE* em pacientes com RP na população alemã e constataram uma prevalência aumentada nos genótipos E2-E2: 10,1 vs 1,0%, E2-E3: 19,4 vs 12,0%, e E2-E4: 5,8 vs 1,5%, enquanto a prevalência se mostrou reduzida nos genótipos E3-E3: 48,9 vs 59,8%, E3-E4: 13,7 vs 22,9%, e E4-E4: 2,2 vs 2,8%. Huq e col. (293)

realizaram uma investigação similar em uma população escocesa com RP, encontrando uma incidência quatro vezes maior de portadores do genótipo E2-E2, e oito vezes maior de portadores do genótipo E4-E4, quando comparados ao grupo controle.

1.5.4.1.6. Distrofias corneanas

Recentemente, Kuot e col. (267) publicaram o primeiro estudo sobre a relação entre a APOE e a distrofia endotelial de Fuchs. Os resultados revelaram que uma quantidade significativamente reduzida de APOE e IGHG1 (*immunoglobulin heavy constant gamma 1 protein*) foram encontradas nos extratos de membrana de Descemet retirados de espécimes de pacientes com diagnóstico de distrofia de Fuchs submetidos à DSAEK (*Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty*) (267). Outros estudos também investigaram a presença da APOE em casos de distrofias corneanas, como Venkatraman e col. (266), que detectaram que a APOE (além das apolipoproteína A-IV, e da protease HTRA1) está significativamente aumentada nos depósitos corneanos de amilóide de pacientes portadores de distrofia corneana *lattice* comparados a controles saudáveis. Não há explicação sobre a participação da APOE na composição dos depósitos corneanos da distrofia *lattice*, mas sim na doença de Alzheimer (294). Além disso, o aumento de quantidade de outra apolipoproteína (apolipoproteína A-IV) já foi descrito em portadores de amiloidose sistêmica (295,296). Por fim, Gaynor e col. (268) estudaram a presença de apolipoproteínas em córneas obtidas de pacientes portadores de distrofia de Schnyder submetidos à ceratoplastia penetrante. Os resultados demonstraram que a deposição de apolipoproteínas associadas a HDL nas córneas foi acompanhada pelo acúmulo de lipídios no espaço extracelular. APOA-I, APOA-II e APOE foram encontradas em maior nível nas córneas afetadas comparadas às córneas normais (268).

1.5.4.1.7. Glaucoma

A APOE é expressa na malha trabecular, corpo ciliar, lâmina cribrosa e CGR (297). É ainda relevante observar que a APOE também é expressa nas células de Müller, cujos processos celulares envolvem os axônios e corpos das células ganglionares, fato este considerado fundamental na manutenção do microambiente

fisiológico para as fibras do nervo óptico. Na cabeça do nervo óptico, as células de Müller são substituídas por astrócitos – o tipo celular onde a expressão da APOE é mais amplamente documentada (298–300).

Dentre os estudos publicados até hoje a respeito da possível relação entre os polimorfismos do gene *APOE* e o glaucoma, não houve concordância entre as conclusões encontradas. Alguns investigadores demonstraram uma associação positiva (301-306), outros não identificaram nenhuma relação de risco (307–310), e um estudo recente demonstrou uma relação protetora do alelo *APOE-E4* (311). A atual insuficiência de estudos disponíveis impede o esclarecimento da real participação dos polimorfismos do *APOE* como fatores de risco ou de proteção para o desenvolvimento do glaucoma. Portanto, mais investigações que visem esclarecer a associação entre os polimorfismos do *APOE* e o glaucoma são necessárias, a exemplo deste estudo.

Apesar dos estudos de associação genética até hoje conduzidos, não há publicações que esclareçam o mecanismo da participação da APOE na fisiopatologia do glaucoma. Nesta seção, tentar-se-á desenvolver um racional sobre os mecanismos possivelmente implicados na participação da APOE na patogênese desta afecção.

A APOE é sintetizada principalmente pelas células gliais e, em menor escala, pelos macrófagos, mas não pelos neurônios (312,313) Amaratunga e col. (314) demonstraram, através de cultura de células de coelhos brancos adultos, que a APOE é sintetizada em quantidades significantes pelas células de Müller e secretada para o vítreo e para o compartimento extracelular da retina. A APOE proveniente do vítreo e do espaço extracelular é então internalizada pelo complexo de células ganglionares retinianas (CCG) e, subsequentemente, transferida pelos axônios do nervo óptico para o cérebro através de transporte anterógrado rápido (314). A forma bipolar das células de Müller, com processos longos estendendo-se em cada extremidade, permite a secreção da APOE em qualquer área da retina (299).

Qual seria o papel fisiológico desempenhado pela APOE nesta via do sistema neuro-ocular? Acredita-se que a APOE possa atuar como um portador lipídico para suprir as necessidades metabólicas do axônio (312,315). Pesquisas evidenciaram que os axônios e terminais neurais não podem sintetizar glicolipídios e colesterol, e que dependem de um portador para levar estes nutrientes essenciais para o interior da célula (316). Em concordância com esta teoria, Shanmugaratnam e col. (317) demonstraram que a APOE secretada pelas células de Müller em cultura e *in vivo* é efetivamente incorporada em partículas lipoproteicas. Outros estudos

demonstraram que a APOE exerce um papel primordial na mobilização e redistribuição de fosfolípidos e colesterol durante o remodelamento de membrana associado à plasticidade sináptica no cérebro de ratos (318–320).

A presença de APOE nas células ganglionares retinianas como proteína fundamental para o seu metabolismo fisiológico e as evidências de que a degeneração desta classe celular ocorrem no glaucoma (321) sugerem que algumas variantes genéticas do APOE possam estar relacionadas ao risco de desenvolvimento desta doença ocular (301).

Kirwan e col. (322) demonstraram que células da lâmina cribrosa de humanos com GPAA aumentaram a produção de matriz extracelular e da expressão gênica profibrótica comparativamente a células de indivíduos normais. Foram encontradas nos tecidos de lâmina cribrosa dos pacientes glaucomatosos expressões aumentadas das proteínas COL5A1, e diminuição da expressão de TGNFBR3, CDH1, CYP1B1 e da APOE. Estes autores compararam os níveis de RNA-mensageiro entre as células de pacientes glaucomatosos e normais (*Gene Expression Omnibus database* GSE13534), e encontraram vários genes superexpressos como os: *secreted acid protein cysteine rich (SPARC)*, *periostin (POSTN)*, *collagen type I (COL1A1)*, *collagen type V (COL5A1)*, *collagen type XI (COL11A1)*, *cartilage linking protein-1 (CRTL-1 transforming growth factor beta 1 (TGFβ1)*, e o *thrombospondin-1 (THBS1)*. Dentre os subexpressos, pode-se citar: *fibulin 1 (FBLN1)*, *decorin (DCN)*, *collagen type XVIII (COL18A1)*, *(Chromodomain-Helicase-DNA (CHD1)*, *Cytochrome P450 Family 1 Subfamily B Member 1 (CYP1B1)* e o APOE (322). O envolvimento dos genes CYP1B e APOE com o GPAA provavelmente se deve à participação de ambos no metabolismo lipídico, o que pode comprometer o *turnover* celular e a renovação da lâmina cribrosa. Os dados genéticos e funcionais até hoje coletados sugerem que mutações nestes genes podem alterar a constituição estrutural da lâmina cribrosa dos pacientes afetados por glaucoma, aumentando a susceptibilidade ao dano glaucomatoso (297). Porém, os achados acima mencionados foram baseados em estudos de pequeno porte, com uma oferta limitada de material histológico proveniente de doadores humanos.

Existem modelos animais geneticamente modificados com mutações no gene APOE, que trazem subsídios para a participação desse gene na fisiopatogênese do glaucoma.

Omodaka e col. (323) investigaram o papel da APOE no dano axonal induzido pela morte das CGR. O dano às CGRs foi induzido em camundongos adultos geneticamente deficientes em APOE através de hipertensão ocular provocada, lesão no nervo óptico ou pela administração de ácido cáinico intravítreo. Os animais selvagens foram previamente tratados com um antagonista do receptor de glutamato (MK801 ou CNQX) trinta minutos antes da lesão induzida ou permaneceram sem nenhum tratamento. Os achados deste estudo demonstraram que os camundongos deficientes em APOE foram resistentes à morte das CGRs e à degeneração do nervo óptico quatro semanas após o evento patológico. Nos animais selvagens, a lesão no nervo óptico induziu a morte das CGR (animais com lesão no nervo óptico: 1728 ± 170 células/mm²; controles: 4085 ± 331 células/mm²). Nos animais deficientes em APOE, a morte de CGRs foi significativamente menor que nos animais selvagens, o que sugere que a deficiência de APOE teve um efeito neuroprotetor (323). Por outro lado, Zadeh e col. (324) demonstraram que a deficiência de APOE induz estresse oxidativo e disfunção endotelial nas arteríolas retinianas, o que desencadeia hipóxia na retina. Portanto, o que estas investigações sugerem é apesar da deficiência da APOE poder ter uma ação neuroprotetora às CGR em eventos patológicos agudos (323), ela também pode provocar estresse oxidativo, e dano celular (324–326). Estudos adicionais precisarão ser realizados para o esclarecimento da diferença nos efeitos provocados pela deficiência ou ausência da APOE em eventos neurológicos agudos ou crônicos.

A participação do metabolismo lipídico no desenvolvimento do glaucoma é corroborada indiretamente pelo efeito protetor promovido pelo uso de estatinas em pacientes com hiperlipidemia (327). Em um estudo retrospectivo com 529.104 pacientes hiperlipidêmicos, Stein e col. (327) constataram que o uso de estatinas foi associado a uma significativa redução do risco de GPAA. O risco de desenvolver GPAA diminuiu 0,3% (*HR* ajustado = 0.997, IC 95%: 0.994–0.999) para cada mês adicional de consumo de estatina, e se o consumo foi continuado por dois anos, houve um risco reduzido de 8% (*HR* ajustado = 0.922, IC 95%: 0.870–0.976) em relação aos que não receberam terapia com estatinas. Já o risco de progressão de um suspeito de glaucoma para GPAA diminuiu 0,4% (*HR* ajustado = 0.996, IC 95%: 0.993–0.999) para cada mês adicional de consumo de estatina. Indivíduos que tomaram estatinas continuamente por dois anos tiveram um risco reduzido de 9% (*HR* ajustado = 0.907, IC 95%: 0.846–0.973) de progredir de glaucoma suspeito para GPAA em relação

àqueles que não receberam terapia com estatinas (327). Talwar e col. (328) demonstraram que pacientes usuários de estatinas continuamente por dois anos tiveram um risco de desenvolver GPAA 21% menor comparados aos não-usuários (HR ajustado=0,79; IC 95%: 0,66-0,96; $p=.02$).

A APOE é uma proteína essencial ao transporte de lipídios, com uma participação especialmente relevante no nível da membrana neuronal (329). A APOE sofre um processo de fragmentação no tecido cerebral humano, e este padrão de fragmentação varia entre as isoformas proteicas. Infelizmente, pouco se sabe a respeito da fragmentação da isoforma APOE2 e os escassos relatos sobre a função dos fragmentos gerados por ela são inconsistentes na literatura, provavelmente por ser esta variante proteica a mais rara em todo o mundo (206). Porém, o padrão de fragmentação difere entre a APOE3 e a APOE4 (330). A APOE4 exerce funções neurotóxicas, enquanto outros fragmentos como o APOE N-terminal 25kDa, que é mais prevalente em indivíduos APOE3, tem um efeito neuroprotetor (331).

Outros estudos também demonstraram que a regulação da expressão da APOE e o polimorfismo do gene *APOE* têm uma real conexão com doenças neurodegenerativas como doença de Parkinson, doença de Alzheimer, acidente vascular cerebral isquêmico, dentre outras (332,333). Na ocorrência de dano ou estresse ao neurônio, a APOE é sintetizada para redistribuir o colesterol para a remodelação e reparação neuronal. Entretanto, devido à sua estrutura alterada, a APOE4 sofre proteólise neurônio-específica, gerando fragmentos neurotóxicos (12-29 kDa) que escapam da via secretora, causam disfunção mitocondrial e alterações do citoesqueleto, incluindo fosforilação-tau (333). Mancino e col. (334) aventaram a possibilidade de que o glaucoma e a doença de Alzheimer possam ser ambas consideradas doenças neurodegenerativas relacionadas à idade, que podem coexistir na senilidade e compartilhar as mesmas vias patogênicas. Entre as evidências que sugerem essa correlação estão: a) o exame *post-mortem* de nervos ópticos de pacientes com glaucoma, que demonstraram um perfil de degeneração neuronal denominada degeneração axonal *long-term*, a mesma encontrada em diferentes estágios da doença de Alzheimer (334,335); b) a similaridade do padrão de degeneração das CGRs observadas na Doença de Alzheimer e no glaucoma (335–337); c) níveis alterados de neurotoxinas como a amilóide- β e a proteína tau, encontrados na DA e no glaucoma (338–340); d) a alteração na dinâmica da circulação do líquido cefalorraquidiano, que é similar na DA e no glaucoma (341),

caracterizada pelo decréscimo da secreção de LCR, além de uma resistência aumentada à drenagem do LCR e um aumento de seu volume no cérebro (341–344); e) o fenômeno denominado autofagia (345), que é o processo de degradação de componentes intracelulares maiores, transformados em fontes anabólicas, e que está alterado tanto na DA como no glaucoma (346–351).

Há outras publicações destacando o papel da APOE4 nos processos neurodegenerativos (332,352), incluindo o glaucoma (353). São, porém, exíguas as publicações focadas nas outras variantes do *APOE*. Portanto, são necessárias investigações adicionais a respeito da ação de outros polimorfismos na fisiopatogenia do glaucoma.

A APOE também é superexpressa em resposta ao estresse oxidativo, o que fisiologicamente lhe confere propriedades antioxidativas (354). Lee e col. (355) demonstraram que a APOE protege culturas mistas de células neurais e gliais contra o dano oxidativo através da diminuição de excitotoxicidade pelo glutamato.

Dentre os vários mecanismos fisiopatológicos propostos para a ocorrência do dano glaucomatoso e morte das CGR está a excitotoxicidade induzida pelo glutamato, que leva a um processo inflamatório e conseqüente degeneração secundária da cabeça do nervo óptico (91). No glaucoma, o decréscimo na expressão da enzima transportadora glutamato-aspartato (GLAST) leva à excitotoxicidade causada pelo glutamato, morte neuronal e degeneração dos fotorreceptores (356–359). Recentemente demonstrou-se que os indivíduos portadores da variante *APOE-E4* apresentam um elevado nível de estresse oxidativo no cérebro, e que portadores de doença de Alzheimer também apresentam um grau de estresse oxidativo cerebral aumentado causado pelos oligômeros peptídicos β -amilóides. A peroxidação lipídica decorrente produz uma molécula altamente reativa e neurotóxica chamada 4-hidroxinonenal, que forma ligações covalentes com os resíduos de cisteína (e resíduos Lys e His). Os resíduos Cys covalentemente modificados alteram a estrutura e função das proteínas. Como a APOE4 não apresenta resíduos Cys, esta torna-se inábil para remover a 4-hidrononenal, permitindo que esta exerça sua função neurotóxica sobre as proteínas neuronais levando à morte celular (360).

Haveria uma correlação dos fenômenos inflamatórios e oxidativos na patogênese do glaucoma? Se a autorregulação estiver alterada, instala-se um processo de estresse por hipóxia, durante o qual o mediador HIF- α parece ser o principal responsável pela indução de genes que facilitam a adaptação celular de

normóxia para hipóxia. Assim, uma baixa saturação de oxigênio na retina estimula o HIF- α a promover o mecanismo regulador para proteger as CGRs da morte (361,362). O HIF- α também regula genes inflamatórios, como o *nitric oxide* (NO) e o VEGF (363,364). A presença do HIF- α na vigência de estresse por hipóxia pode também afetar a função mitocondrial pela produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS) (365). As ROS induzem a um estado de estresse sustentado pela ativação de mediadores inflamatórios (363,366–368), levando a danos severos às proteínas celulares, lípidos, DNA e mitocôndrias, e, por fim, à morte das CGRs (363,369,370). Como citado anteriormente, a expressão alterada de APOE pode suscitar estados metabólicos oxidativos e/ou inflamatórios e facilitar a apoptose das CGRs.

Um estudo conduzido por Methia e col. (371) revelou a quebra da barreira hemato-encefálica no córtex cerebral de camundongos APOE deficientes, com aumento de 70% de vazamento espontâneo do corante em comparação aos animais controle. Estudos prévios demonstraram que a barreira hemato-encefálica já é anatomicamente imperfeita em nervos ópticos normais, e provavelmente mais comprometida em olhos glaucomatosos (372–375). A barreira hemato-encefálica incompleta permite às moléculas circulantes, como a endotelina-1, acesso direto ao complexo de células músculo-vasculares e pericitos da área pré-laminar da cabeça do nervo óptico e do tecido retiniano adjacente. Esta substância vasoativa pode promover vasoconstrição nas veias retinianas peripapilares de pacientes glaucomatosos. A endotelina-1 também reduz as junções endoteliais (*tightjunctions*) e a metaloproteinases-matriz (MMP-9) degrada a membrana basal, e então não somente macromoléculas, mas mesmo glóbulos vermelhos, conseguem ultrapassar a barreira hemato-encefálica e provocar as hemorragias do disco óptico (376) – evento este altamente relacionado ao desenvolvimento e progressão do glaucoma (377). Seria interessante investigar o papel da APOE na barreira hemato-aquosa no corpo ciliar, já que a quebra desta barreira pode alterar a produção e composição do humor aquoso que, por sua vez, pode levar ao aumento da PIO (297). Por fim, o rompimento da barreira hemato-encefálica e/ou da barreira hemato-retiniana pode provocar resposta inflamatória e, por sua vez, desencadear a cascata pró-apoptótica levando à morte das CGR (378).

A Figura 1 traz um esquema representativo de eventos biológicos que podem participar da patogênese do glaucoma, pela influência de uma ou mais variante(s) do gene *APOE*.

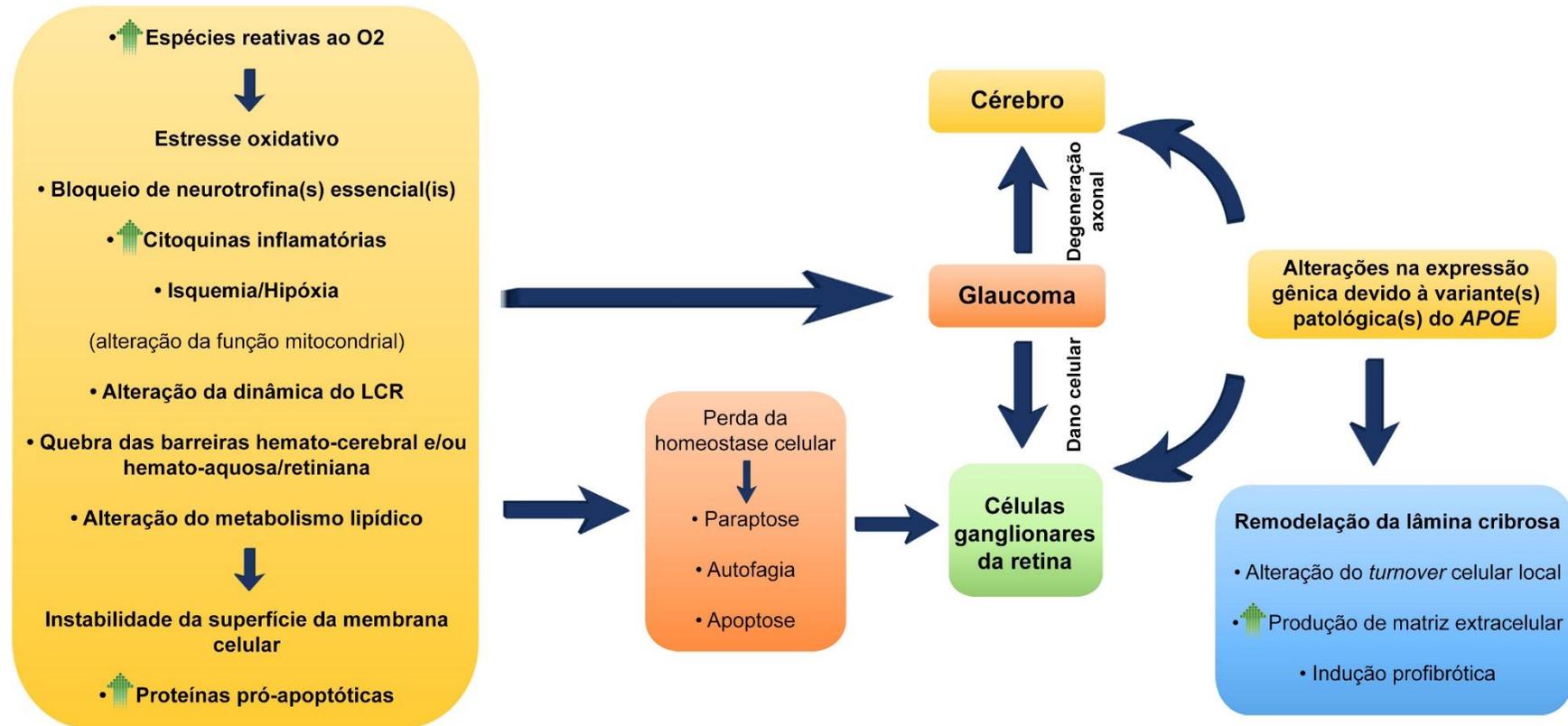


Figura 6 - Proposição teórica da influência de variante(s) do gene *APOE* na patogênese do glaucoma
 Fonte: Elaborado pelo autor

1.6. Justificativa

O glaucoma é a segunda principal causa de cegueira no mundo, após a catarata. No entanto, quando comparado à catarata, é um desafio de saúde pública muito maior, uma vez que provoca uma deficiência visual irreversível (379).

A compreensão de que o glaucoma é uma doença multifatorial, com a contribuição de fatores genéticos e ambientais (133,380), torna fundamental a investigação de diferentes vias potencialmente implicadas na sua fisiopatogenia.

Como descrito anteriormente, há uma série de indícios que sugerem uma associação entre variantes do gene *APOE* e glaucoma, com provável influência na fisiopatogenia dessa doença (301,302,306,310,353,381,382). No entanto, a associação entre as variantes do gene *APOE* e o GPAA não foi ainda estudada em indivíduos brasileiros. Assim, justifica-se a realização de um estudo para investigar a frequência das variantes genéticas do *APOE* e para avaliar a associação entre os polimorfismos encontrados e o risco de GPAA em uma amostra da população brasileira.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Descrever a frequência alélica do gene *APOE* em uma amostra da população brasileira.
- Avaliar a associação entre as variantes (*APOE-E2*, *APOE-E3* e *APOE-E4*) do gene *APOE* (rs429358 e rs7412), localizado no cromossomo 19q13.2 e seus correspondentes genótipos, e o risco de desenvolvimento de GPAA em uma amostra de pacientes brasileiros.

2.2. Objetivo secundário

- Investigar se a necessidade de realização de cirurgia antiglaucomatosa, e o número de cirurgias realizadas, indicadores de maior agressividade do GPAA, estão correlacionados às variantes do gene *APOE* nessa população.

3. MÉTODOS

3.1. Desenho do estudo

Trata-se de um estudo de associação, transversal, tipo caso-controle, envolvendo pacientes portadores de GPAA (grupo caso), e pacientes sem a doença (grupo controle), avaliados no Departamento de Oftalmologia do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas.

3.2. Casuística

3.2.1. Seleção dos pacientes

Os indivíduos considerados elegíveis a participar do estudo foram selecionados nos Ambulatórios de Glaucoma e Catarata e entre servidores do Departamento de Oftalmologia do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas com base nos critérios de inclusão e exclusão elencados a seguir:

3.2.1.1. Critérios de inclusão

a) Grupo Caso

Os pacientes incluídos no grupo caso (com GPAA) deveriam ter idade acima de 40 anos, diagnóstico firmado de GPAA com ângulo aberto à gonioscopia, e preencher três dos seguintes critérios: (i) PIO > 21 mmHg, sem medicação hipotensora ocular; (ii) disco óptico tipicamente glaucomatoso, definido quando ao menos duas das seguintes características estivessem presentes: proporção disco-escavação >0,7; assimetria entre os olhos da proporção disco-escavação >0,2; afinamento da rima neural; hemorragia do disco óptico ou *notch* do disco óptico; (iii) campo visual com defeitos tipicamente glaucomatosos observados à perimetria automatizada acromática utilizando os programas 30-2 ou 24-2 no *Humphrey Field Analyzer* (Humphrey Instruments, San Leandro, California), e definido como o índice *pattern standard deviation* (PSD) fora dos 95% dos limites normais, ou o *glaucoma hemifield test* (GHT) fora do limites normais, isto é, quando a assimetria entre zonas

simétricas nos hemisferos superior e inferior excede a encontrada em 99% da população; (iv) anormalidades na camada de fibras nervosas retinianas e/ou complexo de camada de células ganglionares detectadas à tomografia de coerência óptica (OCT) (Spectralis®, Heidelberg Engineering Inc., Franklin, MA).

b) Grupo Controle

No grupo controle, todos os pacientes deveriam ter idade acima de 40 anos, com exame oftalmológico normal, com PIO abaixo de 16 mmHg, proporção disco-escavação $<0,4$, sem alterações fundoscópicas compatíveis com degeneração macular relacionada à idade, e sem história familiar de glaucoma ou de cegueira de origem indeterminada.

3.2.1.2. Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo, tanto nos grupos caso quanto controle, os indivíduos que não concordassem em participar da pesquisa, através da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), ou em submeter-se ao exame oftalmológico.

Foram excluídos os pacientes com glaucomas secundários, glaucomas congênitos, miopia elevada (>-6.00 dioptrias esféricas); alterações fundoscópicas compatíveis com degeneração macular relacionada à idade; retinopatia diabética não-proliferativa ou proliferativa; e pacientes com neuropatias ópticas, desordens neurológicas, ou qualquer doença ocular ou sistêmica que pudesse afetar o campo visual ou o nervo óptico.

3.3. Aspectos éticos

Este estudo foi submetido à apreciação do Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, através da Plataforma Brasil, e aprovado sob protocolo CAAE 49120615.4.0000.5404, parecer 1.824.559 (Anexo 1). Manteve-se sob sigilo a identidade de todos os pacientes, e seguiram-se todos os preceitos da última Declaração de Helsinque.

Todos os pacientes selecionados para participação no estudo receberam explanação completa e detalhada, em linguagem simples, sobre a motivação da pesquisa, seus propósitos, métodos e benefícios almejados, podendo ou não participar da mesma, por livre e espontânea vontade, sem constrangimento ou prejuízo a seu programa de assistência médica regular. Todos os pacientes (grupos caso e controle) foram informados de que seria realizado um procedimento adicional (coleta de sangue), que não fazia parte da rotina atual do serviço. Os que aceitaram participar, assinaram um TCLE (Anexo 2), autorizando sua participação voluntária na pesquisa, consentimento este que poderia ser retirado, em qualquer fase do estudo, sem prejuízo ao seu atendimento médico.

A quantidade de 10 mL de sangue periférico coletada dos pacientes não ofereceu nenhum efeito adverso ou prejuízo à saúde dos mesmos. O material biológico (sangue) extraído foi encaminhado e sequencialmente armazenado no Biorrepositório do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) – UNICAMP e utilizado para o objetivo previsto neste projeto de pesquisa.

3.4. Entrevista e anamnese clínica e oftalmológica

Após a verificação de todos os critérios de inclusão e exclusão, e a assinatura do TCLE, os indivíduos selecionados foram entrevistados com a aplicação de um questionário padronizado (Anexo 3). O questionário incluía informações sobre dados demográficos, história de glaucoma, doenças oculares ou cegueira de causa desconhecida no paciente e em familiares; doenças sistêmicas; medicações sistêmicas em uso; seguida pelo registro dos dados obtidos na avaliação oftalmológica: diagnóstico de GPAA; idade do diagnóstico; PIO máxima registrada; número máximo de colírios hipotensores utilizados durante o tratamento do glaucoma; PIO no dia da entrevista e colírios em uso atualmente; cirurgia(s) antiglaucomatosa realizada(s); refração; paquimetria ultrassônica; gonioscopia; campo visual (anotação dos índices globais do perímetro Humphrey no primeiro e último exames); observação clínica da escavação do nervo óptico (primeiro e último exames); retinografia (primeiro e último exames) e tomografia de coerência óptica (quando disponível) (registro do índice *average thickness* dos primeiro e último exames).

3.5. Avaliação oftalmológica

Todos os participantes foram submetidos à avaliação oftalmológica completa composta por: anamnese; acuidade visual com melhor correção refracional; biomicroscopia de segmento anterior com uso de lâmpada de fenda; tonometria de apinação com o uso do tonômetro de Goldmann; gonioscopia, biomicroscopia de fundo de olho com auxílio de lente de 78D; e mapeamento de retina.

Todos os pacientes (grupo caso) incluídos no estudo realizaram os exames de paquimetria ultrassônica (Tomey EM-3000®, Tomey Corporation, Nagoya, Japão) e perimetria visual computadorizada (Programas 24-2 ou 30-2, Sita Standard, Humphrey Field Analyzer® – Humphrey Instruments, San Leandro, CA, Estados Unidos da América). Os exames de retinografia simples (VISUCAM NM/FA® - Carl Zeiss Meditec, Jena, Alemanha) e de tomografia de coerência óptica de domínio espectral (SPECTRALIS® OCT - Heidelberg Engineering, Heidelberg, Alemanha; ou Cirrus® - Carl Zeiss Meditec AG, Jena, Alemanha) foram realizados sempre que possível.

3.6. Métodos laboratoriais

3.6.1. Coleta de sangue e extração de ácido desoxirribonucleico (DNA)

Uma amostra de 10 mL de sangue periférico foi coletada de todos os participantes deste estudo, em frasco apropriado estéril, contendo EDTA 10% com finalidade anticoagulante. O DNA foi extraído segundo o método fenol: clorofórmio (383). Os frascos contendo as amostras foram adequadamente identificados e estocados à temperatura de -20°C.

3.6.2. Avaliação dos polimorfismos

A análise das variantes do gene *APOE* (*APOE-E2*, *APOE-E3* e *APOE-E4*), rs429358 e rs7412, foi realizada através de reação em cadeia polimerase (PCR) e

sequenciamento direto. Os iniciadores (*primers*) foram selecionados com base nas sequências do gene *APOE* depositadas no *GenBank*⁴.

3.6.3. PCR

A PCR foi padronizada utilizando-se os seguintes reagentes: 0,3 µL de cada iniciador 20 pmol/µL, compreendendo as variantes rs429358 e rs7412 do gene *APOE* (sequência direta: 5' TCCAAGGAGCTGCAGGCGGCGCA 3' e reversa: 5' GCCCCGGCCTGGTACTACTGCCA 3'), 2,5 µL do tampão da enzima 10X (Tampão 10X: Tris-HCl 20 mM, pH 8,4, KCl 50 mM, gelatina 0,01%), 1,0 µL de MgCl₂ 50µM, 2,5 µL de DMSO 10%, 0,75 µL da mistura de nucleotídeos (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) 10 mM e 0,1 µL de Taq DNA polimerase Platinum 10 U/µL (Invitrogen Life Technologies, Gaithersburg, MD, EUA), adicionados a 1 µL de DNA genômico (50 ng/µL). O volume resultante foi completado com água ultrapura para 25 µL.

Em seguida, as amostras foram amplificadas por meio de aparelho termociclador Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems-Applera Corporation, Foster City, CA, EUA), com a determinação das temperaturas e duração dos ciclos após testes de eficiência. Para as variantes do gene *APOE* foi realizada uma desnaturação inicial a 95°C durante 5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação do DNA a 94°C durante 1 minuto, anelamento a 58°C durante 1 minuto e 30 segundos, extensão a 72°C durante 1 minuto e 30 segundos, e extensão final a 72°C por 7 minutos.

Por fim, os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio e examinados sob luz ultravioleta, através de transiluminador L-PIX EX (Loccus, Cotia, São Paulo, Brasil).

Com o objetivo de otimizar a reação de sequenciamento de Sanger (384) foi realizada a purificação das amostras de PCR por meio das enzimas Exonuclease I e Fosfatase Alcalina de Camarão. Para tanto, foram utilizados para cada 3 µL do produto da PCR: 0,2µL de Exonuclease I 20U/µl (Cellco/Jena Bioscience, Thuringia, Germany), 0,2µL de Fosfatase Alcalina de Camarão 1U/µl e 0,4µL de tampão 10 X da enzima Exonuclease I [Glicina-KOH 670 mM, 2-mercaptoetanol 100mM, MgCl₂ 67 mM (pH 9,5 a 25°C)].

⁴ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) e (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/?term=APOE>)

3.6.4. Reação de sequenciamento

As reações de sequenciamento foram realizadas segundo o método descrito por Sanger (384). Os reagentes utilizados foram: 1,0 µL do produto da PCR purificado, 0,5 µL de "Big Dye" 1x (*ABI PRISM Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*, Applied Biosystem Applied Biosystems Corporation, Foster City, CA, EUA), 4,0 µL do tampão "Save Money" 1x (fornecido pelo mesmo fabricante do "Big Dye"), iniciador direto ou reverso da variante analisada (1,0 µL do iniciador 5 pmol/µL) e água ultrapura para completar a reação para um volume final de 20 µL. As condições das reações de sequenciamento para as variantes do gene *APOE* foram: desnaturação inicial de 96 °C por 1 minuto e 30 segundos, seguida por 25 ciclos a 96 °C por 12 segundos, 50 °C por 6 segundos e 60°C por 4 minutos.

3.6.4.1. Purificação da reação de sequenciamento

Para a obtenção da purificação da reação de sequenciamento, as amostras foram precipitadas com 80 µL de etanol 80% e então centrifugadas a 4000 rpm por 45 minutos. O sobrenadante foi desprezado, seguido da adição de 150 µL de etanol a 70%. Outra centrifugação foi realizada com as amostras, desta vez por 10 minutos à velocidade de 4000 rpm. Por fim, o sobrenadante foi descartado e as amostras foram colocadas no termociclador durante três minutos a 64°C para a evaporação do etanol residual e posteriormente armazenadas a -20°C. Em seguida, o produto da reação de sequenciamento purificado foi ressuspenso em 10 µL de formamida *Hi-Di* (Applied Biosystem-Applied Biosystems Corporation, Foster City, CA, EUA), sendo então vigorosamente agitado e depois desnaturado a 94°C por cinco minutos. As leituras das sequências de bases nitrogenadas dos fragmentos foram efetuadas em um sequenciador automático (*ABI PRISM 3700* ou *ABI PRISM 3130 DNA Analyzers* (Applied Biosystem-Applied Biosystems Corporation, Foster City, CA, EUA)).

As sequências obtidas foram analisadas através do programa FinchTV (Geospiza)⁵ e subsequentemente comparadas com as sequências do gene através da ferramenta BLAST⁶.

3.7. Análise estatística

Os dados obtidos pela genotipagem de todos os indivíduos participantes da pesquisa (anonimizados) estão disponíveis no repositório público, no endereço eletrônico <https://datadryad.org/stash/dataset/doi:10.5061/dryad.qfttdz0dr>, e foram armazenados em um gerenciador de banco de dados.

Para descrever estatisticamente o perfil de nossa amostra segundo as variáveis em estudo, foram confeccionadas tabelas contendo as variáveis categóricas com valores de frequência absoluta (n), e estatísticas descritivas das variáveis numéricas, com valores de média, mediana, desvio-padrão (DP), e valores mínimo e máximo. Para comparação do gênero entre os grupos foi utilizado o teste Qui-quadrado, e para a variável idade o teste de Mann-Whitney. Para a frequência alélica de cada variante do gene *APOE*, entre os grupos caso e controle, foi empregado o teste Qui-quadrado. Para a frequência genotípica entre os grupos caso e controle foi utilizado o teste exato de Fisher. Para a determinação da associação entre os portadores de alelos de risco e/ou genótipos de risco para GPAA comparados ao genótipo de referência (E3-E3) foram utilizadas análises de regressão logística para a obtenção da razão de chances (*odds ratio* – *OR*), a um intervalo de confiança de 95%.

Para a determinação da associação entre os portadores de alelos de risco e/ou genótipos de risco para GPAA comparados ao genótipo de referência (E3-E3) quanto à necessidade de cirurgia antiglaucomatosa foram utilizados, respectivamente, os testes Qui-quadrado e o teste exato de Fisher. Por fim, para a definição de possível associação entre o número de cirurgias realizadas entre os portadores de alelos variantes, e de cada genótipo separadamente, comparados ao genótipo de referência, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis.

⁵ <https://finchtv.software.informer.com/1.4/>

⁶

(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) no servidor do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI: www.ncbi.nlm.nih.gov) e do *software* MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>).

O nível de significância adotado para o estudo foi de 5%.

3.8. Cálculo amostral

Para o cálculo amostral realizado antes do início desta pesquisa, utilizou-se a seguinte fórmula, para uma população finita:

$$n = \frac{N \times X}{(X + N - 1)}$$

n = tamanho da amostra necessário,

e

$$X = \frac{(Z_{\alpha/2})^2 \times p \times (1 - p)}{(MOE)^2}$$

Obs.: $Z_{\alpha/2}$ é o valor crítico da distribuição normal em $\alpha/2$ (para um intervalo de confiança de 95%, α é 0,05 e o valor crítico é 1,96). MOE é a margem de erro, p é a proporção amostral teórica, e n o tamanho total da população.

Os resultados do cálculo amostral prévio revelaram o número de alelos a amostrar em cada grupo (casos e controles) e as respectivas margens de erro e intervalos de confiança, como mostrados na Tabela 4 e no Gráfico 1.

Tabela 4 – Resultados do cálculo amostral prévio

| Margem de Erro (%) | IC (%) | n total a amostrar | n a amostrar em cada grupo |
|--------------------|--------|--------------------|----------------------------|
| 5 | 95 | 174 | 87 |
| 4 | 95 | 271 | 135,5 |
| 3 | 95 | 481 | 240,5 |
| 2 | 95 | 1075 | 537,5 |
| 1 | 95 | 4164 | 2082 |
| 5 | 99 | 300 | 150 |
| 4 | 99 | 467 | 233,5 |
| 3 | 99 | 827 | 413,5 |
| 2 | 99 | 1842 | 921 |
| 1 | 99 | 6981 | 3490,5 |

Resultado do cálculo amostral prévio, segundo as possíveis margens de erro, intervalo de confiança e número de indivíduos a amostrar segundo as variantes do gene *APOE*.

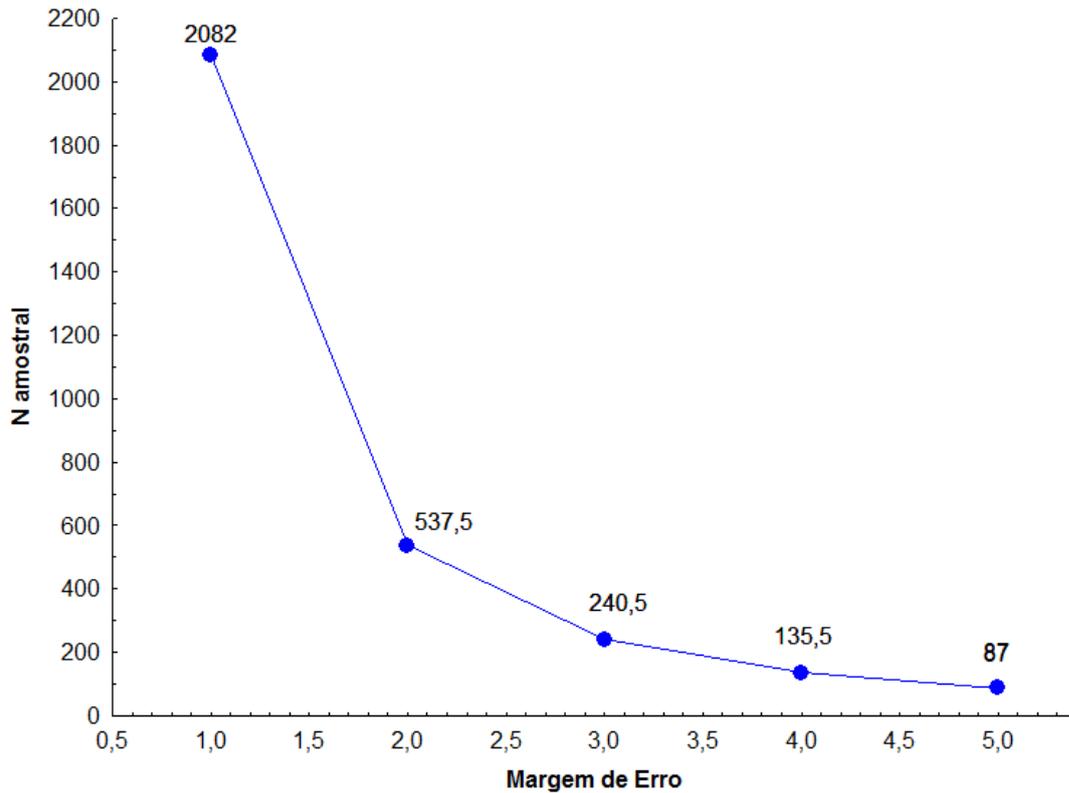


Gráfico 1 - Resultados do cálculo amostral prévio

Considerando-se a frequência média de cada um dos três alelos possíveis para o gene *APOE* descritos na literatura (198,199) de 5% a 10% para o alelo E2 (optou-se, para o cálculo, por um valor médio de 8%), de 70% a 80% para o alelo E3 (optou-se por um valor médio de 75%), e de 10% a 15% para o alelo E4 (optou-se por um valor médio de 13%) e estabelecendo uma margem de erro de 3% como razoável, o cálculo resultante demonstrou que o estudo exigiria amostrar aproximadamente 240,5 indivíduos para o grupo caso e 240,5 indivíduos para o grupo controle e, se fosse escolhida uma margem de erro ainda menor, de 2%, o valor amostral resultante seria de 537,5 indivíduos para cada grupo. Estimando-se a viabilidade logística da estrutura técnica disponível e do tempo para a realização deste projeto durante o período regulamentar do programa de pós-graduação, elegeu-se como meta amostrar 400 indivíduos em cada grupo.

4. RESULTADOS

4.1. Dados demográficos e estatística descritiva

Considerando todos os pacientes incluídos no estudo, avaliados para as variantes do gene *APOE*, 803 indivíduos não relacionados foram analisados, sendo 402 com GPAA (grupo caso) e 401 sem a doença (grupo controle).

Os resultados sobre a frequência da variável gênero foram os seguintes: a) na amostra total, 418 (52,05%) eram do sexo masculino, e 385 (47,95%) eram do sexo feminino; b) dos pacientes portadores de GPAA, 219 (54,48%) eram do sexo masculino, e 183 (45,52%) do sexo feminino; c) dos indivíduos do grupo controle, 199 (49,63%) eram do sexo masculino, e 202 (50,37%) do sexo feminino. Ao compararmos casos e controles, utilizando o teste qui-quadrado, não houve diferença estatisticamente significativa em relação ao gênero ($p=0,1688$) (Tabela 5).

Tabela 5 - Frequência da variável gênero na amostra ($p=0,169$)

| Grupo | Mulheres | Homens |
|-----------|--------------|--------------|
| Casos | 183 (45,52%) | 219 (54,48%) |
| Controles | 202 (50,37%) | 199 (49,63%) |
| Total | 385 (47,95%) | 418 (52,05%) |

A média de idade dos pacientes com GPAA foi de $68,48 \pm 11,20$ anos, com mediana de 70 anos, variando de 40 a 92 anos. No grupo controle, a média de idade foi de $65,08 \pm 11,13$ anos, com mediana de 66 anos, variando de 40 a 89 anos (Tabela 6 e Figura 7). O teste de Mann-Whitney revelou que a média de idade do grupo caso foi significativamente maior que a do grupo controle ($p<0,001$), razão pela qual realizou-se o ajuste pela idade em todas as regressões logísticas, a serem apresentadas mais à frente.

Tabela 6 - Estatística descritiva da variável idade em casos e controles ($p<0,001$)

| Grupo | n | Média | DP | Mínimo | 1º quartil | Mediana | 3º quartil | Máximo |
|-----------|-----|-------|-------|--------|------------|---------|------------|--------|
| Casos | 402 | 68,48 | 11,20 | 40 | 61 | 70 | 77 | 92 |
| Controles | 401 | 65,08 | 11,13 | 40 | 57 | 66 | 73 | 89 |

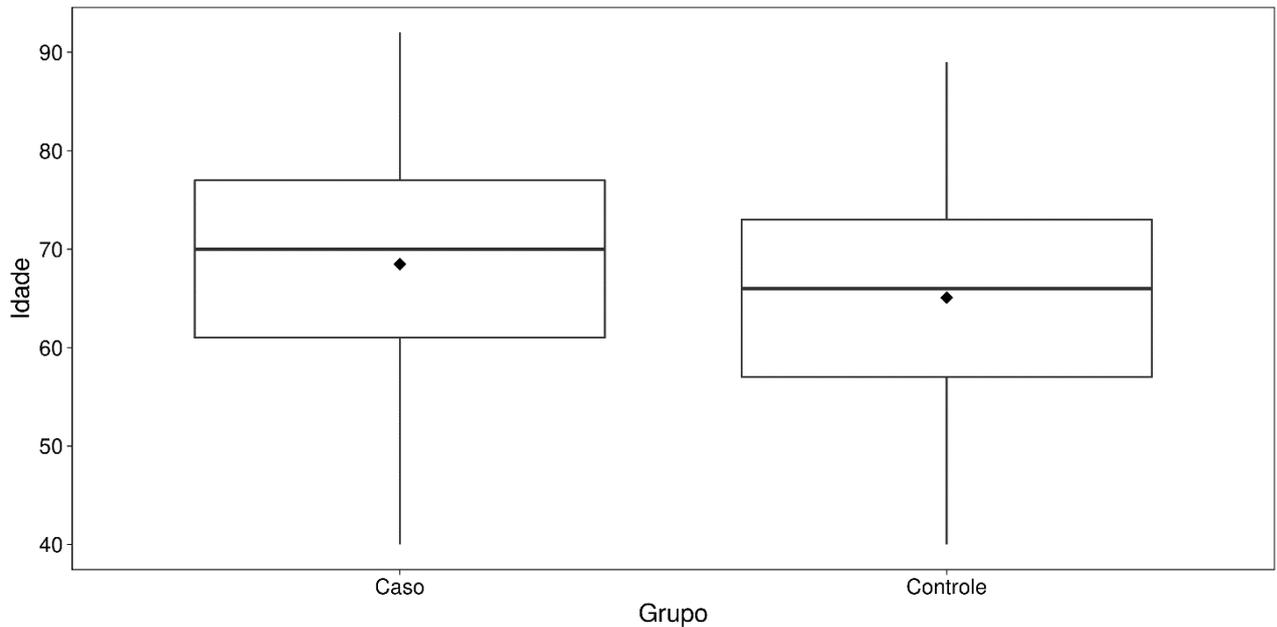


Figura 7 - *Box-plot* representando a estatística descritiva da variável idade nos grupos caso e controle

Obs.: Os losangos dentro da caixa representam a média das observações e a reta central no interior da caixa representa a mediana.

4.2. Análise dos polimorfismos rs429358 e rs7412 do gene *APOE*

4.2.1. Avaliação do Equilíbrio de Hardy-Weinberg em casos e controles

Na amostra de indivíduos avaliados para as variantes que compõem os haplótipos do gene *APOE* (rs429358 e rs 7412), observou-se que, tanto nos casos como nos controles, não houve uma diferença entre as frequências dos genótipos observadas e as esperadas, atestando que ambas as populações encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg (grupos caso e controle com $p > 0,05$ para ambos os SNPs).

4.2.2. Frequência alélica

A frequência alélica encontrada em nossa amostra está demonstrada na Tabela 7.

Tabela 7 - Frequência de alelos do gene *APOE* em pacientes com GPAA e controles ($p=0,161$)

| Alelos <i>APOE</i> | GPAA n (%) | Controles n (%) |
|---------------------------|-------------------|------------------------|
| E2 | 69 (8,58) | 49 (6,11) |
| E3 | 643 (79,97) | 656 (81,79) |
| E4 | 92 (11,44) | 97 (12,09) |

O teste qui-quadrado não demonstrou diferenças significativas na comparação da frequência alélica do gene *APOE* entre os grupos caso e controle ($p=0,161$).

4.2.3. Frequência genotípica

A frequência genotípica encontrada em nossa amostra está demonstrada na Tabela 8, e nas Figuras 8 (frequência genotípica geral de toda a amostra somando casos e controles), 9 (frequência genotípica nos grupos caso e controle), e 10 (frequência específica de alelos e genótipos do gene *APOE* nos grupos caso e controle).

Tabela 8 - Frequência de genótipos do gene *APOE* em pacientes GPAA e controles ($p=0,116$)

| Genótipos <i>APOE</i> | GPAA n (%) | Controles n (%) |
|------------------------------|-------------------|------------------------|
| E2-E2 | 1 (0,25) | 1 (0,25) |
| E2-E3 | 64 (15,92) | 41 (10,22) |
| E2-E4 | 3 (0,75) | 6 (1,50) |
| E3-E3 | 254(63,18) | 267(66,58) |
| E3-E4 | 71(17,66) | 81(20,20) |
| E4-E4 | 9(2,24) | 5(1,25) |

O teste exato de Fisher não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre as frequências genotípicas de casos e controles ($p=0,116$).

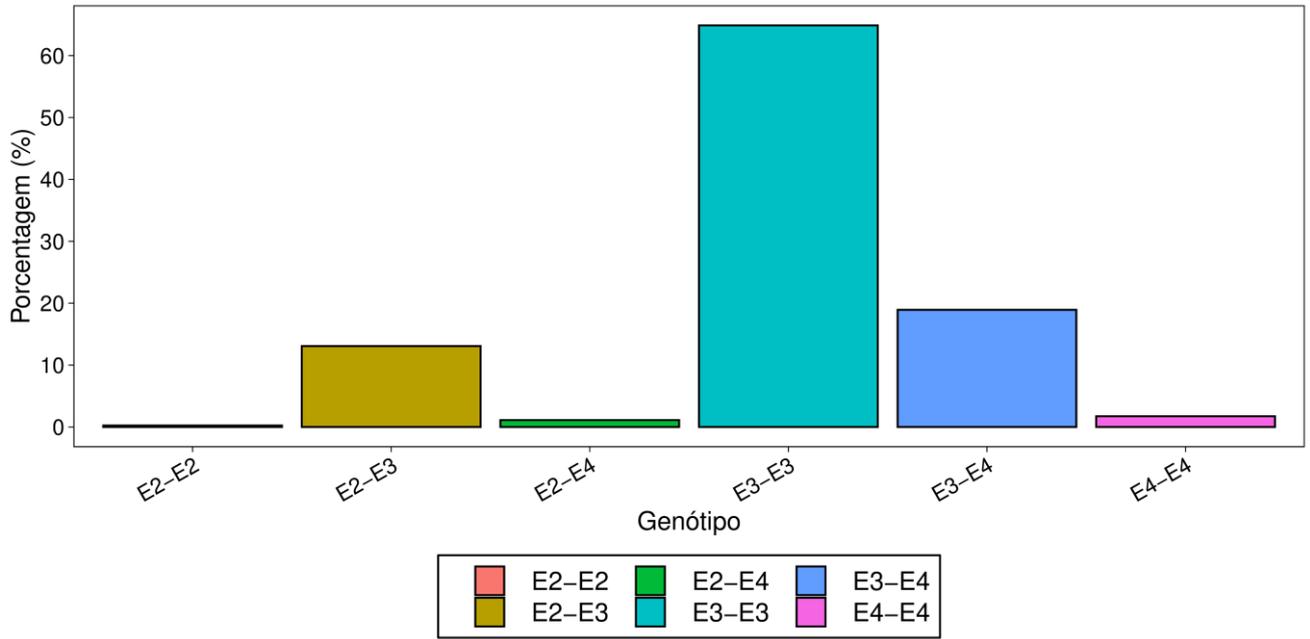


Figura 8 - Frequência geral dos genótipos *APOE* em toda a amostra (casos e controles)

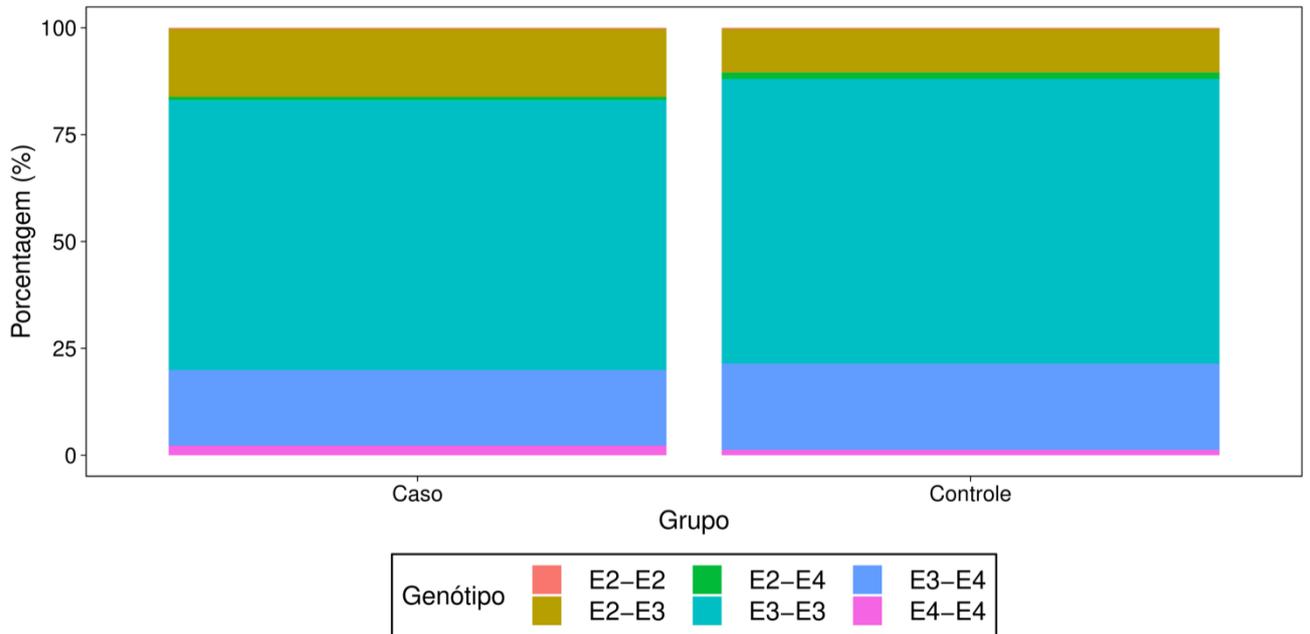


Figura 9 - Frequência dos genótipos do gene *APOE* nos grupos caso e controle

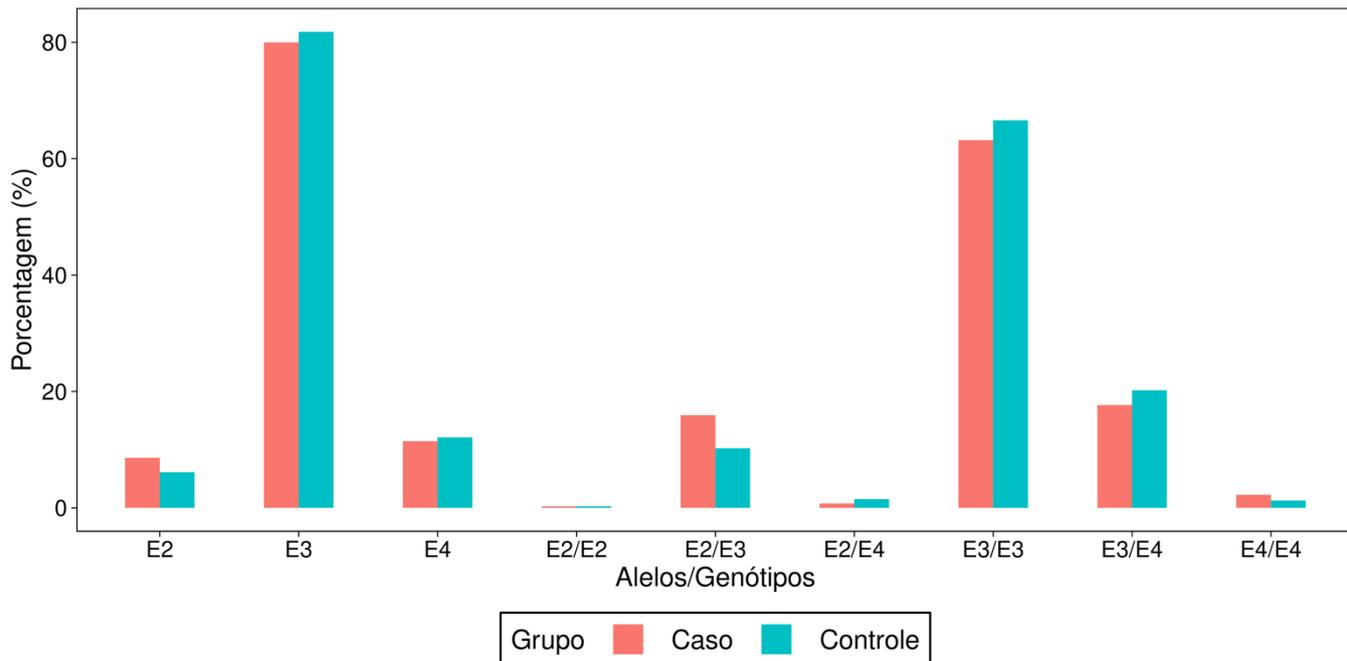


Figura 10 - Frequência específica de alelos e genótipos do gene *APOE* nos grupos caso e controle

4.2.4. Modelos de regressão logística

Realizou-se a análise comparativa de todos os portadores dos alelos variantes E2 e E4, assim como de cada genótipo específico com o genótipo homocigoto E3, através de modelos de regressão logística. Também foi incluído um modelo genético aditivo comparando todos os portadores do alelo E2 (E2-E2+E2-E3+E2E4) com os não-portadores do alelo E2 (E3-E3+E3-E4+E4-E4) somados, a fim de se obter uma confirmação estatística adicional.

4.2.4.1. Análises comparativas entre portadores dos alelos E2 e E4, e entre cada genótipo específico com o genótipo de referência E3-E3

Após o devido ajuste por idade, observamos que os pacientes portadores do alelo E2 tiveram um risco 51% maior de desenvolver GPAA do que um paciente da mesma idade portador do genótipo de referência E3 ($OR=1.516$; $p=0,048$), enquanto os pacientes portadores do alelo E4 em nossa amostra apresentaram a mesma chance de desenvolver GPAA do que pacientes com o genótipo de referência ($OR=0,987$, $p=0,944$). Além disso, os portadores do genótipo E2-E3 mostraram um risco 65% maior de desenvolver GPAA do que um paciente da mesma idade portador

do genótipo de referência E3-E3 ($OR=1,655$; $p=0,022$). Finalmente, uma associação significativa foi encontrada através do modelo genético aditivo, que ratificou os achados anteriores sobre a influência do alelo E2 exercendo maior risco para o desenvolvimento de GPAA ($OR=1,502$; $p=0,047$) (Tabela 9).

Tabela 9 - Regressão logística para avaliação do risco de apresentar GPAA entre os portadores de alelos E2 e E4 *versus* genótipo E3-E3; entre cada genótipo *APOE*, e através de modelo genético aditivo

| Comparação genotípica | OR | IC 95% | p |
|---|-------|-------------|-------|
| Portadores E2 vs E3-E3 | 1,516 | 1,005-2,302 | 0,048 |
| Portadores E4 vs E3-E3 | 0,987 | 0,698-1,396 | 0,944 |
| E2-E3 vs E3-E3 | 1,655 | 1,077-2,568 | 0,022 |
| E2-E4 vs E3-E3 | 0,597 | 0,123-2,323 | 0,474 |
| E3-E4 vs E3-E3 | 0,953 | 0,660-1,374 | 0,796 |
| E4-E4 vs E3-E3 | 2,202 | 0,745-7,298 | 0,165 |
| (E2-E2+E2-E3+E2-E4) vs (E3-E3+E3-E4+E4-E4) | 1,502 | 1,006-2,258 | 0,047 |

Obs.: O genótipo E2-E2 foi excluído das comparações genotípicas com o genótipo de referência E3-E3 devido à baixa frequência encontrada em nossa amostra (apenas um indivíduo E2-E2 em cada grupo).

4.2.4.2. Análises da relação entre os indivíduos portadores dos alelos *APOE* E2, E3 e E4, e de cada genótipo separadamente, com a necessidade de realização e o número de cirurgias antiglaucomatosas

Avaliou-se, ainda, a associação entre os portadores dos alelos *APOE* E2 e E4 e a necessidade de serem submetidos à cirurgia antiglaucomatosa. Dentre os 402 pacientes de GPAA, 383 (95,27%) foram analisados sobre este tema, já que 19 pacientes não possuíam dados suficientes. O teste exato de Fisher demonstrou que não houve correlação entre quaisquer genótipos e a necessidade de cirurgia antiglaucomatosa ($p=0,193$). O teste Qui-quadrado revelou que a necessidade de cirurgia antiglaucomatosa foi similar entre os indivíduos portadores dos alelos *APOE*-E2, E3 e E4 ($p=0,383$). (Tabela 10).

Tabela 10 - Necessidade de cirurgia antiglaucomatosa entre os genótipos e portadores dos alelos *APOE* E2, E3 e E4

| Genótipos e portadores de alelos <i>APOE</i> | Sem cirurgias | Cirurgia antiglaucomatosa realizada | <i>p</i> |
|--|---------------|-------------------------------------|------------------|
| | (n) | (n) | |
| E2-E2 | 0 | 1 | |
| E2-E4 | 0 | 3 | |
| E2-E3 | 29 | 29 | <i>p</i> = 0,193 |
| E3-E3 | 116 | 128 | |
| E3-E4 | 26 | 43 | |
| E4-E4 | 5 | 3 | |
| | [n(%)] | [n(%)] | |
| Portadores E2 | 29 (46,78) | 33 (53,22) | <i>p</i> = 0,383 |
| Portadores E4 | 31 (38,75) | 49 (61,25) | |
| E3-E3 | 116 (47,54) | 128 (52,46) | |

Por fim, o teste de Kruskal-Wallis revelou que a quantidade de cirurgias antiglaucomatosas realizadas não diferiu estatisticamente em cada genótipo separadamente analisado ($p=0,376$), assim como nos indivíduos portadores do alelo E2, nos portadores do E4, e nos homozigotos E3 ($p=0,350$). (Tabela 11).

Tabela 11 - Números de cirurgias antiglaucomatosas realizadas dentre os genótipos e portadores dos alelos *APOE* E2, E3 e E4

| Genótipos e portadores alelos <i>APOE</i> | Número de cirurgias antiglaucomatosas realizadas | Média (DP) | <i>p</i> |
|---|--|-------------|----------|
| E2-E3 | 44 | 0,72 (0,83) | |
| E2-E4 | 3 | 1,67 (0,58) | |
| E3-E3 | 182 | 0,75 (0,87) | 0,376 |
| E3-E4 | 63 | 0,91 (0,85) | |
| E4-E4 | 5 | 0,63 (0,92) | |
| Portadores E2 | 49 | 0,79 (0,85) | |
| Portadores E4 | 73 | 0,91 (0,86) | 0,350 |
| E3-E3 | 182 | 0,75 (0,87) | |

5. DISCUSSÃO

Com o propósito de avaliar o efeito das variantes do gene *APOE* em relação ao risco de desenvolvimento do GPAA, este estudo de associação foi conduzido em uma amostra de 803 indivíduos provenientes da região sudeste do Brasil. Trata-se do primeiro estudo com este propósito realizado em uma população brasileira.

A evolução biológica do *APOE*, assim como condições ambientais e características ligadas ao estilo de vida próprio de cada povo, podem influenciar a sua frequência genotípica. Estudos realizados em primatas não-humanos revelaram que todos eram portadores de formas similares ao *APOE-E4*, confirmando a hipótese que o alelo ancestral é realmente o E4, e que as variantes E2 e E3 surgiram após a divisão evolucionária que separou os humanos das linhagens de chimpanzés (385,386).

Atualmente, o alelo *APOE-E3* é o mais frequente em todos os agrupamentos humanos, especialmente em populações com uma economia agrícola bem estabelecida por longo tempo, como, por exemplo, as mediterrâneas (85% a 90%) e as do leste asiático (82% a 97%). Por sua vez, a frequência do alelo *APOE-E4*, identificado como o verdadeiro alelo ancestral, permanece alta em algumas populações como a dos pigmeus (40%), Khoi San (37%), papuásicos (36%), lapões (31%), as de alguns americanos nativos (28%), de aborígenes da Malásia (24%) e da Austrália (26%), tendo todas elas como característica comum a persistência da agricultura de forrageamento ou o fato do suprimento de alimentos ser (ou ter sido até um passado recente) escasso ou qualitativamente pobre. A frequência do *APOE-E2* nas populações humanas varia sem nenhuma tendência específica, mas é ausente nos nativos americanos e aborígenes da Austrália, e alcança sua maior frequência entre os papuásicos, embora em todo mundo seja a variante menos frequente dentre as três possíveis para o gene *APOE* (212). Assim, a existência de diferenças regionais na frequência dos alelos *APOE* justificam a necessidade de realização de estudos de distribuição genética em diferentes áreas geográficas, incluindo a população brasileira.

As frequências alélicas por nós encontradas neste estudo foram: *APOE-E2* (7,34%), *APOE-E3* (80,88%), e *APOE-E4* (11,76%), similares às distribuições dos alelos do gene *APOE* reportadas em outras populações ao redor do mundo, cujos

resultados demonstraram frequências variando de 0 a 12% para o E2, de 75 a 90% para o E3 e de 6 a 20% para os alelos E4 (205,212–214). A Tabela 12 lista os resultados da frequência alélica de nossa amostra, comparada a outros estudos brasileiros e à frequência mundial. A frequência alélica descrita em nosso estudo, comparada aos outros estudos brasileiros publicados sobre o polimorfismo do *APOE*, mostrou-se similar e em conformidade com a distribuição descrita nas diversas populações ao redor do mundo. A exceção foi demonstrada no estudo de Alvim e col. (210), que apresentou uma frequência alélica discretamente menor que a mundial para os *APOE*-E3 e discretamente maior para os alelos *APOE*-E4.

Tabela 12 - Frequência alélica do *APOE* em amostra deste estudo comparada a outros estudos brasileiros e à abrangência da frequência alélica mundial

| Autor | Tacito e col. (209) | Alvim e col. (210) | Megale e col. (211) | Occhiutto e col. (387) | Varição da frequência alélica mundial (205,212–214) |
|-----------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|-------------------------------|--|
| Local | S.J. Rio Preto-SP | Vitória-ES | BambuÍ-MG | Campinas-SP | - |
| n total | 180 | 1493 | 1408 | 803 | - |
| <i>APOE</i>-E2 | 2,77% | 12,3% | 6,5% | 7,34% | 0%-12% |
| <i>APOE</i>-E3 | 86,11% | 61,1% | 80,0% | 80,88% | 75%-90% |
| <i>APOE</i>-E4 | 11,11% | 26,6% | 13,5% | 11,76% | 6%-20% |

Apesar da falta de consenso sobre a possibilidade de variantes do *APOE* influenciarem o risco de desenvolvimento do GPAA (301–306,309,310), a importância da proteína *APOE* no metabolismo lipídico e, conseqüentemente, na sobrevivência celular, especialmente das células neurais (332), juntamente às características fisiopatogênicas da neuropatia glaucomatosa (388), são elementos geradores de interesse científico que estimularam a conduzir este estudo.

Os resultados deste estudo revelaram diferenças significativas nas frequências dos portadores dos alelos *APOE*-E2 entre os pacientes portadores de GPAA e os indivíduos do grupo controle (portadores E2 vs E3-E3; $OR=1,516$; $p=0,048$). Esta associação foi confirmada quando realizada a comparação dos portadores do genótipo E2-E3 *versus* o genótipo de referência E3-E3 ($OR=1,655$; $p=0,022$), e quando os portadores E2 foram comparados com os não-portadores E2 ($OR=1,502$; $p=0,047$). Assim, várias análises indicaram que herdar o alelo E2 pode

ser um fator de risco para o desenvolvimento de GPAA nesta amostra da população brasileira.

Com o intuito de avaliar a correlação da agressividade do GPAA com a variante do *APOE* de cada grupo estudado, investigou-se se havia correlação entre o perfil genético e a necessidade ou o número de cirurgias antiglaucomatosas realizadas para o controle do glaucoma. Entretanto, nossos resultados mostraram que nem a necessidade de cirurgia ($p=0,383$), ou o número de cirurgias realizadas ($p=0,350$) diferiram nos portadores dos alelos *APOE*-E2, E3 e E4, assim como entre quaisquer genótipos.

Os estudos de associação até hoje publicados que investigaram o papel das variantes do *APOE* no risco de desenvolvimento do GPAA não foram consensuais (301-303,306,308–310,381,382,389). Mabuchi e col. (302) demonstraram que as frequências dos alelos E2 e do E4 foram significativamente menores nos pacientes japoneses portadores de GPAA (E2:2,6%; E4:6,0%) comparados aos indivíduos do grupo controle (*APOE*-E2: 5,0%, $p=0,048$; *APOE*-E4:10,6%, $p=0,012$). Já a frequência do alelo *APOE*-E3 foi significativamente maior no grupo de pacientes com GPAA (91,4%) comparados ao grupo controle (84,4%, $p=0,0010$) (302). Recentemente, Margeta e col. (311) publicaram um estudo utilizando dados obtidos pelo consórcio *NEIGHBOR* (com 2120 casos de GPAA e 2262 controles provenientes dos Estados Unidos da América), demonstrando que o alelo *APOE*-E4 foi associado a um risco reduzido de GPAA ($OR=0,81$; IC95%, 0,70-0,94; $p=0,0052$), e também de glaucoma de pressão normal ($OR=0,71$; IC95%: 0,58-0,87; $p=0,0014$). Interessantemente, o mesmo alelo *APOE*-E4 é positivamente associado à doença de Alzheimer (associação esta que motivou diversos pesquisadores a estabelecer uma hipotética ligação fisiopatogênica entre o glaucoma e o processo neurodegenerativo ocorrido na doença de Alzheimer), o que faz supor que há diferentes mecanismos biológicos envolvidos nestas enfermidades (311). Al-Dabbagh e col. (381) demonstraram que, na população saudita, a frequência do alelo *APOE*-E4 foi significativamente maior nos pacientes portadores de GPAA (9,5%) do que no grupo controle (4,2%; $p=0,034$; risco relativo=2,169), enquanto a frequência do alelo *APOE*-E3 foi significativamente menor nos pacientes glaucomatosos (90%) que nos controles (95,7%; $p=0,034$; risco relativo=0,473), sugerindo, portanto, que os alelos *APOE*-E4 e *APOE*-E3 seriam, de fato, fatores de risco e protetor, respectivamente. O alelo *APOE*-E2 foi inexistente em

ambos os grupos nesta população. Yuan e col. (304) também encontraram uma associação de risco positiva entre os portadores do alelo *APOE-E4* e o GPAA (37,5% GPAA vs 17,5% no grupo controle; $p < 0,05$), embora utilizando uma amostra muito reduzida da população chinesa (36 portadores de GPAA; 69 portadores de glaucoma primário de ângulo fechado, e 57 controles). Convém citar ainda o estudo conduzido por Vickers e col. (301), que demonstrou que, na população tasmaniana, o alelo *APOE-E4* é associado com elevado risco para alterações glaucomatosas, porém, não relacionado ao aumento da PIO. Nesse estudo, aproximadamente duas vezes mais indivíduos com glaucomas de pressão normal (38,0%) e glaucoma de PIO elevada (34,2%) eram portadores do alelo *APOE-E4* comparados ao grupo controle (18,9%). O risco dos portadores do alelo *APOE-E4* apresentarem glaucoma de pressão normal era duas vezes maior que a dos homozigotos E3 ($OR=2,45$, IC 95%: 1,02-5,91, $p=0,045$), mesmo após ajuste para idade e sexo ($OR=2,87$, IC 95%: 1,02-8,05, $p=0,046$). No entanto, os portadores de *APOE-E4* não apresentaram maior risco de desenvolvimento de glaucoma de PIO elevada (OR ajustado=1,74, IC 95%: 0,67-4,55) $p=0,26$) (301).

Há duas publicações sugerindo uma associação de risco entre o alelo *APOE-E2* e glaucoma: Jünemann e col. (303) demonstraram que a curva tensional de 24 horas teve valores significativamente maiores em indivíduos alemães portadores do alelo *APOE-E2* ($17,7 \pm 2,7$ mmHg vs $16,4 \pm 2,4$ mmHg, $p = 0,011$). A espessura corneana central não foi diferente entre os portadores de alelos *APOE-E2* e o grupo de referência (genótipo E3-E3) (587 ± 33 μ m vs 586 ± 51 μ m, $p=0,973$) (303). Chiras e col. (390) demonstraram que o alelo *APOE-E2* está associado a um risco elevado de desenvolvimento de GPAA na população grega. A frequência de portadores do alelo *APOE-E2* em portadores de GPAA (19%) foi significativamente maior do que a observada nos controles (5%) ($OR=4,35$, IC95%: 1,28-14,72, $p=0,012$) (390).

Algumas metanálises não encontraram associação entre o gene *APOE* e glaucoma (391,392), enquanto outras descreveram uma associação entre o genótipo *APOE-E4-E4* e o GPAA em asiáticos (353,393). A diversidade de resultados pode ser atribuída às especificidades étnicas de cada população, assim como à intrínseca suscetibilidade genética a fatores ambientais, que podem influenciar a patogênese do GPAA.

A base teórica utilizada por muitos autores para estabelecer uma possível correlação etiopatogênica entre os portadores *APOE*-E4 e o glaucoma – atualmente considerada uma doença neurodegenerativa (394), reside no fato desta variante do *APOE* ser identificada mais frequentemente entre portadores de doenças neurodegenerativas, como o mal de Alzheimer e a doença de Parkinson (334,395–397). Porém, como mencionado anteriormente, apesar de alguns estudos indicarem a correlação positiva entre o alelo *APOE*-E4 e o glaucoma (353,381,393), outros demonstraram um efeito protetor deste mesmo alelo (311). Este aparente paradoxo reflete quão abstrusa ainda é a compreensão da totalidade de fatores genéticos, interagindo com os ambientais, que fazem, em determinada população, um mesmo alelo ser de risco ou de proteção para uma mesma doença.

O presente estudo é o primeiro a indicar que portadores do alelo *APOE*-E2, especialmente os portadores de genótipo E2-E3, possuem maior risco para desenvolvimento do GPAA. A variante *APOE*-E2 já foi descrita como sendo de risco para algumas doenças metabólicas e neurológicas (398–405), o que fornece subsídios para explicar a possível correlação entre o alelo *APOE*-E2 e o GPAA.

Estudos tipo GWAS destacaram a participação de diversas variantes comuns, com uma diversidade de mecanismos biológicos envolvidos, influenciando a fisiopatologia do diabetes mellitus tipo-2 (406,407). Santos-Ferreira e col. (404) conduziram um estudo com 436 pacientes portugueses seguidos por um tempo médio de 15 anos e identificaram uma incidência de diabetes mellitus tipo-2 duas vezes maior nos portadores *APOE*-E2 comparados aos homozigotos E3 ($OR=1,8$, IC 95%: 1,1-2,9, $p=0,03$) (404). Similarmente, Gonzalez-Aldaco e col. (398) demonstraram que o alelo *APOE*-E2 foi associado à resistência insulínica anormal, e a maior risco de diabetes mellitus tipo-2, em uma população do oeste mexicano. Neste estudo, na comparação entre pacientes diabéticos *versus* não-diabéticos, o genótipo E2-E3 ou o alelo *APOE*-E2 conferiram um maior risco de diabetes mellitus tipo-2 (OR ajustado=2,36, IC 95%:1,28-4,34, $p=0,006$, e OR ajustado=2,1, IC 95%:1,20-3,79, $p=0,009$, respectivamente) (398). Por sua vez, há várias evidências na literatura indicando uma associação entre o GPAA e a diabetes tipo-2 (408–416). Em uma metanálise incluindo 2.981.342 indivíduos provenientes de 16 países, Zhao e col. (410) concluíram que o risco relativo para glaucoma, comparando pacientes diabéticos aos não-diabéticos, foi de 1,48 (IC 95%:1,29-1,71), risco este que cresceu 5% (IC 95%:1%-9%) a cada ano

após o diagnóstico de diabetes. Vários mecanismos fisiopatológicos comuns foram postulados como participantes de uma possível ligação entre o glaucoma e a retinopatia diabética. A hiperglicemia no diabetes está associada ao fenômeno de glicação dos lípidos e alterações no metabolismo lipídico, o que pode induzir a um aumento de estresse oxidativo e promover a apoptose celular, o mesmo mecanismo pelo qual ocorre a morte das CGRs no glaucoma (417–426). Outras vias que podem explicar uma associação entre diabetes e glaucoma incluem: (a) disfunção das células gliais e diminuição do transporte axonal retrógrado (417); (b) desregulação vascular e regulação positiva do óxido nítrico (427,428); (c) diminuição da liberação de fatores neurotróficos secundária a anormalidades no transporte axonal (429–431); e (d) apoptose das CGRs e afinamento da camada de fibras nervosas (432–434). Portanto, é possível supor que os portadores *APOE-E2* poderiam desencadear alterações metabólicas que induzissem tanto ao desenvolvimento de diabetes tipo-2 como de GPAA em indivíduos suscetíveis.

Estudos demonstraram que os portadores *APOE-E2* podem apresentar um risco aumentado de instabilidade vascular e para o fenômeno hemorrágico. Biffi e col. (435) conduziram um estudo de associação genética em grande escala contabilizando 2189 casos de hemorragia intracerebral e 4041 controles provenientes de sete diferentes coortes. A metanálise, realizada através do modelo de efeito aleatório, demonstrou que os alelos *APOE-E2* e *APOE-E4* foram associados à hemorragia intracerebral lobar, com níveis de significância significativos ($OR=1.82$, IC 95%:1.50-2.23, $p= 6.6 \times 10^{-10}$; e $OR=2.20$, IC 95%: 1.85-2.63, $p= 2,4 \times 10^{-11}$, respectivamente). O alelo *APOE-E4* também foi associado a um risco aumentado para hemorragia intracerebral profunda ($OR=1.21$, IC 95%: 1,08-1,36, $p=10^{-4}$) (435). O mecanismo através do qual a *APOE* afeta a ocorrência de hemorragia intracerebral não foi ainda elucidado. Contudo, algumas hipóteses foram defendidas sugerindo que tanto a variante *APOE-E4* como a *APOE-E2* causam alterações no metabolismo lipídico: a *APOE-E2* fazendo com que os vasos carregados de amilóide desencadeiem a vasculopatia que culmina em sua ruptura; e a *APOE-E4* aumentando expressivamente a deposição de amilóide (436). Pawlikovska e col. (437) demonstraram que indivíduos norte-americanos portadores do alelo *APOE-E2* com malformação arteriovenosa cerebral apresentaram um risco cinco vezes maior de um novo episódio de hemorragia intracraniana, ($Hazard\ ratio=5,09$, IC95%: 1,46-17,7, $p=0,010$) (437). Achrol e col.

(438) demonstraram que o risco de hemorragia intracraniana em pacientes após o tratamento inicial de malformação arteriovenosa cerebral (embolização, ressecção da malformação arteriovenosa, radio-cirurgia, ou qualquer combinação destes) também foi aumentado em portadores do alelo *APOE-E2* (*Hazard ratio*=3,2; IC95%: 1,0-0,7, $p=0,042$), o que sugere uma maior instabilidade vascular nestes pacientes. Por sua vez, a instabilidade vascular é também aventada como um mecanismo potencialmente envolvido na patogênese do glaucoma, especialmente por conferir vulnerabilidade às CGRs (439). Ademais, a hemorragia no disco óptico é considerada um dos mais relevantes fatores de risco para o desenvolvimento (440) e progressão do glaucoma (441). Desse modo, poderia existir um elo entre a indução de instabilidade vascular provocada pela *APOE-E2* e a suscetibilidade para a ocorrência de fenômenos hemorrágicos no disco óptico (442).

Algumas doenças neurológicas, como as tauopatias, que são caracterizadas por um processo neurodegenerativo devido à deposição de proteína tau anormal no cérebro (443) são mais prevalentes em indivíduos portadores do genótipo E2-E2 (405). Recentemente, Charidimou e col. (444) realizaram uma metanálise com o intuito de definir os polimorfismos do *APOE* relacionados à siderose cortical superficial (cSS), que é um biomarcador amplamente utilizado para o estadiamento da angiopatia amilóide cerebral. Os resultados demonstraram um risco significativamente aumentado de cSS nos genótipos *APOE-E2* ($OR=2,42$, IC 95%: 1,48-3,95), especialmente nos genótipos E2-E2 e o E2-E4, que parecem ser os mais consistentemente associados com a presença e severidade de cSS (444).

Tanto as variantes *APOE-E4* como a *APOE-E2* podem ter efeitos diretos no metabolismo do tecido neural (445–447), e em outros órgãos (448–450). Entretanto, os estudos especificamente desenhados para avaliar as funções primordiais da proteína *APOE2*, como seu efeito na integridade sináptica, ação antioxidante e especificidade com receptores são ainda escassos, havendo um número muito maior de publicações focadas nos portadores da variante *APOE-E4*, justamente pela sua conhecida associação com doenças neurológicas como Alzheimer, Parkinson, e acidente vascular cerebral isquêmico (332). Porém, é pertinente pontuar que a participação em eventos neurodegenerativos não é exclusiva a portadores do *APOE-E4* (451), e ambos *APOE-E2* e *APOE-E4* poderiam influenciar

os mecanismos biológicos que levam à degeneração do nervo óptico em pacientes glaucomatosos.

A DMRI é a doença ocular onde a associação com os polimorfismos do *APOE* tem sido melhor demonstrada. A maior parte dos estudos publicados indicaram que o alelo *APOE*-E4 exerce um papel protetor na DMRI, enquanto o alelo *APOE*-E2 é considerado um fator de risco para o desenvolvimento da doença por alguns autores (271,275,452). Alguns estudos sugerem que os portadores do *APOE*-E2 promovem um incremento de VEGF (*vascular endothelial growth factor*) na retina, o que por sua vez estimula o desenvolvimento da DMRI neovascular (453–455). Várias citocinas inflamatórias, dentre elas a b-FGF (*basic Fibroblast growth factor*), VEGF, e a PDGF-BB (*platelet-derived growth factor-BB*), são super-reguladas significativamente após indução com *APOE*2, através da ativação da via MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), processo que afeta a suscetibilidade ao desenvolvimento da DMRI neovascular (456). Assim, a *APOE*2 sérica tem sido indicada como um possível biomarcador para a DMRI neovascular precoce (456). Nosso grupo recentemente concluiu um estudo caso-controle incluindo 963 indivíduos brasileiros, que confirmou o papel protetor da variante *APOE*-E4 no desenvolvimento da DMRI (Viturino e col.; dados não publicados). Como há uma associação provável entre os polimorfismos do *APOE* e a DMRI, decidiu-se pela exclusão de todos os portadores de DMRI na seleção dos indivíduos (grupos caso e controle) que fizeram parte da amostra do presente estudo.

Há vários pontos relevantes que exaltam a importância do atual estudo: (a) mesmo tratando-se de um estudo unicêntrico, o número de indivíduos envolvidos foi significativo (n=803), ficando numericamente atrás apenas de um estudo multicêntrico recentemente publicado por Margeta e col. (311) (n=4382), que utilizaram dados provenientes do consórcio NEIGHBOR (311,457) (Quadro 3); (b) trata-se do primeiro estudo que estabeleceu uma associação de risco entre o gene *APOE* e o GPAA em uma população brasileira. Considerando-se a alta diversidade e características específicas de nossa população, inaugurar uma investigação nesta temática pode estimular a complementação dos resultados por nós obtidos em outras partes de nosso país, que possui dimensões continentais e, conseqüentemente, uma ampla diversidade genética.

Quadro 3 - Estudos que investigaram a relação das variantes do gene *APOE* com glaucoma

| Autoria, ano | País | Etnia | Espaço amostral (casos/controles) |
|-------------------------|---------------------------|--------------|--|
| Occhiutto, 2021 (387) | Brasil | Mista | 402/401 |
| Margeta, 2020 (311) | Estados Unidos da América | Mista | 2120/2262 |
| Saglar, 2009 (382) | Turquia | Caucasiana | 75/119 |
| Jia, 2009 (307) | China | Asiática | 176/200 |
| Al-Dabbagh, 2009 (381) | Arábia Saudita | Caucasiana | 60/130 |
| Hu, 2007 (458) | China | Asiática | 142/77 |
| Zetterberg, 2007 (309) | Estônia | Caucasiana | 242/187 |
| Yuan, 2007 (304) | China | Asiática | 36/57 |
| Lam, 2006 (306) | China | Asiática | 400/300 |
| Mabuchi, 2005 (302) | Japão | Asiática | 310/179 |
| Ressiniotis, 2004 (308) | Reino Unido | Caucasiana | 137/75 |
| Lake, 2004 (310) | Reino Unido | Caucasiana | 155/349 |
| Jünemann, 2004 (303) | Alemanha | Caucasiana | 96/32 |
| Vickers, 2002 (301) | Austrália | Caucasiana | 142/51 |

Como limitações deste estudo pode-se listar: (a) na seleção dos indivíduos participantes desta pesquisa, foram excluídos os portadores de DMRI e doenças neurodegenerativas devido à associação positiva já descrita entre os polimorfismos do gene *APOE* e estas doenças, mas não excluídas outras patologias sistêmicas que podem guardar relação com este gene, como a aterosclerose (459) e algumas doenças renais raras, como a glomerulopatia lipoprotéica (460); (b) a estratégia utilizada neste estudo foi a obtenção de uma amostragem por conveniência clínica, uma vez preenchidos os critérios de inclusão e exclusão, e não um estudo populacional, o que permitiria uma maior generalização dos resultados. Porém, como atenuante, os dois SNPs analisados estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg tanto no grupo caso como no controle, e as frequências alélicas encontradas concordaram com o percentual descrito na literatura mundial e na maior parte dos estudos brasileiros; (c) embora o espaço amostral tenha sido relevante para um estudo unicêntrico, contabilizando 803 indivíduos, comparado aos outros 12 estudos publicados que investigaram a associação entre os polimorfismos do *APOE* e o GPAA (311,392,393) um maior número de indivíduos provenientes de diferentes regiões geográficas é necessário para confirmar os achados de estudos específicos para um gene-candidato, especialmente quando algumas variantes genéticas são raras; (d) o número reduzido de indivíduos homocigotos E2-E2 impediu o cálculo para determinar se este genótipo produziria um risco adicional comparativamente aos heterocigotos

E2-E3; (e) não foram analisadas, neste estudo, as possíveis interações gene-gene com outras variantes genéticas já descritas como indutoras de risco para o desenvolvimento do GPAA, mas a avaliação poligênica não fazia parte do escopo deste estudo. Entretanto, a investigação simultânea de múltiplos genes de risco para o GPAA poderá ser realizada em estudos futuros (461).

A compreensão dos polimorfismos do gene *APOE* relacionados ao risco de desenvolvimento do GPAA em distintas populações, especialmente em uma população geneticamente tão diversa como a brasileira, reveste-se de substancial importância. Acredita-se que o melhor entendimento da influência genética das variantes do *APOE* na instalação e/ou progressão do GPAA, e de suas implicações fisiopatológicas, poderá propiciar a obtenção de meios para a criação de novos alvos diagnósticos e terapêuticos.

6. CONCLUSÕES

A frequência alélica do gene *APOE* encontrada nesta amostra da população brasileira foi de 7,34% para o alelo *APOE*-E2, 80,88% para o alelo *APOE*-E3 e 11,76% para o alelo *APOE*-E4

Os resultados deste estudo sugerem que os indivíduos portadores do alelo *APOE* E2, especialmente os portadores do genótipo E2-E3, possuem um maior risco de desenvolvimento de GPAA, nesta amostra da população brasileira.

Os dados encontrados neste estudo permitiram inferir que a necessidade de realização de um procedimento cirúrgico antiglaucomatoso, ou o número de cirurgias antiglaucomatosas efetuado, não foram diferentes entre os portadores das variantes E2 ou E4, assim como entre os genótipos do gene *APOE* avaliados.

7. REFERÊNCIAS

1. Jonas JB, Aung T, Bourne RR, Bron AM, Ritch R, Panda-Jonas S. Glaucoma. *Lancet*. 2017;390(10108):2183–93.
2. Kumar S, Malik MA, Kaur J, Sihota R. Genetic variants associated with primary open angle glaucoma in Indian population. *Genomics*. 2017;109(1):27–35.
3. Tham YC, Li X, Wong TY, Quigley HA, Aung T, Cheng C-Y. Global Prevalence of Glaucoma and Projections of Glaucoma Burden through 2040: a systematic review and meta-analysis. *Ophthalmology*. 2014;121:2081–90.
4. Quigley H, Broman AT. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br J Ophthalmol*. 2006; 90(3):262–7.
5. Kapetanakis V V., Chan MPY, Foster PJ, Cook DG, Owen CG, Rudnicka AR. Global variations and time trends in the prevalence of primary open angle glaucoma (POAG): A systematic review and meta-analysis. *Br J Ophthalmol*. 2016;100(1):86–93.
6. Prum Jr. BE, Rosenberb LF, Gedde SJ, Mansberger SL, Stein JD, Moroi SE, et al. Primary Open-Angle Glaucoma Preferred Practice Pattern® Guidelines. *Ophthalmology*. 2016; 123(1):P41-P111.
7. Sampaolesi R, Sampaolesi JR ZJ. *The Glaucomas*. vol. II. Open Angle Glaucoma and Angle Closure Glaucoma. 1st ed. Sampaolesi R, Sampaolesi JR ZJ, editors. Berlin: Springer-Verlag; 2014. p.709–733.
8. Weinreb RN, Aung T, Medeiros FA. The pathophysiology and treatment of glaucoma: a review. *JAMA*. 2014;14(311):1901–11.
9. Vranka JA, Kelle MJ, Acott TS, Keller KS. Extracellular matrix in the trabecular meshwork: intraocular pressure regulation and dysregulation in glaucoma. *Exp Eye Res*. 2015;(133):112–25.
10. Twa MD. Intraocular Pressure and Glaucoma. *Optom Vis Sci*. 2018;95(2):83–5.
11. Coleman AL, Brigatti L. *The Glaucomas*. *Minerva Med*. 2001;92(5):365–79.
12. Perez CII, Chansangpetch S, Mora M, Nguyen A, Zhao J, Han Y, et al. Ethnicity-Specific Database Improves the Diagnostic Ability of Peripapillary Retinal Nerve Fiber Layer Thickness to Detect Glaucoma. *Am J Ophthalmol*. 2021;(221):311–22.
13. Jasty U, Harris A, Siesky B, Rowe LW, Vercellin ACV, Mathew S, et al. Optic disc haemorrhage and primary open-angle glaucoma: a clinical review. *Br J Ophthalmol*. 2020;104(11):1488–91.
14. Guedes G, Tsai JC, Loewen NA. Glaucoma and aging. *Curr Aging Sci*. 2011;4(2):110–7.
15. Leeman M, KestelynPhilippe. Glaucoma and Blood Pressure. *Hypertension*. 2019;73(5):944–50.
16. Marcus MW, Vries MM, Montolio, Jansonius NM. Myopia as a risk factor for open-angle glaucoma: a systematic review and meta-analysis. *Ophthalmology*.

- 2011;118(10):1989-1994.e2.
17. Allingham RR, Damji KF, Freedman S, Moroi SE, Shafranov G. Shields Textbook of Glaucoma. 5th ed. Allingham RR, Damji KF, Freedman S, Moroi SE, Shafranov G, Shields MB, editors. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2005. p.170–190.
 18. Blumberg D, Skaat A, Liebmann JM. Emerging risk factors for glaucoma onset and progression. *Progr Brain Res*. 2015; 221:81-101.
 19. Sommer A, Tielsch JM, Katz J, Quigley HA, Gottsch JD, Javitt J, et al. Relationship Between Intraocular Pressure and Primary Open Angle Glaucoma Among White and Black Americans: The Baltimore Eye Survey. *Arch Ophthalmol*.1991;109(8):1090–5.
 20. Dielemans I, Vingerling JR, Algra D, Hofman A, Grobbee DE, de Jong PTVM. Primary Open-angle Glaucoma, Intraocular Pressure, and Systemic Blood Pressure in the General Elderly Population: The Rotterdam Study. *Ophthalmology* . 1995;102(1):54–60.
 21. Paranhos Jr A, Omi CA, Prata Jr JA. 3º Consenso Brasileiro Glaucoma Primário de Ângulo Aberto. Sociedade Brasileira de Glaucoma. São Paulo. Acesso em: 21 de junho de 2021. Disponível em: <https://www.sbglaucoma.org.br/wp-content/uploads/2020/06/consenso03-v2.pdf>
 22. Kim KE, Park KH. Update on the Prevalence, Etiology, Diagnosis, and Monitoring of Normal-Tension Glaucoma. *Asia Pac J Ophthalmol (Phila)*. 2016;5(1):23-31.
 23. Le A, Mukesh BN, McCarty CA, Taylor HR. Risk factors associated with the incidence of open-angle glaucoma: The visual impairment project. *Investig Ophthalmol Vis Sci* . 2003; 44(9):3783–9.
 24. Leske MC, Wu SY, Hennis A, Honkanen R, Nemesure B. Risk Factors for Incident Open-angle Glaucoma. The Barbados Eye Studies. *Ophthalmology*. 2008;115(1):85–93.
 25. Heijl A, Leske MC, Bengtsson B, Hyman L, Bengtsson B, Hussein M. Reduction of intraocular pressure and glaucoma progression: Results from the Early Manifest Glaucoma Trial. *Arch Ophthalmol* . 2002;120(10):1268–79.
 26. Leske MC, Heijl A, Hyman L, Bengtsson B, Dong LM, Yang Z. Predictors of Long-term Progression in the Early Manifest Glaucoma Trial. *Ophthalmology*. 2007;114(11):1965–72.
 27. Coleman AL, Miglior S. Risk Factors for Glaucoma Onset and Progression. *Surv Ophthalmol*. 2008;53(1 Suppl):S3-10.
 28. Müskens RPHM, Voogd S, Wolfs RCW, Witteman JCM, Hofman A, Jong PTVM, et al. Systemic Antihypertensive Medication and Incident Open-angle Glaucoma. *Ophthalmology* . 2007; 114(12):2221–6.
 29. Nemesure B, Honkanen R, Hennis A, Wu SY, Leske MC. Incident Open-angle Glaucoma and Intraocular Pressure. *Ophthalmology* . 2007;114(10):1810–5.
 30. Wang HW, Sun P, Chen Y, Jiang LP, Wu HP, Zhang W, et al. Research progress on human genes involved in the pathogenesis of glaucoma (Review). *Mol Med Rep*. 2018;18(1):656–74.

31. Fingert JH. Primary open-angle glaucoma genes . *Eye (Lond)*. 2011; 25(5):587-95.
32. Teikari JM, Airaksinen PJ, Kaprio J, Koskenvuo M. Primary open-angle glaucoma in 2 monozygotic twin pairs. *Acta Ophthalmol* . 1987;65(5):607–11.
33. McMonnies CW. Glaucoma history and risk factors. *J Optom*. 2017;10(2):71–8.
34. Wiggs JL. Genetic etiologies of glaucoma. *Arch Ophthalmol*. 2007;125(1):30-7.
35. Miller E. Race and the risk of glaucoma. *Arch Ophthalmol*. 2004;122(6):909-10.
36. Rudnicka AR, Mt-Isa S, Owen CG, Cook DG, Ashby D. Variations in primary open-angle glaucoma prevalence by age, gender, and race: a Bayesian meta-analysis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47(10):4254–61.
37. Kim E, Varma R. Glaucoma in Latinos/Hispanics. *Curr Opin Ophthalmol*. 2020;21(2):100–5.
38. Wolfs RC, Klaver CC, Ramrattan RS, van Duijn CM, Hofman A, de Jong PT. Genetic risk of primary open-angle glaucoma. Population-based familial aggregation study. *Arch Ophthalmol*. 1998;116(12):1640–1645.
39. Tielsch JM, J Katz J, A Sommer A, H A Quigley HA, J C Javitt JC. Family history and risk of primary open angle glaucoma. The Baltimore Eye Survey. *Arch Ophthalmol*. 1994; 112(1):69-73.
40. Razeghinejad MR, Nowroozzadeh MH. Optic disk hemorrhage in health and disease . *Surv Ophthalmol*. 2017;62(6):784-802.
41. Budenz DL, Huecker JB, Gedde SJ, Gordon M, Kass M. Thirteen-Year Follow-up of Optic Disc Hemorrhages in the Ocular Hypertension Treatment Study. *Am J Ophthalmol* . 2017;174:126–33.
42. Drange S, Anderson DR, Schulzer M. Risk factors for progression of visual field abnormalities in normal-tension glaucoma. *Am J Ophthalmol* . 2001;131(6):699–708.
43. Suh MH, Park KH. Pathogenesis and clinical implications of optic disk hemorrhage in glaucoma. *Surv Ophthalmol*. 2014;59(1):19-29.
44. Park HYL, Jeong HJ, Kim YH, Park CK. Optic disc hemorrhage is related to various hemodynamic findings by disc angiography. *PLoS One* 2015;10(4):e0120000.
45. Dichtl A, Jonas JB, Naumann GOH. Course of the optic nerve fibers through the lamina cribrosa in human eyes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1996;234(9):581–5.
46. Drance SM. Disc hemorrhages in the glaucomas. *Surv Ophthalmol* 1989;33(5):331–7.
47. Lee EJ, Han JC, Kee C. A novel hypothesis for the pathogenesis of glaucomatous disc hemorrhage. *Prog Retin Eye Res* 2017; 60:20–43.
48. Suzuki Y, Iwase A, Araie M, Yamamoto T, Abe H, Shirato S, et al. Risk Factors for Open-Angle Glaucoma in a Japanese Population. The Tajimi Study. *Ophthalmology*. 2006;113(9):1613–7.

49. Group; EGPS (EGPS), Miglior S, Pfeiffer N, Torri V, Zeyen T, Cunha-Vaz J, et al. Predictive factors for open-angle glaucoma among patients with ocular hypertension in the European Glaucoma Prevention Study. *Ophthalmology*. 2007;114(1):3–9.
50. Voogd S, Ikram MK, Wolfs RCW, Jansonius NM, Hofman A, Jong PTVM. Incidence of open-angle glaucoma in a general elderly population: the Rotterdam Study. *Ophthalmology*. 2005; 112(9):1487–93.
51. Costa VP, Harris A, Anderson D, Stodtmeister R, Cremasco F, Kergoat H, et al. Ocular perfusion pressure in glaucoma. *Acta Ophthalmol*. 2014; 92(4):e252-66.
52. Tielsch JM, J Katz AS, Quigley HA, Javitt JC. Hypertension, perfusion pressure, and primary open-angle glaucoma. A population-based assessment. *Arch Ophthalmol*. 1995;113(2):216–21.
53. Bonomi L, Marchini G, Marraffa M, Bernardi P, Morbio R, Varotto A. Vascular risk factors for primary open angle glaucoma: The Egna-Neumarkt Study. *Ophthalmology*. 2000; 107(7):1287–93.
54. Quigley HA, West SK, Rodriguez J, Munoz B, Klein R, Snyder R. The prevalence of glaucoma in a population-based study of Hispanic subjects: Proyecto VER. *Arch Ophthalmol*. 2001; 119(12):1819–26.
55. Grørdum K, Heijl A, Bengtsson B. Refractive error and glaucoma. *Acta Ophthalmol Scand*. 2001;79(6):560–6.
56. Xu L, Wang Y, Wang S, Wang Y, Jonas JB. High Myopia and Glaucoma Susceptibility. The Beijing Eye Study. *Ophthalmology* . 2007; 114(2):216–20.
57. Mitchell P, Hourihan F, Sandbach J, Wang JJ. The relationship between glaucoma and myopia: The blue mountains eye study. *Ophthalmology* . 1999; 106(10):2010–5.
58. Sigal IA, Flanagan JG, Ethier CR. Factors influencing optic nerve head biomechanics. *Investig Ophthalmol Vis Sci* . 2005; 46(11):4189–99.
59. Burgoyne CF, Downs JC, Bellezza AJ, Suh JKF, Hart RT. The optic nerve head as a biomechanical structure: A new paradigm for understanding the role of IOP-related stress and strain in the pathophysiology of glaucomatous optic nerve head damage . *Prog Retin Eye Res*. 2005; 24(1):39-73.
60. Jonas JB, Berenshtein E, Holbach L. Lamina cribrosa thickness and spatial relationships between intraocular space and cerebrospinal fluid space in highly myopic eyes. *Investig Ophthalmol Vis Sci* . 2004;45(8):2660–5.
61. Tielsch JM, Sommer A, Katz J, Royall RM, Quigley HA, Javitt J. Racial variations in the prevalence of primary open-angle glaucoma. The Baltimore Eye Survey. *JAMA - J Am Med Assoc*. 1991;266(3):369–374.
62. Klein BEK, Klein R, Sponsel WE, Franke T, Cantor LB, Martone J, et al. Prevalence of Glaucoma: The Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology*. 1992; 99(10):1499–504.
63. Varma R, Ying-Lai M, Francis BA, Nguyen BBT, Deneen J, Wilson MR, et al. Prevalence of open-angle glaucoma and ocular hypertension in Latinos: The Los Angeles Latino Eye Study. *Ophthalmology*. 2004;111(8):1439–48.

64. Tielsch JM, Katz J, Singh K, Quigley HA, Gottsch JD, Javitt J, et al. A population-based evaluation of glaucoma screening: The baltimore eye survey. *Am J Epidemiol.* 1991;134(10):1102–10.
65. Leske MC, Connell AM, Schachat AP, Hyman L. The Barbados Eye Study. Prevalence of open angle glaucoma. *Arch Ophthalmol.* 1994;112(6):821–9.
66. Murdoch I. Epidemiology and primary open angle glaucoma. *Community Eye Heal.* 1996;9(18):19–22.
67. Ntim-Amponsah CT, Amoaku WMK, Ofosu-Amaah S, Ewusi RK, Idirisuriya-Khair R, Nyatepe-Coo E, et al. Prevalence of glaucoma in an African population. *Eye.* 2004; 18(5):491–7.
68. Campos B, Cerrate A, Montjoy E, Gomero VD, Gonzales C, Tecse A, et al. [National survey on the prevalence and causes of blindness in Peru]. *Rev Panam Salud Publica.* 2014;36(5):283–9. Spanish.
69. Alvarado D, Rivera B, Lagos L, Ochoa M, Starkman I, Castillo M, et al. Encuesta nacional de ceguera y deficiencia visual evitables en Honduras. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Heal .* 2014;36(5):300–5. Spanish.
70. Sakata K, Sakata LM, Sakata VM, Santini C, Hopker LM, Bernardes R, et al. Prevalence of glaucoma in a South Brazilian population: Projeto glaucoma. *Investig Ophthalmol Vis Sci .* 2007;48(11):4974–9.
71. Urbano A, Freitas T, Arcieri E, Urbano A, Costa V. Avaliação dos tipos de glaucoma no serviço de oftalmologia da UNICAMP. *Arq Bras Oftalmol.* 2003;(66):61–5.
72. Fechtner RD, Weinreb RN. Mechanisms of optic nerve damage in primary open angle glaucoma. *Surv Ophthalmol.* 1994;39(1):23–42.
73. Weinreb RN, Tee Khaw P. Primary open-angle glaucoma. *Lancet.* 2004; 363(9422): 1711–20.
74. Calkins DJ. Critical pathogenic events underlying progression of neurodegeneration in glaucoma. *Prog Retin Eye Res.* 2012;.31(6): 702–19.
75. Chitranshi N, Dheer Y, Abbasi M, You Y, Graham SL, Gupta V. Glaucoma Pathogenesis and Neurotrophins: Focus on the Molecular and Genetic Basis for Therapeutic Prospects. *Curr Neuropharmacol.* 2018;16(7):1018–35.
76. Weber AJ, Chen H, Hubbard WC, Kaufman PL. Experimental glaucoma and cell size, density, and number in the primate lateral geniculate nucleus. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41(6):1370–9.
77. Yücel YH, Zhang Q, Gupta N, Kaufman PL, Weinreb RN. Loss of neurons in magnocellular and parvocellular layers of the lateral geniculate nucleus in glaucoma. *Arch Ophthalmol.* 2000;118(3):378–84.
78. Yücel YH, Zhang Q, Weinreb RN, Kaufman PL, Gupta N. Atrophy of relay neurons in magno- and parvocellular layers in the lateral geniculate nucleus in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42(13):3216–22.
79. Yücel YH, Zhang Q, Weinreb RN, Kaufman PL, Gupta N. Effects of retinal ganglion cell loss on magno-, parvo-, koniocellular pathways in the lateral

- geniculate nucleus and visual cortex in glaucoma. *Prog Retin Eye Res.* 2003;22(4):465-81.
80. Crawford ML, Harwerth RS, Smith 3rd EL, Mills S, Ewing B. Experimental glaucoma in primates: changes in cytochrome oxidase blobs in V1 cortex. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42(2):358–64.
 81. Sample PA, Bosworth CF, Blumenthal EZ, Girkin C, Weinreb RN. Visual function-specific perimetry for indirect comparison of different ganglion cell populations in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41(7):1783–90.
 82. Pena JD, Agapova O, Gabelt BT, Levin LA, Lucarelli MJ, Kaufman PL, et al. Increased elastin expression in astrocytes of the lamina cribrosa in response to elevated intraocular pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42(10):2303–14.
 83. Wang L, Cioffi GA, Cull G, Dong J, Fortune B. Immunohistologic evidence for retinal glial cell changes in human glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43(4):1088–94.
 84. Bellezza AJ, Rintalan CJ, Thompson HW, Downs JC, Hart RT, Burgoyne CF. Deformation of the lamina cribrosa and anterior scleral canal wall in early experimental glaucoma. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2003; 44(2):623–37.
 85. Yan DB, Coloma FM, Metheetrairut A, Trope GE, Heathcote JG, Ethier CR. Deformation of the lamina cribrosa by elevated intraocular pressure. *Br J Ophthalmol.* 1994;78(8):643–8.
 86. Quigley HA, Addicks EM, Green WR, Maumenee AE. Optic nerve damage in human glaucoma: li. The Site of Injury and Susceptibility to Damage. *Arch Ophthalmol.* 1981; 99(4):635–49.
 87. Quigley HA, Hohman RM, Addicks EM, Massof RW, Richard Green W. Morphologic changes in the lamina cribrosa correlated with neural loss in open-angle glaucoma. *Am J Ophthalmol.* 1983; 95(5):673–91.
 88. Quigley HA, Addicks EM. Regional differences in the structure of the lamina cribrosa and their relation to glaucomatous optic nerve damage. *Arch Ophthalmol.* 1981;99(1):137–43.
 89. Danias J, Lee KC, Zamora M-F, Chen B, Shen F, Filippopoulos T, et al. Quantitative analysis of retinal ganglion cell (RGC) loss in aging DBA/2Nnia glaucomatous mice: comparison with RGC loss in aging C57/BL6 mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44(12):5151-62.
 90. Quigley HA. Ganglion cell death in glaucoma: Pathology recapitulates ontogeny. *Aust N Z J Ophthalmol.* 1995; 23(2):85–91.
 91. Evangelho K, Mogilevskaya M, Barragan ML, Vargas-Sanchez JK. Pathophysiology of primary open-angle glaucoma from a neuroinflammatory and neurotoxicity perspective: a review of the literature. *Int Ophthalmol.* 2019; 39(1): 259–71.
 92. Seki M, Tanaka T, Sakai Y, Fukuchi T, Abe H, Nawa H, et al. Müller cells as a source of brain-derived neurotrophic factor in the retina: Noradrenaline upregulates brain-derived neurotrophic factor levels in cultured rat Müller cells. *Neurochem Res.* 2005; 30(9):1163–70.
 93. Takihara Y, Inatani M, Hayashi H, Adachi N, Iwao K, Inoue T, et al. Dynamic

- imaging of axonal transport in living retinal ganglion cells in vitro. *Investig Ophthalmol Vis Sci* . 2011; 52(6):3039–45.
94. Quigley HA, McKinnon SJ, Zack DJ, Pease ME, Kerrigan-Baumrind LA, Kerrigan DF, et al. Retrograde axonal transport of BDNF in retinal ganglion cells is blocked by acute IOP elevation in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41(11):3460–6.
 95. Pease ME, McKinnon SJ, Quigley HA, Kerrigan-Baumrind LA, Zack DJ. Obstructed axonal transport of BDNF and its receptor TrkB in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41(3):764–74.
 96. Tanaka H, Ito Y, Nakamura S, Shimazawa M, Hara H. Involvement of brain-derived neurotrophic factor in time-dependent neurodegeneration in the murine superior colliculus after intravitreal injection of N-methyl-D-aspartate. *Mol Vis*. (15):662–9.
 97. Nickells RW, Howell GR, Soto I, John SWM. Under pressure: Cellular and molecular responses during glaucoma, a common neurodegeneration with axonopathy. *Annu Rev Neurosci*; 2012; 35:153–79.
 98. Howell GR, Soto I, Libby RT, John SWM. Intrinsic axonal degeneration pathways are critical for glaucomatous damage. *Exp Neurol*; 2013; 246:54–61.
 99. Whitmore A V., Libby RT, John SWM. Glaucoma: Thinking in new ways - A rôle for autonomous axonal self-destruction and other compartmentalised processes? *Prog Retin Eye Res*. 2005; 24(6): 639–62.
 100. Sheffield VC, Stone EM, Alward WLM, Drack AV, Johnson AT, Streb LM, et al. Genetic linkage of familial open angle glaucoma to chromosome 1q21–q31. *Nat Genet*. 1993; 4(1):47–50.
 101. Wang R, Wiggs JL. Common and rare genetic risk factors for glaucoma. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014; 4(12).
 102. Drewry MD, Challa P, Kuchtey JG, Navarro I, Helwa I, Hu Y, et al. Differentially expressed microRNAs in the aqueous humor of patients with exfoliation glaucoma or primary open-angle glaucoma. *Hum Mol Genet*. 2018;27(7):1263–75.
 103. Wiggs JL. Glaucoma Genes and Mechanisms. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2015; 134:315–42.
 104. Liu Y, Allingham RR. Major review: Molecular genetics of primary open-angle glaucoma. Vol. 160, *Exp Eye Res*. 2017; 160: 62–84.
 105. Fingert JH, Héon E, Liebmann JM, Yamamoto T, Craig JE, Rait J, et al. Analysis of myocilin mutations in 1703 glaucoma patients from five different populations. *Hum Mol Genet*. 1999; 8(5):899–905.
 106. Alward WLM, Kwon YH, Kawase K, Craig JE, Hayreh SS, Johnson AT, et al. Evaluation of optineurin sequence variations in 1,048 patients with open-angle glaucoma. *Am J Ophthalmol*. 2003; 136(5):904–10.
 107. Hauser MA, Allingham RR, Linkroum K, Wang J, LaRocque-Abramson K, Figueiredo D, et al. Distribution of WDR36 DNA sequence variants in patients with primary open-angle glaucoma. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2006; 47(6):2542–6.

108. Fingert JH, Robin AL, Stone JL, Roos BR, Davis LK, Scheetz TE, et al. Copy number variations on chromosome 12q14 in patients with normal tension glaucoma. *Hum Mol Genet* . 2011; 20(12):2482–94.
109. Khawaja AP, Viswanathan AC. Are we ready for genetic testing for primary open-angle glaucoma? *Eye (Lond)*. 2018 May;32(5):877-883.
110. Bailey JNC, Loomis SJ, Kang JH, Allingham RR, Gharahkhani P, Khor CC, et al. Genome-wide association analysis identifies TXNRD2, ATXN2 and FOXC1 as susceptibility loci for primary open-angle glaucoma. *Nat Genet*. 2016; 48(2):189–94.
111. Thorleifsson G, Walters GB, Hewitt AW, Masson G, Helgason A, Dewan A, et al. Common variants near CAV1 and CAV2 are associated with primary open-angle glaucoma. *Nat Genet*. 2010; 42(10):906–9.
112. Wiggs JL, Yaspan BL, Hauser MA, Kang JH, Allingham RR, Olson LM, et al. Common variants at 9p21 and 8q22 are associated with increased susceptibility to optic nerve degeneration in glaucoma. *PLoS Genet* . 2012; 8(4).
113. Bonnemaier PWM, Iglesias AI, Nadkarni GN, Sanywa AJ, Hassan HG, Cook C, et al. Genome-wide association study of primary open-angle glaucoma in continental and admixed African populations. *Hum Genet*. 2018; 137(10):847–62.
114. Burdon KP, MacGregor S, Hewitt AW, Sharma S, Chidlow G, Mills RA, et al. Genome-wide association study identifies susceptibility loci for open angle glaucoma at TMCO1 and CDKN2B-AS1. *Nat Genet*. 2011; 43(6):574–8.
115. Chen Y, Lin Y, Vithana EN, Jia L, Zuo X, Yin Wong T, et al. Common variants near ABCA1 and in PMM2 are associated with primary open-angle glaucoma. *Nat Gen*. 2014; 46(10): 115-9.
116. Choquet H, Paylakhi S, Kneeland SC, Thai KK, Hoffmann TJ, Yin J, et al. A multiethnic genome-wide association study of primary open-angle glaucoma identifies novel risk loci. *Nat Commun*. 2018; 9(1): 2278.
117. Ghanbari M, Iglesias AI, Springelkamp H, van Duijn CM, Ikram MA, Dehghan A, et al. A genome-wide scan for microrna-related genetic variants associated with primary open-angle glaucoma. *Investig Ophthalmol Vis Sci* . 2017; 58(12):5368–77.
118. Gharahkhani P, Burdon KP, Fogarty R, Sharma S, Hewitt AW, Martin S, et al. Common variants near ABCA1, AFAP1 and GMDS confer risk of primary open-angle glaucoma Wellcome Trust Case Control Consortium 2, NEIGHBORHOOD consortium HHS Public Access Author manuscript. *Nat Genet*. 2014;46(10):1120–5.
119. Hysi PG, Cheng CY, Springelkamp H, Macgregor S, Cooke Bailey JN, Wojciechowski R, et al. Genome-wide analysis of multi-ancestry cohorts identifies new loci influencing intraocular pressure and susceptibility to glaucoma. *Nat Genet*. 2014; 46(10):1126–30.
120. Luo H, Chen Y, Ye Z, Sun X, Shi Y, Luo Q, et al. Evaluation of the association between common genetic variants near the ABCA1 gene and primary angle closure glaucoma in a han Chinese population. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2015; 56(11):6248–54.

121. MacGregor S, Ong JS, An J, Han X, Zhou T, Siggs OM, et al. Genome-wide association study of intraocular pressure uncovers new pathways to glaucoma. *Nature Genet.* 2018; 50(8):1067–71.
122. Shiga Y, Akiyama M, Nishiguchi KM, Sato K, Shimozawa N, Takahashi A, et al. Genome-wide association study identifies seven novel susceptibility loci for primary open-angle glaucoma. *Hum Mol Genet.* 2018; 27(8):1486–96.
123. Youngblood H, Hauser MA, Liu Y. Update on the genetics of primary open-angle glaucoma. *Exp Eye Res.* 2019;188:107795.
124. Taylor KD, Guo X, Zangwill LM, Liebmann JM, Girkin CA, Feldman RM, et al. Genetic Architecture of Primary Open-Angle Glaucoma in Individuals of African Descent: The African Descent and Glaucoma Evaluation Study III. *Ophthalmology.* 2019; 126(1):38–48.
125. Kasahara N, Caixeta-Umbelino C, Paolera MD, Rocha MN, Richeti F, Vasconcellos JPC, et al. Myocilin mt.1 gene promoter single nucleotide polymorphism (-1000C>G) in Brazilian patients with primary open angle glaucoma. *Ophthalmic Genet.* 2011;32(1):18–23.
126. Marques AM, Ananina G, Costa VP, De Vasconcellos JPC, De Melo MB. Estimating the age of the p.Cys433Arg variant in the MYOC gene in patients with primary open-angle glaucoma. *PLoS One.* 2018; 13(11):e0207409.
127. Oliveira MB, Vasconcellos JPC, Ananina G, Costa VP, de Melo MB. Association between IL1A and IL1B polymorphisms and primary open angle glaucoma in a Brazilian population. *Exp Biol Med.* 2018 Sep 1; 243(13):1083–91.
128. Nunes HF, Ananina G, Costa VP, Zanchin NIT, de Vasconcellos JPC, de Melo MB. Investigation of CAV1/CAV2 rs4236601 and CDKN2B-AS1 rs2157719 in primary open-angle glaucoma patients from Brazil. *Ophthalmic Genet.* 2018; 39(2):194–9.
129. Liu Y, Allingham RR. Molecular genetics in glaucoma. *Exp Eye Res.* 2011; 93(4): 331–9.
130. Sakurada Y, Mabuchi F. Genetic Risk Factors for Glaucoma and Exfoliation Syndrome Identified by Genome-wide Association Studies. *Curr Neuropharmacol.* 2017; 16(7):933–41.
131. Wiggs JL, Pasquale LR. Genetics of glaucoma. *Hum Mol Gen.* 2017; 26(R1):R21–R27.
132. Gong B, Zhang H, Huang L, Chen Y, Shi Y, Tam POS, et al. Mutant RAMP2 causes primary open-angle glaucoma via the CRLR-cAMP axis. *Genet Med.* 2019; 21(10):2345–54.
133. Sakurada Y, Mabuchi F. Advances in glaucoma genetics. *Progr Brain Res.* 2015; 220:107–126.
134. Chen M, Yu X, Xu J, Ma J, Chen X, Chen B, et al. Association of gene polymorphisms with primary open angle glaucoma: A systematic review and meta-analysis. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2019; 60(4):1105–21.
135. Van Eck M. ATP-binding cassette transporter A1: key player in cardiovascular and metabolic disease at local and systemic level. *Curr Opin Lipidol.* 2014;25(4):297–303.

136. Oram JF, Lawn RM. ABCA1. The gatekeeper for eliminating excess tissue cholesterol. *J Lipid Res.* 2001;42(8):1173–9.
137. Zode GS, Bugge KE, Mohan K, Grozdanic SD, Peters JC, Koehn DR, et al. Topical ocular sodium 4-phenylbutyrate rescues glaucoma in a myocilin mouse model of primary open-angle glaucoma. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2012; 53(3):1557–65.
138. Zode GS, Kuehn MH, Nishimura DY, Searby CC, Mohan K, Grozdanic SD, et al. Reduction of ER stress via a chemical chaperone prevents disease phenotypes in a mouse model of primary open angle glaucoma. *J Clin Invest.* 2011; 121(9):3542–53.
139. Saleem RA, Banerjee-Basu S, Murphy TC, Baxevanis A, Walter MA. Essential structural and functional determinants within the forkhead domain of FOXC1. *Nucleic Acids Res.* 2004; 32(14):4182–93.
140. Murphy TC, Saleem RA, Footz T, Ritch R, McGillivray B, Walter MA. The wing 2 region of the FOXC1 forkhead domain is necessary for normal DNA-binding and transactivation functions. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2004; 45(8):2531–8.
141. Ephrussi A, St. Johnston DS. Seeing Is Believing: The Bicoid Morphogen Gradient Matures. *Cell.* 2004; 116(2):143–52.
142. Gage PJ, Camper SA. Pituitary homeobox 2, a novel member of the bicoid-related family of homeobox genes, is a potential regulator of anterior structure formation. *Hum Mol Genet.* 1997; 6(3):457–64.
143. Nishina S, Kohsaka S, Yamaguchi Y, Handa H, Kawakami A, Fujisawa H, et al. PAX6 expression in the developing human eye. *Br J Ophthalmol.* 1999; 83(6):723–7.
144. Tsuchiya Y, Nakajima M, Yokoi T. Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human. *Cancer Lett.* 2005; 227(2):115–24.
145. Choudhary D, Jansson I, Schenkman JB. CYP1B1, a developmental gene with a potential role in glaucoma therapy. *Xenobiotica;* 2009; 39(8):606–15.
146. Inoue T, Ohbayashi T, Fujikawa Y, Yoshida H, Akama TO, Noda K, et al. Latent TGF- β binding protein-2 is essential for the development of ciliary zonule microfibrils. *Hum Mol Genet.* 2014; 23(21):5672–82.
147. Jusiak B, Karandikar UC, Kwak SJ, Wang F, Wang H, Chen R, et al. Regulation of Drosophila eye development by the transcription factor sine oculis. *PLoS One.* 2014; 9(2):e89695.
148. Anderson AM, Weasner BM, Weasner BP, Kumar JP. Dual transcriptional activities of SIX proteins define their roles in normal and ectopic eye development. *Development.* 2012; 139(5):991–1000.
149. Schneider C, King RM, Philipson L. Genes specifically expressed at growth arrest of mammalian cells. *Cell.* 1988;54(6):787-93.
150. Ju YT, Chang AC, She BR, Tsaur ML, Hwang HM, Chao CC, et al. gas7: A gene expressed preferentially in growth-arrested fibroblasts and terminally differentiated Purkinje neurons affects neurite formation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95(19):11423–8.

151. You JJ, Lin-Chao S. Gas7 functions with N-WASP to regulate the neurite outgrowth of hippocampal neurons. *J Biol Chem*. 2010; 285(15):11652–66.
152. Chao CCK, Hung FC, Chao JJ. Gas7 is required for mesenchymal stem cell-derived bone development. *Stem Cells Int*. 2013; (2013):137010.
153. Hung F-C, Cheng Y-C, Sun N-K, Chao CC-K. Identification and functional characterization of zebrafish Gas7 gene in early development. *J Neurosci Res*. 2013;91(1):51–61.
154. Sharma S, Burdon KP, Chidlow G, Klebe S, Crawford A, Dimasi DP, et al. Association of genetic variants in the TMCO1 gene with clinical parameters related to glaucoma and characterization of the protein in the eye. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2012; 53(8):4917–25.
155. Pasmant E, Sabbagh A, Vidaud M, Bièche I. ANRIL, a long, noncoding RNA, is an unexpected major hotspot in GWAS. *FASEB J*. 2011; 25(2):444–8.
156. Jarinova O, Stewart AFR, Roberts R, Wells G, Lau P, Naing T, et al. Functional analysis of the chromosome 9p21.3 coronary artery disease risk locus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009; 29(10):1671–7.
157. Harismendy O, Notani D, Song X, Rahim NG, Tanasa B, Heintzman N, et al. 9p21 DNA variants associated with coronary artery disease impair interferon- γ 3 signalling response. *Nature*. 2011; 470(7333):264–8.
158. Barone R, Fiumara A, Jaeken J. Congenital disorders of glycosylation with emphasis on cerebellar involvement. *Semin Neurol*. 2014; 34(3):357–66.
159. Freeze H. Genetic disorders of glycan degradation. In: Varki A, Cummings R, Esko J, Freeze H, Stanley P, Bertozzi C, et al., editors. *Essentials of Glycobiology*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009.
160. Shvets E, Ludwig A, Nichols BJ. News from the caves: Update on the structure and function of caveolae. *Curr Opin Cell Biol*. 2014; 29: 99–106.
161. Trane AE, Pavlov D, Sharma A, Saqib U, Lau K, Van Petegem F, et al. Deciphering the binding of Caveolin-1 to client protein endothelial nitric-oxide synthase (eNOS): Scaffolding subdomain identification, interaction modeling, and biological significance. *J Biol Chem*. 2014; 289(19):13273–83.
162. Shen X, Ying H, Qiu Y, Park JS, Shyam R, Chi ZL, et al. Processing of optineurin in neuronal cells. *J Biol Chem*. 2011 Feb; 286(5):3618–29.
163. Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. Autophagy and innate immunity ally against bacterial invasion. *EMBO J*. 2011; 30(16):3213–4.
164. Sudhakar C, Nagabhushana A, Jain N, Swarup G. NF- κ B mediates tumor necrosis factor α -induced expression of optineurin, a negative regulator of NF- κ B. *PLoS One*. 2009; 4(4):e5114.
165. Nagabhushana A, Bansal M, Swarup G. Optineurin is required for CYLD-dependent inhibition of TNF α -induced NF- κ B activation. *PLoS One*. 2011; 6(3):e17477.
166. Morton S, Hesson L, Peggie M, Cohen P. Enhanced binding of TBK1 by an optineurin mutant that causes a familial form of primary open angle glaucoma. *FEBS Lett*. 2008; 582(6):997–1002.

167. Li Z, Allingham RR, Nakano M, Jia L, Chen Y, Ikeda Y, et al. A common variant near TGFBR3 is associated with primary open angle glaucoma. *Hum Mol Genet.* 2015; 24(13):3880–92.
168. Khor CC, Ramdas WD, Vithana EN, Cornes BK, Sim X, Tay WT, et al. 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.* 2011; 20(9):1864–72.
169. Kuchtey J, Kuchtey RW. The microfibril hypothesis of glaucoma: Implications for treatment of elevated intraocular pressure. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2014; 30(2-3): 170–80.
170. Hyytiäinen M, Keski-Oja J. Latent TGF- β binding protein LTBP-2 decreases fibroblast adhesion to fibronectin. *J Cell Biol.* 2003;163(6):1363–74.
171. Vehviläinen P, Hyytiäinen M, Keski-Oja J. Latent Transforming Growth Factor- β -binding Protein 2 Is an Adhesion Protein for Melanoma Cells. *J Biol Chem.* 2003; 278(27):24705–13.
172. Sideek MA, Menz C, Parsi MK, Gibson MA. LTBP-2 competes with tropoelastin for binding to fibulin-5 and heparin, and is a negative modulator of elastinogenesis. *Matrix Biol.* 2014; 34:114–23.
173. Liu X, Zhao Y, Gao J, Pawlyk B, Starcher B, Spencer JA, et al. Elastic fiber homeostasis requires lysyl oxidase-like 1 protein. *Nat Genet.* 2004; 36(2):178–82.
174. Cai C, Rajaram M, Zhou X, Liu Q, Marchica J, Li J, et al. Activation of multiple cancer pathways and tumor maintenance function of the 3q amplified oncogene FNDC3B. *Cell Cycle.* 2012; 11(9):1773–81.
175. Paschoud S, Jond L, Guerrero D, Citi S. PLEKHA7 modulates epithelial tight junction barrier function. *Tissue Barriers.* 2014; 2(1):e28755.
176. Vithana EN, Khor CC, Qiao C, Nongpiur ME, George R, Chen LJ, et al. Genome-wide association analyses identify three new susceptibility loci for primary angle closure glaucoma. *Nat Genet.* 2012; 44(10):1142–6.
177. Richards AJ, McNinch A, Martin H, Oakhill K, Rai H, Waller S, et al. Stickler syndrome and the vitreous phenotype: Mutations in COL2A1 and COL11A1. *Hum Mutat.* 2010; 31(6).
178. Liton PB, Liu X, Stamer WD, Challa P, Epstein DL, Gonzalez P. Specific targeting of gene expression to a subset of human trabecular meshwork cells using the chitinase 3-like 1 promoter. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2005; 46(1):183–90.
179. Hurskainen M, Eklund L, Hägg PO, Fruttiger M, Sormunen R, Ilves M, et al. Abnormal maturation of the retinal vasculature in type XVIII collagen/endostatin deficient mice and changes in retinal glial cells due to lack of collagen types XV and XVIII. *FASEB J.* 2005; 19(11):1564–6.
180. Ylikärppä R, Eklund L, Sormunen R, Muona A, Fukai N, Olsen BR, et al. Double knockout mice reveal a lack of major functional compensation between collagens XV and XVIII. *Matrix Biol.* 2003; 22(5):443–8.
181. Paik YK, Chang DJ, Reardon CA, Davies GE, Mahley RW, Taylor JM. Nucleotide

- sequence and structure of the human apolipoprotein E gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985; 82(10):3445–9.
182. Marais AD. Apolipoprotein E in lipoprotein metabolism, health and cardiovascular disease. *Pathology*. 2019; 51(2): 165–76.
 183. Phillips MC. Apolipoprotein e isoforms and lipoprotein metabolism. *IUBMB Life*. Blackwell Publishing Ltd; 2014; 66(9):616–23.
 184. Getz GS, Reardon CA. ApoE knockout and knockin mice: the history of their contribution to the understanding of atherogenesis. *Lipid Res*. 2016;57(5):758–66.
 185. Mahley RW, Weisgraber KH, Huang Y. Apolipoprotein E: Structure determines function, from atherosclerosis to Alzheimer's disease to AIDS. *J Lipid Res*. 2009; 50 Suppl:S183-8.
 186. Getz GS, Reardon CA. Apoprotein E as a lipid transport and signaling protein in the blood, liver, and artery wall. *J Lipid Res*. 2009;50 Suppl:S156-61.
 187. Utermann G, Jaeschke M, Menzel J. Familial hyperlipoproteinemia type III: Deficiency of a specific apolipoprotein (APO E-III) in the very-low-density lipoproteins. *FEBS Lett*. 1975;56(2):352–5.
 188. Utermann G, Canzler H, Hees M, Jaeschke M, Mühlfellner G, Schoenborn W, et al. Studies on the metabolic defect in Broad- β disease (hyperlipoproteinaemia type III). *Clin Genet*. 1977; 12(3):139–54.
 189. Utermann G, Hees M, Steinmetz A. Polymorphism of apolipoprotein E and occurrence of dysbetalipoproteinaemia in man. *Nature*. 1977;269(5629):604–7.
 190. Pagnan A, Havel R, Kane J, Kotite L. Characterization of human very low density lipoproteins containing two electrophoretic populations: double pre-beta lipoproteinemia and primary dysbetalipoproteinemia. *J Lipid Res*. 1977;18(5):613–22.
 191. Marcel YL, Bergseth M, Nestruck AC. Preparative isoelectric focussing of apolipoproteins C and E from human very low density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta*. 1979;573(1):175–83.
 192. G R Warnick G, Mayfield C, Albers J, Hazzard WR. Gel isoelectric focusing method for specific diagnosis of familial hyperlipoproteinemia type 3. *Clin Chem*. 1979;25(2):279–84.
 193. Weidman S, Suarez B, Falko J, Witztum J, J Kolar J, Raben M, et al. Type III hyperlipoproteinemia: development of a VLDL ApoE gel isoelectric focusing technique and application in family studies. *J Lab Clin Med*. 1979;93(4):549–69.
 194. Zannis VI, Just PW, Breslow JL. Human apolipoprotein E isoprotein subclasses are genetically determined. *Am J Hum Genet*. 1981;33(1):11–24.
 195. Zannis V, Breslow J, Utermann G, Mahley R, Weisgraber K, Havel R, et al. Proposed nomenclature of apoE isoproteins, apoE genotypes, and phenotypes. *J Lipid Res*. 1982;23(6):911–4.
 196. Seripa D, Matera MG, Daniele A, Bizzarro A, Rinaldi M, Gravina C, et al. The missing ApoE allele. *Ann Hum Genet*. 2007 Jul;71(4):496–500.
 197. Homo sapiens apolipoprotein-E gene, complete cds. GenBank: AF261279.1.

- NCBI Resources. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AF261279>
198. Seripa D, D'Onofrio G, Panza F, Cascavilla L, Masullo C, Pilotto A. The genetics of the human APOE polymorphism. *Rejuvenation Res.* 2011;14(5):491–500.
 199. Nickerson DA, Taylor SL, Fullerton SM, Weiss KM, Clark AG, Stengård JH, et al. Sequence diversity and large-scale typing of SNPs in the human apolipoprotein E gene. *Genome Res.* 2000;10(10):1532–45.
 200. Abondio P, Sazzini M, Garagnani P, Boattini A, Monti D, Franceschi C, et al. The genetic variability of APOE in different human populations and its implications for longevity. *Genes (Basel).* 2019; 10(3):222.
 201. Persico AM, D'Agruma L, Zelante L, Militerni R, Bravaccio C, Schneider C, et al. Enhanced APOE2 transmission rates in families with autistic probands. *Psychiatr Genet.* 2004;14(2):73–82.
 202. Murrell J, Price B, Baiyewu O, Gureje O, Deeg M, Hendrie H, et al. The fourth apolipoprotein E haplotype found in the Yoruba of Ibadan. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2006;141B(4):426–7.
 203. Mahley RW. Apolipoprotein E: Cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science;* 1988; 240(4852): 622–30.
 204. Farrer L, Cupples L, Haines J, Hyman B, Kukull W, Mayeux R, et al. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA.* 1997;278(16):1349–56.
 205. Singh PP, Singh M, Mastana SS. APOE distribution in world populations with new data from India and the UK. *Ann Hum Biol.* 2006; 33(3):279–308.
 206. Eisenberg D, Kuzawa C, Hayes M. Worldwide allele frequencies of the human apolipoprotein E gene: climate, local adaptations, and evolutionary history. *Am J Phys Anthr.* 2010;143(1):100–11.
 207. Eto M, Watanabe K, Ishii K. A racial difference in apolipoprotein E allele frequencies between the Japanese and Caucasian populations. *Clin Genet.* 1986;30(5):422–7.
 208. Benkmann H, Agarwal D, Vasisht S, Srivastava L, Goedde H. Distribution of apolipoprotein E genotypes in Asian Indians, Hungarians, and Papua New Guineans. *Anthr Anz.* 1996;54(1):31–4.
 209. Tácito L, Yamada L, Pinhel M, Yugar-Toledo J, Souza D. Influence of Apolipoprotein E on the Lipid Profile and Postprandial Triglyceride Levels in Brazilian Postmenopausal Women With Artery Disease. *Clin Med Insights Cardiol.* 2017; (11):1179546817731110.
 210. Alvim RO, Freitas SR, Ferreira NE, Santos PC, Cunha RS, Mill JG, et al. APOE polymorphism is associated with lipid profile, but not with arterial stiffness in the general population. *Lipids Health Dis.* 2010; (9):128.
 211. Megale R, Loyola Filho A, Firmo J, Lima-Costa M, Peixoto S. Apolipoprotein E polymorphism and functional disability in Brazilian elders: the Bambuí Health and Aging Study. *Cad Saude Publica.* 2016;32(2):e00080115.

212. Corbo RM, Scacchi R. Apolipoprotein E (APOE) allele distribution in the world. Is APOE * 4 a 'thrifty' allele?. *Ann Hum Genet.* 1999; 63(Pt 4):301–10.
213. Gerdes L, Klausen I, Sihm I, Faergeman O. Apolipoprotein E polymorphism in a Danish population compared to findings in 45 other study populations around the world. *Genet Epidemiol.* 1992;9(3):155–67.
214. Mastana SS, Calderon R, Pena J, Reddy PH, Papiha SS. Anthropology of the apolipoprotein e (apo E) gene: Low frequency of apo E4 allele in Basques and in tribal (Baiga) populations of India. *Ann Hum Biol.* 1998;25(2):137–43.
215. Lauer S, Walker D, Elshourbagy N, Reardon C, Levy-Wilson B, Taylor J. Two copies of the human apolipoprotein C-I gene are linked closely to the apolipoprotein E gene. *J Biol Chem.* 1988;263(15):7277–86.
216. Mahley RW, Rall Jr SC. Is ϵ 4 the ancestral human apoE allele? *Neurobiology Aging.* 1999; 20(4):429–30.
217. Mahley R, Rall Jr S. Type III hyperlipoproteinemia (dysbetalipoproteinemia): the role of apolipoprotein E in normal and abnormal lipoprotein metabolism. In: Scriver C, Beaudet A, Sly W, Valle D, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease.* 7th ed. New York: McGraw-Hill; 1995. p. 1953–80.
218. Finch CE, Sapolsky RM. The evolution of Alzheimer disease, the reproductive schedule, and apoE isoforms. *Neurobiol Aging.* 1999; 20(4):407–28.
219. Arendt T, Schindler C, Brückner MK, Eschrich K, Bigl V, Zedlick D, et al. Plastic neuronal remodeling is impaired in patients with Alzheimer's disease carrying apolipoprotein ϵ 4 allele. *J Neurosci.* 1997;17(2):516–29.
220. Ghebremedhin E, Schultz C, Braak E, Braak H. High frequency of apolipoprotein E ϵ 4 allele in young individuals with very mild Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Exp Neurol.* 1998;153(1):152–5.
221. Brion JP. Neurofibrillary tangles and Alzheimer's disease. *Eur Neurol.* 1998; 40(3):130–40.
222. Braak H, Braak E. Staging of alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Neurobiol Aging.* 1995;16(3):271–8.
223. Sen A, Alkon DL, Nelson TJ. Apolipoprotein E3 (ApoE3) but not ApoE4 protects against synaptic loss through increased expression of protein kinase C ϵ . *J Biol Chem.* 2012; 287(19):15947–58.
224. Nicoll JAR, Roberts GW, Graham DI. Apolipoprotein E ϵ 4 allele is associated with deposition of amyloid β -protein following head injury. *Nat Med.* 1995;1(2):135–7.
225. Hawkes K, Coxworth J. Grandmothers and the evolution of human longevity: a review of findings and future directions. *Evol Anthr.* 2013;22(6):294–302.
226. Feistner A, McGrew W. *Perspectives in Primate Biology.* Seth P, editor. New Dehli: Today and Tomorrow's Printers and Publishers; 1989. p.21–36.
227. Blurton Jones N, Hawkes N, O'Connell JF. Comparative Socioecology of Mammals and Man. Standen V, Foley R, editors. London: Blackwell Publishing; 1989. p.365–390.
228. Hawkes K, O'Connell F, Blurton Jones N. Hadza Children's Foraging: Juvenile

- Dependency, Social Arrangements, and Mobility among Hunter-Gatherers. The University of Chicago Press Journals. 1995. Aug-Oct; 36(4):688. Available from: <https://www.journals.uchicago.edu/doi/pdf/10.1086/204420>
229. Hawkes K, O'Connell J, Blurton Jones N. Hadza Women's Time Allocation, Offspring Provisioning, and the Evolution of Long Postmenopausal Life Spans. *Curr Anthropol*. 1997;38(4):551–77.
 230. Refolo LM, Fillit HM. Apolipoprotein E4 as a target for developing new therapeutics for Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci*. 2004; 23(3):151–5.
 231. Gong JS, Morita SY, Kobayashi M, Handa T, Fujita SC, Yanagisawa K, et al. Novel action of apolipoprotein e (ApoE): ApoE isoform specifically inhibits lipid-particle-mediated cholesterol release from neurons. *Mol Neurodegener*. 2007; 2(1).
 232. Hone E, Martins I, Jeoung M, Ji T, Gandy S, Martins R. Alzheimer's disease amyloid-beta peptide modulates apolipoprotein E isoform specific receptor binding. *J Alzheimers Dis*. 2005;7(4):303–14.
 233. Ji Z, Müllendorff K, Cheng I, Miranda R, Huang Y, Mahley R. Reactivity of apolipoprotein E4 and amyloid beta peptide: lysosomal stability and neurodegeneration. *J Biol Chem*. 2006;281(5):2683–92.
 234. Zhang HL, Wu J, Zhu J. The role of apolipoprotein e in Guillain-Barré Syndrome and experimental autoimmune neuritis. *J Biomed Biotechnol*. 2010; (2010): 357412.
 235. Lauderback CM, Kanski J, Hackett JM, Maeda N, Kindy MS, Butterfield DA. Apolipoprotein E modulates Alzheimer's A β (1-42)-induced oxidative damage to synaptosomes in an allele-specific manner. *Brain Res*. 2002; 924(1):90–7.
 236. DeKroon R, Robinette JB, Hjelmeland AB, Wiggins E, Blackwell M, Mihovilovic M, et al. APOE4-VLDL inhibits the HDL-activated phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway via the phosphoinositol phosphatase SHIP2. *Circ Res*. 2006; 99(8):829–36.
 237. Yamamoto T, Choi HW, Ryan RO. Apolipoprotein E isoform-specific binding to the low-density lipoprotein receptor. *Anal Biochem*. 2008; 372(2):222–6.
 238. Raffai RL, Dong LM, Farese RV, Weisgraber KH. Introduction of human apolipoprotein E4 "domain interaction" into mouse apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A* . 2001; 98(20):11587–91.
 239. Herz J. Apolipoprotein E receptors in the nervous system. *Curr Opin Lipidol*. 2009;20(3):190–6.
 240. Zhang MY, Li YH, Wei XH, Ouyang F, Liu L. Triglyceride-rich lipoproteins induce adipogenic differentiation through an apolipoprotein E/LRP1/caveolae-dependent pathway: A hypothesis for diet-induced obesity. *Int J Cardiol*. 2016; 212:82–3.
 241. Teter B, Ladu MJ, Sullivan PM, Frautschy SA, Cole GM. Apolipoprotein e isotype-dependent modulation of microRNA-146a in plasma and brain. *Neuroreport*. 2016; 27(11):791–5.
 242. Nishitsuji K, Hosono T, Nakamura T, Bu G, Michikawa M. Apolipoprotein E regulates the integrity of tight junctions in an isoform-dependent manner in an in

- vitro blood-brain barrier model. *J Biol Chem*. 2011; 286(20):17536–42.
243. Zhang H, Wu LM, Wu J. Cross-talk between apolipoprotein e and cytokines. *Mediators Inflamm*. 2011; (2011):949072.
244. Baitsch D, Bock HH, Engel T, Telgmann R, Müller-Tidow C, Varga G, et al. Apolipoprotein e induces antiinflammatory phenotype in macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011; 31(5):1160–8.
245. Riddell DR, Graham A, Owen JS. Apolipoprotein E inhibits platelet aggregation through the L-arginine:nitric oxide pathway: Implications for vascular disease. *J Biol Chem*. 1997; 272(1):89–95.
246. Hauptmann S, Scherping I, Dröse S, Brandt U, Schulz KL, Jendrach M, et al. Mitochondrial dysfunction: An early event in Alzheimer pathology accumulates with age in AD transgenic mice. *Neurobiol Aging*. 2009; 30(10):1574–86.
247. Brodbeck J, McGuire J, Liu Z, Meyer-Franke A, Balestra M, Jeong D, et al. Structure-dependent impairment of intracellular apolipoprotein E4 trafficking and its detrimental effects are rescued by small-molecule structure correctors. *J Biol Chem*. 2011;286(19):17217–26.
248. Harris H. Apolipoprotein E: from Alzheimer's to sepsis. *Crit Care Med*. 2005;33(11):2696–7.
249. Zanfardino A, Bosso A, Gallo G, Pistorio V, Napoli M, Gaglione R, et al. Human apolipoprotein E as a reservoir of cryptic bioactive peptides: The case of ApoE 133-167. *J Pept Sci*. 2018;24(7):e3095.
250. Zhao N, Liu CC, Qiao W, Bu G. Apolipoprotein E, Receptors, and Modulation of Alzheimer's Disease. *Biol Psychiatry*. 2018; (83(4):347–57.
251. Gaudreault N, Kumar N, Posada JM, Stephens KB, De Mochel NSR, Eberlé D, et al. ApoE suppresses atherosclerosis by reducing lipid accumulation in circulating monocytes and the expression of inflammatory molecules on monocytes and vascular endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012; 32(2):264–72.
252. Centa M, Prokopec KE, Garimella MG, Habir K, Hofste L, Stark JM, et al. Acute Loss of Apolipoprotein E Triggers an Autoimmune Response That Accelerates Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2018; 38(8):e145–58.
253. Koopal C, Marais AD, Visseren FLJ. Familial dysbetalipoproteinemia: an underdiagnosed lipid disorder. *Curr Opin in Endocrinol Diabetes Obes*. 2017;24(2): 133–9.
254. Blom DJ, Byrnes P, Jones S, Marais AD. Dysbetalipoproteinaemia--clinical and pathophysiological features. *S Afr Med J*. 2002;92(11):892–7.
255. Safieh M, Korczyn AD, Michaelson DM. ApoE4: an emerging therapeutic target for Alzheimer's disease. *BMC Med*. 2019; 17(1).
256. Tilley L, Morgan K, Kalsheker N. Genetic risk factors in Alzheimer's disease. *Mol Pathol*. 1998; 51(6): 293–304.
257. Nunes VS, Cazita PM, Catanozi S, Nakandakare ER, Quintão ECR. Decreased content, rate of synthesis and export of cholesterol in the brain of apoE knockout mice. *J Bioenerg Biomembr*. 2018; 50(4):283–7.

258. Shi Y, Yamada K, Liddelow SA, Smith ST, Zhao L, Luo W, et al. ApoE4 markedly exacerbates tau-mediated neurodegeneration in a mouse model of tauopathy. *Nature*. 2017; 549(7673):523–7.
259. Rannikmäe K, Kalaria RN, Greenberg SM, Chui HC, Schmitt FA, Samarasekera N, et al. APOE associations with severe CAA-associated vasculopathic changes: Collaborative meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2014; 85(3):300–5.
260. Roy S, Ganguly K, Pal P, Ghosh S, Das S, Gangopadhyay P, et al. Influence of Apolipoprotein E polymorphism on susceptibility of Wilson disease. *Ann Hum Genet*. 2018;82(2):53–9.
261. Roses AD, Saunders AM. ApoE, Alzheimer's disease, and recovery from brain stress. *Ann N Y Acad Sci*. 1997;(826):200–12.
262. Teasdale GM, Nicoll JAR, Murray G, Fiddes M. Association of apolipoprotein E polymorphism with outcome after head injury. *Lancet*. 1997; 350(9084):1069–71.
263. Friedman G, Froom P, Sazbon L, Grinblatt I, Shochina M, Tsenter J, et al. Apolipoprotein E-epsilon4 genotype predicts a poor outcome in survivors of traumatic brain injury. *Neurology*. 1999;52(2):244–8.
264. Teng Z, Guo Z, Zhong J, Cheng C, Huang Z, Wu Y, et al. ApoE Influences the Blood-Brain Barrier Through the NF-κB/MMP-9 Pathway after Traumatic Brain Injury. *Sci Rep*. 2017;7(1).
265. Zheng M, Wei J, Tang Y, Yang C, Wei Y, Yin X, et al. ApoE-Deficient Promotes Blood–Brain Barrier Disruption in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis via Alteration of MMP-9. *J Mol Neurosci*. 2014; 54(2):282–90.
266. Venkatraman A, Dutta B, Murugan E, Piliang H, Lakshminaryanan R, Sook Yee AC, et al. Proteomic Analysis of Amyloid Corneal Aggregates from TGFBI-H626R Lattice Corneal Dystrophy Patient Implicates Serine-Protease HTRA1 in Mutation-Specific Pathogenesis of TGFBIp. *J Proteome Res*. 2017; 16(8):2899–913.
267. Kuot A, Ronci M, Mills R, Klebe S, Snibson G, Wiffen S, et al. Reduced expression of apolipoprotein E and immunoglobulin heavy constant gamma 1 proteins in Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Clin Exp Ophthalmol*. 2019; 47(8):1028–42.
268. Gaynor PM, Zhang WY, Weiss JS, Skarlatos SI, Rodrigues MM, Kruth HS. Accumulation of HDL apolipoproteins accompanies abnormal cholesterol accumulation in Schnyder's corneal dystrophy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996; 16(8):992–9.
269. Himabindu P, Vishnupriya S, Padma T, Vittal Rao V, Kumar K, Bhavani M, et al. Association of apolipoprotein E (RFLP) polymorphism with myopia. *Indian J Hum Genet*. 2006;12(2):72–5.
270. Pepple KL, Rotkis L, Wilson L, Sandt A, Van Gelder RN. Comparative proteomic analysis of two uveitis models in lewis rats. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2015; 56(13):8449–56.
271. Xiying M, Wenbo W, Wangyi F, Qinghuai L. Association of Apolipoprotein E Polymorphisms with Age-related Macular Degeneration Subtypes: An Updated

- Systematic Review and Meta-analysis. *Arch Med Res*. 2017; 48(4):370–7.
272. Liew G, Shankar A, Jie JW, Klein R, Bray MS, Couper DJ, et al. Apolipoprotein E gene polymorphisms and retinal vascular signs: The Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) Study. *Arch Ophthalmol*. 2007; 125(6):813–8.
273. Jahn CE, Oette K, Esser A, Bergmann VK, Leiss O. Increased prevalence of apolipoprotein E2 in patients with retinitis pigmentosa. *Ophthalmic Res*. 1987;19(5):285–8.
274. Asensio-Sánchez V, Rodríguez-Martín T, Gala-Molina I, Rodríguez-Fernández I. [Age-related macular degeneration: its association with the epsilon4 allele of the apolipoprotein E gene]. *Arch Soc Esp Oftalmol*. 2006;81(1):9–12. Spanish.
275. Toops KA, Tan LX, Lakkaraju A. Apolipoprotein E isoforms and AMD. In: Bowes Rickman C, LaVail M, Anderson R, Grimm C, Hollyfield J, Ash J, editors. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Ed. New York: Springer; 2016. p. 3–9.
276. Fernández-Vega B, García M, Olivares L, Álvarez L, González-Fernández A, Artime E, et al. The association study of lipid metabolism gene polymorphisms with AMD identifies a protective role for APOE-E2 allele in the wet form in a Northern Spanish population. *Acta Ophthalmol*. 2020;98(3):e282–91.
277. Yates JRW, Moore AT. Genetic susceptibility to age related macular degeneration. *J Med Genet*. 2000; 37(2):83–7.
278. McKay GJ, Silvestri G, Chakravarthy U, Dasari S, Fritsche LG, Weber BH, et al. Variations in apolipoprotein e frequency with age in a pooled analysis of a large group of older people. *Am J Epidemiol*. 2011; 173(12): 1357–64.
279. Haddad S, Chen CA, Santangelo SL, Seddon JM. The Genetics of Age-Related Macular Degeneration: A Review of Progress to Date. *Surv Ophthalmol*. 2006; 51(4):316–63.
280. Fritsche LG, Chen W, Schu M, Yaspan BL, Yu Y, Thorleifsson G, et al. Seven new loci associated with age-related macular degeneration. *Nat Genet*. 2013; 45(4):433–9.
281. Sobrin L, Ripke S, Yu Y, Fagerness J, Bhangale TR, Tan PL, et al. Heritability and genome-wide association study to assess genetic differences between advanced age-related macular degeneration subtypes. *Ophthalmology*. 2012; 119(9):1874–85.
282. Pauleikhoff D, Barondes MJ, Minassian D, Chisholm IH, Bird AC. Drusen as risk factors in age-related macular disease. *Am J Ophthalmol*. 1990; 109(1):38–43.
283. Russell SR, Mullins RF, Schneider BL, Hageman GS. Location, substructure, and composition of basal laminar drusen compared with drusen associated with aging and age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol*. 2000; 129(2):205–14.
284. Heeren J, Grewal T, Laatsch A, Becker N, Rinninger F, Rye KA, et al. Impaired recycling of apolipoprotein E4 is associated with intracellular cholesterol accumulation. *J Biol Chem*. 2004; 279(53):55483–92.
285. Lee S, Kim J, Kim J, Chung M, Wen Q, Chung H, et al. Human apolipoprotein E2 transgenic mice show lipid accumulation in retinal pigment epithelium and

- altered expression of VEGF and bFGF in the eyes. *J Microbiol Biotechnol.* 2007;17(6):1024–30.
286. Jo DH, Lee JH, Jun HJ, Kim J, Wen Q, Hoang MH, et al. Gene expression profiles of primary retinal pigment epithelial cells from apolipoprotein E knockout and human apolipoprotein E2 transgenic mice. *Genet Mol Res.* 2015; 14(1):1855–67.
 287. Romero FJ, Bosch-Morell F, Romero MJ, Jareño EJ, Romero B, Marín N, et al. Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease. In: *Environmental Health Perspectives. Environ Health Perspect.* 1998; 106(5 Suppl 5):1229-34.
 288. Florence TM. The role of free radicals in disease. *Aust N Z J Ophthalmol.* 1995;23(1):3-7.
 289. Bhooma V, Sulochana KN, Biswas J, Ramakrishnan S. Eales' disease: Accumulation of reactive oxygen intermediates and lipid peroxides and decrease of antioxidants causing inflammation, neovascularization and retinal damage. *Curr Eye Res.* 1997; 16(2):91–5.
 290. Lüscher TF. Frontiers in lipid research: Lipoprotein(a), apolipoprotein C-III and E, and PCSK9 and inflammation. *Eur Heart J.* 2019; 40(33):2741–4.
 291. Nissilä E, Hakala P, Leskinen K, Roig A, Syed S, Van Kessel KPM, et al. Complement factor H and apolipoprotein e participate in regulation of inflammation in THP-1 macrophages. *Front Immunol.* 2018; 9(NOV).
 292. McColl AJ, Converse CA. Lipid studies in retinitis pigmentosa. *Prog Lipid Res.* 1995; 34(1): 1–16.
 293. Huq L, McLachlan T, Hammer HM, Bedford D, Packard CJ, Shepherd J, et al. An increased incidence of apolipoprotein E2/E2 and E4/E4 in retinitis pigmentosa. *Lipids.* 1993; 28(11):995–8.
 294. Namba Y, Tsuchiya H, Ikeda K. Apolipoprotein B immunoreactivity in senile plaque and vascular amyloids and neurofibrillary tangles in the brains of patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 1992; 134(2):264–6.
 295. Bergström J, Murphy CL, Weiss DT, Solomon A, Sletten K, Hellman U, et al. Two different types of amyloid deposits - Apolipoprotein A-IV and transthyretin - In a patient with systematic amyloidosis. *Lab Investig.* 2004; 84(8):981–8.
 296. Bergström J, Murphy C, Eulitz M, Weiss DT, Westermark GT, Solomon A, et al. Codeposition of apolipoprotein A-IV and transthyretin in senile systemic (ATTR) amyloidosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 285(4):903–8.
 297. Janssen SF, Gorgels TGMF, Ramdas WD, Klaver CCW, van Duijn CM, Jansonius NM, et al. The vast complexity of primary open angle glaucoma: Disease genes, risks, molecular mechanisms and pathobiology. *Prog Retin Eye Res.* 2013; (37):31–67.
 298. Vecino E, Rodriguez FD, Ruzafa N, Pereiro X, Sharma SC. Glia-neuron interactions in the mammalian retina. *Prog Retin Eye Res.* 2016; 51:1-40.
 299. Poirier J. Apolipoprotein E in animal models of CNS injury and in alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 1994; 17(12):525–30.

300. Baskin F, Smith GM, Fosmire JA, Rosenberg RN. Altered apolipoprotein E secretion in cytokine treated human astrocyte cultures. *J Neurol Sci.* 1997; 148(1):15–8.
301. Vickers JC, Craig JE, Stankovich J, McCormack GH, West AK, Dickinson JL, et al. The apolipoprotein ϵ 4 gene is associated with elevated risk of normal tension glaucoma. *Mol Vis.* 2002; (8):389–93.
302. Mabuchi F, Tang S, Ando D, Yamakita M, Wang J, Kashiwagi K, et al. The apolipoprotein E gene polymorphism is associated with open angle glaucoma in the Japanese population. *Mol Vis.* 2005; (11):609–12.
303. Jünemann A, Wakili N, Mardin C, Naumann GOH, Bleich S, Henkel K, et al. Prospective case control study on genetic association of apolipoprotein ϵ 2 with intraocular pressure. 2004; 88(4):581–2.
304. Yuan H, Xiao Z, Yang B. [A study on the association of apolipoprotein E genotypes with primary open-angle glaucoma and primary angle-closure glaucoma in northeast of China]. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi.* 2007;43(5):416–20. Chinese.
305. Fan B, Wang D, Fan D, Am P, Lam D, Ham C, et al. SNPs and interaction analyses of myocilin, optineurin, and apolipoprotein E in primary open angle glaucoma patients. *Mol Vis.* 2005;(11):625–31.
306. Lam CY, Fan BJ, Wang DY, Tam POS, Yung Tham CC, Leung DY, et al. Association of apolipoprotein E polymorphisms with normal tension glaucoma in a Chinese population. *J Glaucoma.* 2006; 15(3):218–22.
307. Jia L, Tam P, Chiang S, Ding N, Chen L, Yam G, et al. Multiple gene polymorphisms analysis revealed a different profile of genetic polymorphisms of primary open-angle glaucoma in northern Chinese. *Mol Vis.* 2009;(15):89–98.
308. Rassinotis T, Griffiths P, Birch M, Keers S, Chinnery P. Apolipoprotein E promoter polymorphisms do not have a major influence on the risk of developing primary open angle glaucoma. *Mol Vis.* 2004; 28(10):805–7.
309. Zetterberg M, Tasa G, Palmér MS, Juronen E, Teesalu P, Blennow K, et al. Apolipoprotein E Polymorphisms in Patients With Primary Open-Angle Glaucoma. *Am J Ophthalmol.* 2007; 143(6):1059–60.
310. Lake S, Liverani E, Desai M, Casson R, James B, Clark A, et al. Normal tension glaucoma is not associated with the common apolipoprotein E gene polymorphisms. *Br J Ophthalmol.* 2004;88(4):491–3.
311. Margeta MA, Letcher SM, Igo RP, Cooke Bailey JN, Pasquale LR, Haines JL, et al. Association of APOE with primary open-angle glaucoma suggests a protective effect for APOE ϵ 4. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2020; 61(8).
312. Huang Y, Weisgraber KH, Mucke L, Mahley RW. Apolipoprotein E: Diversity of cellular origins, structural and biophysical properties, and effects in Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci.* 2004; 23(3):189–204.
313. Huang Y, Mahley RW. Apolipoprotein E: Structure and function in lipid metabolism, neurobiology, and Alzheimer's diseases. *Neurobiol Dis.* 2014; 72 (Pt A):3-12.
314. Amaratunga A, Abraham CR, Edwards RB, Sandell JH, Schreiber BM, Fine RE.

- Apolipoprotein E is synthesized in the retina by Müller glial cells, secreted into the vitreous, and rapidly transported into the optic nerve by retinal ganglion cells. *J Biol Chem.* 1996;271(10):5628–32.
315. Mahley RW, Huang Y. Apolipoprotein E Sets the Stage: Response to Injury Triggers neuropathology. *Neuron* 2012; 76(5):871–85.
 316. Vance JE, Pan D, Campenot RB, Bussiere M, Vance DE. Evidence that the major membrane lipids, except cholesterol, are made in axons of cultured rat sympathetic neurons. *J Neurochem.* 1994; 62(1):329–37.
 317. Shanmugaratnam J, Berg E, Kimerer L, Johnson RJ, Amaratunga A, Schreiber BM, et al. Retinal Muller glia secrete apolipoproteins E and J which are efficiently assembled into lipoprotein particles. *Mol Brain Res.* 1997; 50(1–2):113–20.
 318. Poirier J, Hess M, May PC, Finch CE. Cloning of hippocampal poly(A) RNA sequences that increase after entorhinal cortex lesion in adult rat. *Mol Brain Res.* 1991; 9(3):191–5.
 319. Poirier J, Hess M, May PC, Finch CE. Astrocytic apolipoprotein E mRNA and GFAP mRNA in hippocampus after entorhinal cortex lesioning. *Mol Brain Res.* 1991; 11(2):97–106.
 320. Poirier J, Baccichet A, Dea D, Gauthier S. Cholesterol synthesis and lipoprotein reuptake during synaptic remodelling in hippocampus in adult rats. *Neuroscience.* 1993; 55(1):81–90.
 321. Lawlor M, Danesh-Meyer H, Levin LA, Davagnanam I, De Vita E, Plant GT. Glaucoma and the brain: Trans-synaptic degeneration, structural change, and implications for neuroprotection. *Surv Ophthalmol.* 2018;63(3):296–306.
 322. Kirwan R, Wordinger R, Clark A, O'Brien C. Differential global and extra-cellular matrix focused gene expression patterns between normal and glaucomatous human lamina cribrosa cells. *Mol Vis.* 2009;(15):76–88.
 323. Omodaka K, Nishiguchi KM, Yasuda M, Tanaka Y, Sato K, Nakamura O, et al. Neuroprotective effect against axonal damage-induced retinal ganglion cell death in apolipoprotein E-deficient mice through the suppression of kainate receptor signaling. *Brain Res.* 2014; 1586:203–12.
 324. Zadeh JK, Zhutdieva MB, Laspas P, Yuksel C, Musayeva A, Pfeiffer N, et al. Apolipoprotein e deficiency causes endothelial dysfunction in the mouse retina. *Oxid Med Cell Longev.* 2019; (2019):5181429.
 325. Sies H. Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. *Redox Biol.* 2015; (4):180–3.
 326. Goyal A, Srivastava A, Sihota R, Kaur J. Evaluation of oxidative stress markers in aqueous humor of primary open angle glaucoma and primary angle closure glaucoma patients. *Curr Eye Res.* 2014; 39(8):823–9.
 327. Stein JD, Newman-Casey PA, Talwar N, Nan B, Richards JE, Musch DC. The relationship between statin use and open-angle glaucoma. *Ophthalmology.* 2012; 119(10):2074–81.
 328. Talwar N, Musch DC, Stein JD. Association of daily dosage and type of statin agent with risk of open-angle glaucoma. *JAMA Ophthalmol.* 2017; 135(3):263–7.

329. Mahley RW, Huang Y. Apolipoprotein E: From atherosclerosis to Alzheimer's disease and beyond. *Curr Opin Lipidol*. 1999; 10(3): 207–17.
330. Elliott DA, Tsoi K, Holinkova S, Chan SL, Kim WS, Halliday GM, et al. Isoform-specific proteolysis of apolipoprotein-E in the brain. *Neurobiol Aging*. 2011; 32(2):257–71.
331. Muñoz SS, Garner B, Ooi L. Understanding the Role of ApoE Fragments in Alzheimer's Disease. *Neurochem Res*. 2019; 44(6):1297–305.
332. Yin Y, Wang Z. ApoE and neurodegenerative diseases in aging. In: Wang Z, editor. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. New York: Springer; 2018. p. 77–92.
333. Mahley RW. Apolipoprotein E: from cardiovascular disease to neurodegenerative disorders. *J Mol Med (Berl)*. 2016; 94(7):739-46.
334. Mancino R, Martucci A, Cesareo M, Giannini C, Corasaniti MT, Bagetta G, et al. Glaucoma and Alzheimer Disease: One Age-Related Neurodegenerative Disease of the Brain. *Curr Neuropharmacol*. 2017;16(7):971–7.
335. Hinton DR, Sadun AA, Blanks JC, Miller CA. Optic-Nerve Degeneration in Alzheimer's Disease. *N Engl J Med*. 1986; 315(8):485–7.
336. Blanks JC, Hinton DR, Sadun AA, Miller CA. Retinal ganglion cell degeneration in Alzheimer's disease. *Brain Res*. 1989; 501(2):364–72.
337. Sadun AA, Bassi CJ. Optic Nerve Damage in Alzheimer's Disease. *Ophthalmology*. 1990; 97(1):9–17.
338. Yoneda S, Hara H, Hirata A, Fukushima M, Inomata Y, Tanihara H. Vitreous fluid levels of β -amyloid(1-42) and tau in patients with retinal diseases. *Jpn J Ophthalmol*. 2005; 49(2):106–8.
339. Gupta N, Fong J, Ang LC, Yücel YH. Retinal tau pathology in human glaucomas. *Can J Ophthalmol*. 2008; 43(1):53–60.
340. Inoue T, Kawaji T, Tanihara H. Elevated levels of multiple biomarkers of alzheimer's disease in the aqueous humor of eyes with open-angle glaucoma. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2013; 54(8):5353–8.
341. Killer HE, Jaggi GP, Flammer J, Miller NR. Is open-angle glaucoma caused by impaired cerebrospinal fluid circulation: Around the optic nerve? *Clin Exp Ophthalmol*. 2008; 36(4):308–11.
342. Serot JM, Zmudka J, Jouanny P. A possible role for CSF turnover and choroid plexus in the pathogenesis of late onset alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis*. 2012; 30(1): 17–26.
343. Silverberg GD, Mayo M, Saul T, Rubenstein E, McGuire D. Alzheimer's disease, normal-pressure hydrocephalus, and senescent changes in CSF circulatory physiology: A hypothesis. *Lancet Neurol*. 2003; 2(8):506–11.
344. Wostyn P. Glaucoma as a dangerous interplay between ocular fluid and cerebrospinal fluid. *Med Hypotheses*. 2019;127:97–9.
345. Klionsky DJ. The molecular machinery of autophagy: Unanswered questions. *J Cell Sci*. 2005; 118(1):7–18.

346. Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, et al. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*. 2006; 441(7095):885–9.
347. Rodríguez-Muela N, Boya P. Axonal damage, autophagy and neuronal survival. *Autophagy*. 2012; 8(2): 286-8.
348. Jaeger PA, Wyss-Coray T. Beclin 1 complex in autophagy and Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 2010; 67(10): 1181–4.
349. Russo R, Berliocchi L, Adornetto A, Varano GP, Cavaliere F, Nucci C, et al. Calpain-mediated cleavage of Beclin-1 and autophagy deregulation following retinal ischemic injury in vivo. *Cell Death Dis*. 2011; 2(4):e144.
350. Koch JC, Lingor P. The role of autophagy in axonal degeneration of the optic nerve. *Exp Eye Res*. 2016; (144): 81–9.
351. Munemasa Y, Kitaoka Y. Autophagy in axonal degeneration in glaucomatous optic neuropathy. *Progress Ret Eye Res*. 2015; (47):–18.
352. Robinson JL, Lee EB, Xie SX, Rennert L, Suh E, Bredenberg C, et al. Neurodegenerative disease concomitant proteinopathies are prevalent, age-related and APOE4-associated. *Brain*. 2018; 141(7):2181–93.
353. Wang Y, Zhou YF, Zhao BY, Gu ZY, Li SL. Apolipoprotein E gene $\epsilon 4\epsilon 4$ is associated with elevated risk of primary open angle glaucoma in Asians: A meta-analysis. *BMC Med Genet*. 2014; (15):60.
354. Miyata M, Smith JD. Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and β -amyloid peptides. *Nat Genet*. 1996; 14(1):55–61.
355. Lee Y, Aono M, Laskowitz D, Warner DS, Pearlstein RD. Apolipoprotein E protects against oxidative stress in mixed neuronal-glia cell cultures by reducing glutamate toxicity. *Neurochem Int*. 2004; 44(2):107–18.
356. Holcombe DJ, Lengefeld N, Gole GA, Barnett NL. The effects of acute intraocular pressure elevation on rat retinal glutamate transport. *Acta Ophthalmol*. 2008; 86(4):408–14.
357. Delyfer M, Forster V, Neveux N, Picaud S, L veillard T, Sahel J. Evidence for glutamate-mediated excitotoxic mechanisms during photoreceptor degeneration in the rd1 mouse retina. *Mol Vis*. 2005; (11):688–96.
358. Ambati J, Chalam K V., Chawala DK, D'Angio CT, Guillet EG, Rose SJ, et al. Elevated γ -aminobutyric acid, glutamate, and vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol*. 1997; 115(9):1161–6.
359. Naskar R, Vorwerk C, Dreyer E. Concurrent downregulation of a glutamate transporter and receptor in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41(7):1940-4.
360. Butterfield DA, Mattson MP. Apolipoprotein E and oxidative stress in brain with relevance to Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*. 2020; (138):104795.
361. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: Master regulator of O₂ homeostasis. *Curr Opin Genet Dev*. 1998;8(5):588–94.

362. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 and the molecular physiology of oxygen homeostasis. *J Lab Clin Med.* 1998;131(3): 207–14.
363. Li G, Luna C, Liton P, Navarro I, Epstein D, Gonzalez P. Sustained stress response after oxidative stress in trabecular meshwork cells. *Mol Vis.* 2007;(13):2282–8.
364. Palomba L, Cerioni L, Cantoni O. Arachidonic acid inhibits neuronal nitric oxide synthase elicited by proinflammatory stimuli and promotes astrocyte survival with both exogenous and endogenous peroxynitrite via different mechanisms. *J Neurosci Res.* 2010;88(11):2459–68.
365. Tezel G. Oxidative stress in glaucomatous neurodegeneration: Mechanisms and consequences. *Prog Retin Eye Res.* 2006; 25(5): 490–513.
366. Nakazawa T, Nakazawa C, Matsubara A, Noda K, Hisatomi T, She H, et al. Tumor necrosis factor- α mediates oligodendrocyte death and delayed retinal ganglion cell loss in a mouse model of glaucoma. *J Neurosci.* 2006; 26(49):12633–41.
367. Tezel G, Yang X, Yang J, Wax MB. Role of tumor necrosis factor receptor-1 in the death of retinal ganglion cells following optic nerve crush injury in mice. *Brain Res.* 2004;996(2):202–12.
368. Zenkel M, Lewczuk P, Jünemann A, Kruse FE, Naumann GOH, Schlötzer-Schrehardt U. Proinflammatory cytokines are involved in the initiation of the abnormal matrix process in pseudoexfoliation syndrome/glaucoma. *Am J Pathol.* 2010;176(6):2868–79.
369. Izzotti A, Saccà SC, Cartiglia C, De Flora S. Oxidative deoxyribonucleic acid damage in the eyes of glaucoma patients. *Am J Med .* 2003;114(8):638–46.
370. Saccà SC, Pascotto A, Camicione P, Capris P, Izzotti A. Oxidative DNA damage in the human trabecular meshwork: Clinical correlation in patients with primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol.* 2005;123(4):458–63.
371. Methia N, André P, Moghadam A, Economopoulos M, Thomas K, Wagner D. ApoE deficiency compromises the blood brain barrier especially after injury. *Mol Med.* 2001;7(12):810-5.
372. Arend O, Remky A, Plange N, Kaup M, Schwartz B. Fluorescein leakage of the optic disc in glaucomatous optic neuropathy. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2005;243(7):659–64.
373. Schwartz B, Rieser JC, Fishbein SL. Fluorescein Angiographic Defects of the Optic Disc in Glaucoma. *Arch Ophthalmol.* 1977;95(11):1961–74.
374. Schwartz B. Circulatory defects of the optic disk and retina in ocular hypertension and high pressure open-angle glaucoma. *Surv Ophthalmol.* 1994;(38 Suppl):S23-34.
375. Tsukahara S. Hyperpermeable disc capillaries in glaucoma. *Adv Ophthalmol.* 1978;(35):65–72.
376. Grieshaber MC, Flammer J. Does the Blood-brain Barrier Play a Role in Glaucoma? *Surv Ophthalmol.* 2007;52(Suppl 2):S115-21.
377. Lee EJ, Kee HJ, Han JC, Kee C. Evidence-based understanding of disc

- hemorrhage in glaucoma. *Survey of Ophthalmology*. 2020;S0039-6257(20)30131-4.
378. Agudo M, Pérez-Marín MC, Sobrado-Calvo P, Lönngren U, Salinas-Navarro M, Cánovas I, et al. Immediate upregulation of proteins belonging to different branches of the apoptotic cascade in the retina after optic nerve transection and optic nerve crush. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50(1):424–31.
 379. Resnikoff S, Pascolini D, Etya'ale D, Kocur I, Pararajasegaram R, Pokharel G, et al. Global data on visual impairment in the year 2002. *Bull World Heal Organ*. 2004;82(11):844–51.
 380. Petty HR. Frontiers of complex disease mechanisms: Membrane surface tension may link genotype to phenotype in glaucoma. *Front Cell Dev Biol*. 2018; (6):32.
 381. Al-Dabbagh NM, Al-Dohayan N, Arfin M, Tariq M. Apolipoprotein E polymorphisms and primary glaucoma in Saudis. *Mol Vis*. 2009;(15):912–9.
 382. Saglar E, Yucel D, Bozkurt B, Ozgul RK, Irkec M, Ogus A. Association of polymorphisms in APOE, p53, and p21 with primary open-angle glaucoma in Turkish patients. *Mol Vis*. 2009;(15):1270–6.
 383. Sambrook J, Russell DW. Purification of Nucleic Acids by Extraction with Phenol:Chloroform. *CSH Protoc*. 2006;(1):pdb.prot4455.
 384. Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol*. 1975;94(3):441-8.
 385. Hanlon CS, Rubinsztein DC. Arginine residues at codons 112 and 158 in the apolipoprotein E gene correspond to the ancestral state in humans. *Atherosclerosis*. 1995;112(1):85–90.
 386. Hixson JE, Cox LA, Borenstein S. The baboon apolipoprotein E gene: Structure, expression, and linkage with the gene for apolipoprotein C-I. *Genomics*. 1988;2(4):315–23.
 387. Occhiutto ML, Melo MB, Vasconcellos JPC, Rodrigues TAR, Bajano FF, Costa FF, et al. “Association of APOE gene polymorphisms with primary open angle glaucoma in Brazilian patients.” *Ophthalmic Genet* . 2021;42(1):53–61.
 388. Danesh-Meyer H V., Levin LA. Glaucoma as a neurodegenerative disease. *J Neuro-Ophthalmology*. 2015;35:S22–8.
 389. Yaylacioğlu Tuncay F, Aktaş Z, Ergün MA, Ergün SG, Hasanreisioğlu M, Hasanreisioğlu B. Association of polymorphisms in APOE and LOXL1 with pseudoexfoliation syndrome and pseudoexfoliation glaucoma in a Turkish population. *Ophthalmic Genet*. 2017;38(1):95–97.
 390. Chiras D, Tzika K, Kokotas H, Oliveira S, Grigoriadou M, Kastania A, et al. Development of novel LOXL1 genotyping method and evaluation of LOXL1, APOE and MTHFR polymorphisms in exfoliation syndrome/glaucoma in a Greek population. *Mol Vis*. 2013;(19):1006–16.
 391. Song Q, Chen P, Liu Q. Role of the APOE $\epsilon 2/\epsilon 3/\epsilon 4$ polymorphism in the development of primary open-angle glaucoma: Evidence from a comprehensive meta-analysis. *PLoS One*. 2013; 8(11): e82347.
 392. Wang W, Zhou M, Huang W, Chen S, Zhang X. Lack of association of

- apolipoprotein E (Apo E) $\epsilon 2/\epsilon 3/\epsilon 4$ polymorphisms with primary open-angle glaucoma: a meta-analysis from 1916 cases and 1756 controls. *PLoS One*. 2013; 8:(9):e72644.
393. Liao R, Ye M, Xu X. An updated meta-analysis: Apolipoprotein E genotypes and risk of primary open-angle glaucoma. *Mol Vis*. 2014; (20):1025–36.
 394. Jutley G, Luk SM, Dehabadi MH, Cordeiro MF. Management of glaucoma as a neurodegenerative disease. *Neurodegenerative disease management. Neurodegener Dis Manag*; 2017; 7(2):157–72.
 395. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*. 1993;261(5123):921–3.
 396. Benjamin R, Leake A, Edwardson JA, McKeith IG, Ince PG, Perry RH, et al. Apolipoprotein E genes in Lewy body and Parkinson's disease. *Lancet*. 1994;343(8912):1565.
 397. Durić G, Svetel M, Nikolaevic SI, Dragadević N, Gavrilović J, Kostić VS. Polymorphisms in the genes of cytochrome oxidase P450 2D6 (CYP2D6), paraoxonase 1 (PON1) and apolipoprotein E (APOE) as risk factors for Parkinson's disease. *Vojnosanit Pregl*. 2007;64(1):25–30.
 398. Gonzalez-Aldaco K, Roman S, Torres-Reyes LA, Panduro A. Association of apolipoprotein e2 allele with insulin resistance and risk of type 2 diabetes mellitus among an admixed population of Mexico. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2020;(13):3527–34.
 399. Eto M, Watanabe K, Sato T, Makino I. Apolipoprotein-E2 and hyperlipoproteinemia in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. 1989;69(6):1207–12.
 400. Galal AA, Abd Elmajeed AA, Elbaz RA, Wafa AM, Elshazli RM. Association of Apolipoprotein E gene polymorphism with the risk of T2DM and obesity among Egyptian subjects. *Gene*. 2021;(769):145223.
 401. Cole L, Belden C, Jacobson S, Liebsack C, Myers K, Reninger C, et al. Probable early-onset Alzheimer's disease in an apolipoprotein E2 homozygote. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2010;30(5):387–91.
 402. Berlau DJ, Corrada MM, Head E, Kawas CH. ApoE $\epsilon 2$ is associated with intact cognition but increased Alzheimer pathology in the oldest old. *Neurology*. 2009;72(9):829–34.
 403. Ren D, Lopez OL, Lingler JH, Conley Y. The Effect of the APOE $\epsilon 2/\epsilon 4$ Genotype on the Development of Alzheimer's Disease (AD) and Mild Cognitive Impairment (MCI) in Non-Latino Whites. *J Am Geriatr Soc*. 2020; 68(5):1044–9.
 404. Santos-Ferreira C, Baptista R, Oliveira-Santos M, Costa R, Pereira Moura J, Gonçalves L. Apolipoprotein E2 Genotype Is Associated with a 2-Fold Increase in the Incidence of Type 2 Diabetes Mellitus: Results from a Long-Term Observational Study. *J Lipids*. 2019;2019(i):1–8.
 405. Zhao N, Liu CC, Van Ingelgom AJ, Linares C, Kurti A, Knight JA, et al. APOE $\epsilon 2$ is associated with increased tau pathology in primary tauopathy. *Nat Commun*. 2018;9(1):1–11.

406. Scott RA, Scott LJ, Mägi R, Marullo L, Gaulton KJ, Kaakinen M, et al. An Expanded Genome-Wide Association Study of Type 2 Diabetes in Europeans. *Diabetes*. 2017;66(11):2888–902.
407. Cook JP, Morris AP. Multi-ethnic genome-wide association study identifies novel locus for type 2 diabetes susceptibility. *Eur J Hum Genet*. 2016; 24(8):1175–80.
408. Pasquale LR, Kang JH, Manson JAE, Willett WC, Rosner BA, Hankinson SE. Prospective Study of Type 2 Diabetes Mellitus and Risk of Primary Open-Angle Glaucoma in Women. *Ophthalmology*. 2006;113(7):1081–6.
409. Divakar Gupta D, Philip P, Chen P. Glaucoma. *Am Fam Physician*. 2016;93(8):668–74.
410. Zhao D, Cho J, Kim MH, Friedman DS, Guallar E. Diabetes, fasting glucose, and the risk of glaucoma: A meta-analysis. *Ophthalmology*. 2015; 122(1): 72–8.
411. Zhao D, Cho J, Kim MH, Friedman D, Guallar E. Diabetes, glucose metabolism, and glaucoma: The 2005-2008 National Health and Nutrition Examination Survey. *PLoS One*. 2014; 9(11):e112460.
412. Ko F, Boland M V., Gupta P, Gadkaree SK, Vitale S, Guallar E, et al. Diabetes, triglyceride levels, and other risk factors for glaucoma in the national health and nutrition examination survey 2005-2008. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2016;57(4):2152–7.
413. Boland MV, Quigley HA. Risk factors and open-angle glaucoma: Classification and application. *J Glaucoma*. 2007; 16(4):406–18.
414. Mitchell P, Smith W, Chey T, Healey PR. Open-angle glaucoma and diabetes: The Blue Mountains Eye Study, Australia. *Ophthalmology*. 1997;104(4):712–8.
415. Klein BEK, Klein R, Jensen SC. Open-angle Glaucoma and Older-onset Diabetes: The Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology*. 1994;101(7):1173–7.
416. Shen L, Walter S, Melles RB, Glymour MM, Jorgenson E. Diabetes Pathology and Risk of Primary Open-Angle Glaucoma: Evaluating Causal Mechanisms by Using Genetic Information. *Am J Epidemiol*. 2016;183(2):147–55.
417. Wong VHY, Bui BV, Vingrys AJ. Clinical and experimental links between diabetes and glaucoma. *Clin Exp Optom*. 2011;94(1): 4–23.
418. Schofield JD, Liu Y, Rao-Balakrishna P, Malik RA, Soran H. Diabetes Dyslipidemia. *Diabetes Ther*. 2016; 7(2):203–19.
419. Chapman MJ, Ginsberg HN, Amarenco P, Andreotti F, Borén J, Catapano AL, et al. Triglyceride-rich lipoproteins and high-density lipoprotein cholesterol in patients at high risk of cardiovascular disease: Evidence and guidance for management. *Eur Heart J*. 2011;32(11):1345–61.
420. Baigent C, Keech A, Kearney PM, Blackwell L, Buck G, Pollicino C, et al. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: Prospective meta-analysis of data from 90 056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet* . 2005; 366(9493):1267-78.
421. Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaborators. Efficacy of cholesterol-lowering therapy in 18 686 people with diabetes in 14 randomised trials of statins: a meta-analysis. *Lancet*. 2008;371(9607):117–25.

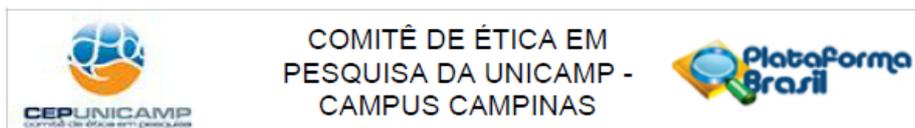
422. Pietri AO, Dunn FL, Grundy SM, Raskin P. The effect of continuous subcutaneous insulin infusion on very-low-density lipoprotein triglyceride metabolism in type I diabetes mellitus. *Diabetes*. 1983;32(1):75–81.
423. Tames FJ, Mackness MI, Arrol S, Laing I, Durrington PN. Non-enzymatic glycation of apolipoprotein B in the sera of diabetic and non-diabetic subjects. *Atherosclerosis*. 1992; 93(3):237–44.
424. Huang YS, Horrobin DF, Manku MS, Mitchell J, Ryan MA. Tissue phospholipid fatty acid composition in the diabetic rat. *Lipids*. 1984;19(5):367–70.
425. Ruiz-Gutierrez V, Stiefel P, Villar J, García-Donas MA, Acosta D, Carneado J. Cell membrane fatty acid composition in Type 1 (insulin-dependent) diabetic patients: relationship with sodium transport abnormalities and metabolic control. *Diabetologia*. 1993;36(9):850–6.
426. Ghebremeskel K, Thomas B, Lowy C, Min Y, Crawford MA. Type 1 diabetes compromises plasma arachidonic and docosahexaenoic acids in newborn babies. *Lipids*. 2004;39(4):335–42.
427. Toda N, Nakanishi-Toda M. Nitric oxide: Ocular blood flow, glaucoma, and diabetic retinopathy. *Prog Retin Eye Res*. 2007;26(3):205–38.
428. Cavet ME, Vittitow JL, Impagnatiello F, Ongini E, Bastia E. Nitric Oxide (NO): An emerging target for the treatment of glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014; 14;55(8):5005-15.
429. Tomlinson DR, Fernyhough P, Diemel LT. Role of neurotrophins in diabetic neuropathy and treatment with nerve growth factors. *Diabetes*. 1997; 46 (2 Suppl):S43-9.
430. Zhang L, Ino-ue M, Dong K, Yamamoto M. Retrograde axonal transport impairment of large- and medium-sized retinal ganglion cells in diabetic rat. *Curr Eye Res*. 2000;20(2):131–6.
431. Ino-Ue M, Zhang L, Naka H, Kuriyama H, Yamamoto M. Polyol metabolism of retrograde axonal transport in diabetic rat large optic nerve fiber. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41(13):4055–8.
432. Piette SD, Sergott RC. Pathological optic-disc cupping. *Curr Opin Ophthalmol*. 2006;17(1): 1–6.
433. Lim MC, Tanimoto SA, Furlani BA, Lum B, Pinto LM, Eliason D, et al. Effect of diabetic retinopathy and panretinal photocoagulation on retinal nerve fiber layer and optic nerve appearance. *Arch Ophthalmol*. 2009;127(7):857–62.
434. Bui BV, Loeliger M, Thomas M, Vingrys AJ, Rees SM, Nguyen CTO, et al. Investigating structural and biochemical correlates of ganglion cell dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Exp Eye Res*. 2009;88(6):1076–83.
435. Biffi A, Sonni A, Anderson CD, Kissela B, Jagiella JM, Schmidt H, et al. Variants at APOE influence risk of deep and lobar intracerebral hemorrhage. *Ann Neurol*. 2010;68(6):934–43.
436. Greenberg SM, Vonsattel JPG, Segal AZ, Chiu RI, Clatworthy AE, Liao A, et al. Association of apolipoprotein E and $\epsilon 2$ vasculopathy in cerebral amyloid angiopathy. *Neurology*. 1998;50(4):961–5.

437. Pawlikowska L, Poon KYT, Achrol AS, McCulloch CE, Ha C, Lum K, et al. Apolipoprotein E ϵ 2 is associated with new hemorrhage risk in brain arteriovenous malformations. *Neurosurgery*. 2006;58(5):838–42.
438. Achrol AS, Kim H, Pawlikowska L, Poon KYT, Mcculloch CE, Ko NU, et al. Association of tumor necrosis factor-alpha-238G>A and apolipoprotein E2 polymorphisms with intracranial hemorrhage after brain arteriovenous malformation treatment clinical studies. 2007;61(4):731-9.
439. Wang AYM, Lee PY, Bui BV, Jobling AI, Greferath U, Brandli A, et al. Potential mechanisms of retinal ganglion cell type-specific vulnerability in glaucoma . Vol. 103, *Clinical and Experimental Optometry*. Blackwell Publishing Ltd; 2020 [cited 2021 Feb 23]. p. 562–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31838755/>
440. Budenz DL, Anderson DR, Feuer WJ, Beiser JA, Schiffman J, Parrish RK, et al. Detection and Prognostic Significance of Optic Disc Hemorrhages during the Ocular Hypertension Treatment Study. *Ophthalmology*. 2006;113(12):2137–43.
441. Bengtsson B, Leske MC, Yang Z, Heijl A. Disc Hemorrhages and Treatment in the Early Manifest Glaucoma Trial. *Ophthalmology*. 2008;115(11):2044–8.
442. Kim KE, Park KH. Optic disc hemorrhage in glaucoma: Pathophysiology and prognostic significance. *Curr Opin Ophthalmol*. 2017;28(2): 105–12.
443. Kovacs GG. Tauopathies. *Handb Clin Neurol*. 2017;(145): 355–68.
444. Charidimou A, Zonneveld HI, Shams S, Kantarci K, Shoamanesh A, Hilal S, et al. APOE and cortical superficial siderosis in CAA: Meta-analysis and potential mechanisms. *Neurology*. 2019;93(4):E358–71.
445. Suri S, Heise V, Trachtenberg AJ, Mackay CE. The forgotten APOE allele: A review of the evidence and suggested mechanisms for the protective effect of APOE ϵ 2. *Neurosci Biobehav Rev*. 2013;10(Pt 2):2878-86.
446. Roses A, Saunders A, Corder E, Pericak-Vance M, Han S, Einstein G, et al. Influence of the susceptibility genes apolipoprotein E-epsilon 4 and apolipoprotein E-epsilon 2 on the rate of disease expressivity of late-onset Alzheimer's disease. *Arzneimittelforschung*. 1995;45(3A):413–7.
447. Caselli RJ, Dueck AC. APOE ϵ 2 and presymptomatic stage Alzheimer disease: How much is not enough?. *Neurology*. 2010;75(22):1952–3.
448. Anuurad E, Rubin J, Lu G, Pearson TA, Holleran S, Ramakrishnan R, et al. Protective effect of apolipoprotein E2 on coronary artery disease in African Americans is mediated through lipoprotein cholesterol. *J Lipid Res*. 2006;47(11):2475–81.
449. Vaisi-Raygani A, Rahimi Z, Nomani H, Tavilani H, Pourmotabbed T. The presence of apolipoprotein ϵ 4 and ϵ 2 alleles augments the risk of coronary artery disease in type 2 diabetic patients. *Clin Biochem*. 2007;40(15):1150–6.
450. Baird PN, Guida E, Chu DT, Vu HTV, Guymer RH. The ϵ 2 and ϵ 4 alleles of the apolipoprotein gene are associated with age-related macular degeneration. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45(5):1311–5.
451. Verghese PB, Castellano JM, Holtzman DM. Apolipoprotein E in Alzheimer's disease and other neurological disorders. *Lancet Neurol*. 2011;10(3): 241–52.

452. Thakkinstian A, Bowe S, McEvoy M, Smith W, Attia J. Association between apolipoprotein E polymorphisms and age-related macular degeneration: A HuGE review and meta-analysis. *Am J Epidemiol.* 2006;164(9):813–22.
453. Wickremasinghe SS, Xie J, Lim J, Chauhan DS, Robman L, Richardson AJ, et al. Variants in the APOE gene are associated with improved outcome after anti-VEGF treatment for neovascular AMD. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(7):4072–9.
454. Levy O, Calippe B, Lavalette S, Hu SJ, Raoul W, Dominguez E, et al. Apolipoprotein E promotes subretinal mononuclear phagocyte survival and chronic inflammation in age-related macular degeneration. *EMBO Mol Med.* 2015;7(2):211–26.
455. Levy O, Lavalette S, Hu SJ, Housset M, Raoul W, Eandi C, et al. APOE isoforms control pathogenic subretinal inflammation in age-related macular degeneration. *J Neurosci.* 2015; 35(40):13568–76.
456. Sun Y, Song R, Ai Y, Zhu J, He J, Dang M, et al. APOE2 promotes the development and progression of subretinal neovascularization in age-related macular degeneration via MAPKs signaling pathway. *Saudi J Biol Sci.* 2020;27(10):2770–7.
457. Wiggs JL, Hauser MA, Abdrabou W, Allingham RR, Budenz DL, Delbono E, et al. The NEIGHBOR Consortium Primary Open-Angle glaucoma genome-wide association study: Rationale, study design, and clinical variables. *J Glaucoma.* 2013; 22(7):517–25.
458. Hu Y. The APOE gene and its interactions with SNPs of other genes in primary open angle glaucoma and age-related macular degeneration. [thesis]. Shantou (China). Shantou University; 2007.
459. Zhu H, Xue H, Wang H, Ma Y, Liu J, Chen Y. The association of apolipoprotein E (APOE) gene polymorphisms with atherosclerosis susceptibility: a meta-analysis. *Minerva Cardioangiol.* 2016;64(1):47-54.
460. Liberopoulos E, Siamopoulos K, Elisaf M. Apolipoprotein E and Renal Disease. *Am J Kidney Dis.* 2004;43(2):223–33.
461. Wray NR, Goddard ME, Visscher PM. Prediction of individual genetic risk to disease from genome-wide association studies. *Genome Res.* 2007;17(10):1520–8.

8. ANEXOS

Anexo 8.1 - Parecer consubstanciado



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: ASPECTOS GENÉTICOS DE DOENÇAS OFTALMOLÓGICAS

Pesquisador: Mônica Barbosa de Melo

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 3

CAAE: 49120615.4.0000.5404

Instituição Proponente: Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO
MINISTERIO DA EDUCACAO
MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.824.559

Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma emenda que visa incluir um novo subprojeto dentro do projeto temático já aprovado pelo CEP. As alterações foram no TCLE, projeto e inclusão de um novo aluno como membro da equipe de pesquisa.

Objetivo da Pesquisa:

Mantidos em relação ao projeto original.

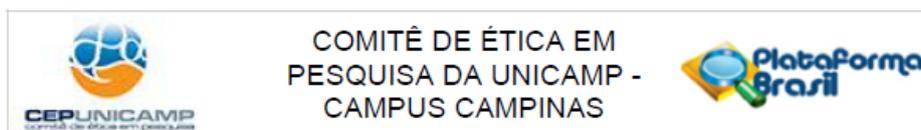
Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Mantidos em relação ao projeto original.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisadora responsável solicita a inclusão do subprojeto: "AVALIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS 2/ 3/ 4 NO GENE APOE EM RELAÇÃO À ETIOLOGIA DO GLAUCOMA PRIMÁRIO DE ÂNGULO ABERTO EM UMA AMOSTRA DA POPULAÇÃO BRASILEIRA" e a inclusão do pesquisador **Marcelo Luís Occhiutto** como membro da equipe de pesquisa. Um novo TCLE foi anexado adicionando o título do novo subprojeto e mantendo as demais informações.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 1.824.559

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Para análise desta emenda foram avaliados os documentos anexados:

1-PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_820181_E2.pdf 07/11/2016 13:36:28

2-ASPECTOS_GENETICOS_DE_DOENCAS_OFTALMOLOGICAS.pdf

3-TCLE_ofthalmo.pdf 07/11/2016 13:33:03

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Emenda aprovada.

Considerações Finais a critério do CEP:

- O sujeito de pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (quando aplicável).

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (quando aplicável).

- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.

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

- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas e aguardando a aprovação do CEP para continuidade da pesquisa. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
 UF: SP Município: CAMPINAS
 Telefone: (19)3521-8938 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 1.824.559

- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

- Lembramos que segundo a Resolução 466/2012, item XI.2 letra e, "cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento".

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|---|--|------------------------|------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_820181 E2.pdf | 07/11/2016 13:36:28 | | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | ASPECTOS_GENETICOS_DE_DOENCAS_OFTALMOLOGICAS.pdf | 07/11/2016 13:33:22 | Mônica Barbosa de Melo | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE_ofitalmo.pdf | 07/11/2016 13:33:03 | Mônica Barbosa de Melo | Aceito |
| Folha de Rosto | FolhadeRosto.pdf | 08/09/2015 17:16:01 | Mônica Barbosa de Melo | Aceito |
| Outros | autorizacaocoletadados.pdf | 08/09/2015 15:22:00 | Mônica Barbosa de Melo | Aceito |
| Outros | Regulamentobiorrepositorio.pdf | 08/09/2015 15:20:51 | Mônica Barbosa de Melo | Aceito |

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 18 de Novembro de 2016

Assinado por:
Renata Maria dos Santos Celeghini
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
UF: SP Município: CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fom.unicamp.br

Anexo 8.2 - Artigo publicado

OPHTHALMIC GENETICS
<https://doi.org/10.1080/13816810.2020.1849314>



RESEARCH REPORT



"Association of *APOE* gene polymorphisms with primary open angle glaucoma in Brazilian patients"

Marcelo Luis Occhitutto^a, Mônica Barbosa de Melo^b, José Paulo Cabral de Vasconcelos^a, Thiago Adalton Rosa Rodrigues^b, Flávia Fialho Bajano^b, Fernando Ferreira Costa^c, and Vital Paulino Costa^a

^aDepartment of Ophthalmology, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas – UNICAMP, Campinas, Brazil; ^bLaboratory of Human Genetics, Center for Molecular Biology and Genetic Engineering – CBMEG, Campinas, Brazil; ^cHematology and Hemotherapy Center, University of Campinas – UNICAMP, Campinas, Brazil

ABSTRACT

Background: Primary open-angle glaucoma (POAG) is a multifactorial disease that affects 65.5 million people worldwide. In addition to the genetic variants already established as indicators of greater risk for POAG, the apolipoprotein (*APOE*) gene has been studied in some populations, with controversial results. The aim of this study is to investigate the frequency of the genetic variants of *APOE* in the Brazilian population, and to evaluate the association between these polymorphisms and the risk of POAG.

Methods: *APOE* variants (rs429358; rs7412) were genotyped in 402 POAG patients and 401 controls. We evaluated the association between *APOE* genetic variants and the risk for POAG, as well as the correlation between the requirement of glaucoma surgery and the *APOE* polymorphisms.

Results: Among the three *APOE* gene isoforms, we found a low frequency of *APOE* alleles $\epsilon 2$ (7.34%) and $\epsilon 4$ (11.76%), but a high frequency of $\epsilon 3$ (80.88%) in our population. When compared to $\epsilon 3\epsilon 3$ reference genotype, $\epsilon 2$ allele-carriers (OR = 1.516; p -value = 0.04) and $\epsilon 2\epsilon 3$ genotype (OR = 1.655; p -value = 0.02) were associated with a greater risk for POAG. An additive genetic model confirmed the influence of the $\epsilon 2$ allele in the risk of POAG in this sample of the Brazilian population (OR = 1.502; p -value = 0.04). There was no significant association between the analyzed genotypes and the requirement or number of glaucoma surgeries ($p > .05$).

Conclusion: Brazilian individuals carrying the *APOE* $\epsilon 2$ allele may be at an increased risk for the development of POAG.

ARTICLE HISTORY

Received August 03, 2020
 Revised September 21, 2020
 Accepted November 02, 2020

KEYWORDS

Apolipoproteins E; rs429358; rs7412

Introduction

Glaucoma is an optic neuropathy of multifactorial etiology, caused by the interaction of genetic, environmental and systemic factors (1), characterized by the gradual loss of optic nerve axons and retinal ganglion cells, resulting in progressive visual field defects (2–4). It is the leading cause of irreversible blindness in the world, with 80 million individuals estimated to become blind by 2020 (5), and 111.8 million in 2040 (6). Seventy-five to 90% of glaucoma cases have primary open-angle glaucoma (POAG) phenotypes (5–7).

Despite recent findings revealed by linkage analyses and genome-wide association studies (GWAS), 90% of POAG cannot be genetically explained (2,8). Complex diseases such as rheumatoid arthritis, diabetes, and glaucoma are likely to be influenced by several interacting loci (9–11). Case-control studies with large cohorts using high-density markers such as single nucleotide polymorphisms are still one of the most effective approaches currently available for the evaluation of quantitative genetics for disease traits (12).

The familial nature of POAG has been reported in a number of studies (13–15), and glaucoma-linked genetic elements, such as *MYOC*, *OPTN*, *WDR36*, *ABCA1*, *CAVI*, *CDKN2B-AS1*, *FOXO1*, *SIX6*, and *TMCO1* have been identified (2).

However, there are other genetic variants that have been associated with POAG in specific ethnic groups (16), including the Apolipoprotein E (*APOE*) gene (17,18), which has been implicated as a contributor gene to the pathogenesis of this complex disease (19,20).

APOE is a 299-amino acid protein that works as a key regulator of plasma lipid levels and is a ligand for low-density lipoprotein receptors (21,22). Human *APOE* exists as three major codominant isoforms (E2, E3, and E4) (23), encoded by three alleles ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$) in a single gene located in chromosome 19q13.2 (24). The three isoforms are the result of two non-synonymous single-nucleotide polymorphisms (SNPs), rs429358 and rs7412, located in exon 4 of the *APOE* gene (25). The genetic variants $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, and $\epsilon 4$ are haplotypes of the *APOE* gene, engendered by the combination of each allele from the two referred SNPs at the *APOE* locus (26).

The most prevalent isoform $\epsilon 3$ has a cysteine in position 112 and an arginine residue in position 158; isoform E4 has two arginine residues, and the least common isoform E2 has two cysteine residues (27). Thus, since the *APOE* gene locus is polymorphic, six possible genotypes are formed by the combination of the three alleles: three homozygous (*APOE*- $\epsilon 2/\epsilon 2$, $\epsilon 3/\epsilon 3$, and $\epsilon 4/\epsilon 4$), and three heterozygous (*APOE*- $\epsilon 2/\epsilon 3$, $\epsilon 3/\epsilon 4$, and $\epsilon 2/\epsilon 4$) (28–30). Even though $\epsilon 3$ is the most common allele and

CONTACT Marcelo Luis Occhitutto marcelococchitutto@uol.com.br Department of Ophthalmology, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas – UNICAMP, Campinas, SP, Brazil.
 © 2020 Taylor & Francis Group, LLC

APOE ε3/ε3 is the most common genotype, the frequency of the alleles and genotypes differ among distinct populations (31–38).

APOE is a primary lipid transporter found in the brain, where it plays an essential role in the maintenance and repair of neurons, neuronal signaling and glucose metabolism (39). Individuals who carry the *APOE*ε4 have been associated with a variety of neurodegenerative diseases (such as Alzheimer's disease) (40), higher mortality after acute cerebral ischaemia (41), and poor outcome following traumatic head injury (42,43). In the living rabbit, *APOE* has been demonstrated to be synthesized by Müller cells, the predominant glial cell of the retina, and transferred after secretion into the vitreous (44). *APOE* is then absorbed by the retinal ganglion cells and transported into the optic nerve as an intact molecule. The presence of *APOE* in retinal ganglion cells, along with evidence indicating that direct and transsynaptic anterograde axonal degeneration occurs in glaucomatous eyes (45), has led to the hypothesis that *APOE* variants could be related to neuronal damage (17). However, the association between *APOE* and POAG is controversial, with some studies demonstrating a positive association (17,18,46–49), while others did not confirm such results (50–53).

The genetic profile of the Brazilian population is highly heterogeneous, resulting from more than five centuries of admixture among native American-Indians, Europeans and Africans (54,55). Moreover, Brazil is a country of continental dimensions, and each of its regions underwent distinct admixture dynamics, making every local population unique in terms of genetic ancestry (54). The association between *APOE* gene variants and POAG has not been evaluated in Brazilian individuals. Therefore, we conducted this study to investigate the frequency of the genetic variants of *APOE* in a sample of the Brazilian population, and to evaluate the association between these polymorphisms and the risk of POAG.

Methods

This study was conducted in adherence to the ethical tenets of the last revised Declaration of Helsinki (2000). The study was approved by the Research Ethics Committee of the Faculty of Medical Sciences, University of Campinas. Informed consent was obtained from each study subject after detailed explanation of the purpose of this investigation.

A total of 402 unrelated Brazilian patients with POAG were recruited from the Glaucoma Service of the University of Campinas, where a complete ophthalmological evaluation was carried out. As control subjects, 401 unrelated Brazilian individuals, with no family or personal history of glaucoma were recruited from the same hospital. All participants from both groups aged above 40 years.

All the affected and control subjects underwent an interview and chart review to identify personal or family history of glaucoma and/or blindness. All patients diagnosed with POAG had an open angle at gonioscopy and fulfilled 3 of the following criteria: (i) IOP > 21 mmHg; (ii) typical glaucomatous optic disc, defined when at least two of the following characteristics were present: cup-to-disk ratio (CDR) > 0.7, CDR asymmetry >0.2, thinning of the

neuroretinal rim, optic disc hemorrhage, or optic disc notch; (iii) typical glaucomatous visual field defects observed with automated achromatic threshold perimetry using the 30–2 or 24–2 programs of the Humphrey Field Analyzer (Humphrey Instruments, San Leandro, CA) and defined as a pattern standard deviation outside the 95% normal limits or a glaucoma hemifield test outside the 99% limits; (iv) retinal nerve fiber layer (RNFL) and/or ganglion cell complex abnormalities detected on optical coherence tomography (OCT) (Spectralis*, Heidelberg Engineering Inc., Franklin, MA). Patients with secondary glaucomas, developmental glaucomas, high myopia (<–6.00 spherical diopters), fundoscopic changes compatible with age-related macular degeneration (AMD), severe non-proliferative or proliferative diabetic retinopathy were excluded. Patients with other optic neuropathies, neurologic disorders, neurodegenerative diseases or any ocular or systemic disease that could affect the visual field, or the optic nerve were also excluded.

The control group consisted of individuals who attended the ophthalmology clinic for routine ophthalmic examination, medical staff and unrelated patient companions. All control subjects had a normal ophthalmologic exam, with IOPs lower than 16 mmHg, CDR < 0.4, no fundoscopic changes compatible with AMD, and no family history of glaucoma or blindness of unknown origin.

We evaluated the requirement for glaucoma surgery among the patients. The indication for surgery was left at the discretion of glaucoma specialists, but in general reflected cases in which there was uncontrolled IOP or glaucoma progression under maximum tolerated medication.

DNA extraction and genotyping

Genomic DNA was extracted from four milliliters of peripheral blood using the phenol/chloroform method (56). The primers amplified a region of 400 bp that spans both *APOE* variant sites, as reported by Wenham et al. (57).

PCR was performed using the following reagents: 0.25 µl of each primer 20 pmol/µl, comprising variants rs428358 and rs7412 of the *APOE* gene (direct sequence: 5' TCCAAGGAGCTGCAGGCGCGCA 3' and reverse: 5' GCCCGGCCTGGTACTACTGCCA 3'), 2.5 µl of 10X enzyme buffer (10X Buffer: 20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM KCl, 0.01% gelatin), 1.5 µl of 50 µM MgCl₂, 0.5 µl of 10% DMSO, 0.5 µl of the 10 mM nucleotide mixture (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), and 0.1 µl of Taq DNA polymerase 10 U/µl (Invitrogen Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA), added to 1 µl of 50 ng/µl genomic DNA. The final volume was completed with ultrapure water to reach 25 µl.

Amplification conditions were initial denaturation at 95°C for 5:00 min, followed by 35 cycles of DNA denaturation at 95°C for 1 minute, annealing temperature at 58°C for 1:30 minutes, and extension at 72°C for 1:30 min, ending with additional extension at 72°C for 7 minutes. All purified fragments were subjected to direct sequencing with BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1* (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) and submitted to electrophoresis in the ABI 3530 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

FinchTV software (Geospiza, Seattle, WA) was used to confirm the presence or absence of the SNPs.

Statistical analysis

The SAS (Statistical Analysis System) for Windows release 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), and R-software for Statistical Computing (R version 4.0.0 from <https://www.r-project.org>) were used for statistical analysis.

Hardy-Weinberg equilibrium was tested using the chi-square goodness-of-fit test. In order to analyze the association between *APOE* variants and the phenotype, we employed univariate logistic regression, with gender, alleles and genotypes as independent variables.

Since E3 is the most common isoform (27,58), $\epsilon 3/\epsilon 3$ genotype were assigned as reference categories in the present study. The $\epsilon 2$ carriers were defined as individuals with the $\epsilon 2/\epsilon 2$, $\epsilon 2/\epsilon 3$ or $\epsilon 2/\epsilon 4$ genotypes. The $\epsilon 4$ carriers included patients with the $\epsilon 3/\epsilon 4$, $\epsilon 2/\epsilon 4$ or $\epsilon 4/\epsilon 4$ genotypes. We estimated the risk of POAG among $\epsilon 2$ carriers and $\epsilon 4$ carriers versus the $\epsilon 3/\epsilon 3$ genotype. We also performed genotypic analysis, comparing the frequency of all genotypes with the reference genotype ($\epsilon 3/\epsilon 3$). Lastly, we performed an additive genetic model of all carriers of the $\epsilon 2$ allele ($\epsilon 2\epsilon 2 + \epsilon 2\epsilon 3 + \epsilon 2\epsilon 4$) versus all non-carriers of the $\epsilon 2$ allele ($\epsilon 3\epsilon 3 + \epsilon 3\epsilon 4 + \epsilon 4\epsilon 4$). Logistic regression analysis was employed in the above-mentioned comparisons.

We also investigated whether the requirement and the number of glaucoma surgeries were related to the genetic variants using the chi-square goodness-of-fit and Mann-Whitney tests, respectively.

Statistical significance was defined as a p -value < 0.05 , and it was adjusted for age.

Results

Demographic data

Four hundred and two POAG patients and 401 controls were recruited in this case-control study. Among POAG patients, 219 (54.5%) were males, whereas 199 (49.6%) were males in the control group ($p = .169$). In the affected group, the mean age was 68.48 ± 11.20 years (ranging from 40 to 92 years), whereas in the control group the mean age was 65.08 ± 11.13 years (ranging from 40 to 89 years). Since patients were significantly older than controls ($p < .0001$), we decided to adjust for age in all our analyses.

Association of *APOE* variants with POAG

Frequencies of *APOE* genotypes followed Hardy-Weinberg equilibrium in case and control groups. Tables 1 and 2 show

Table 1. Frequency of *APOE* alleles in POAG patients and controls.

| <i>APOE</i> Alleles | POAG patients (n, %) | Controls (n, %) |
|---------------------|----------------------|-----------------|
| 2 | 69 (8.58) | 49 (6.11) |
| 3 | 643 (79.97) | 656 (81.79) |
| 4 | 92 (11.44) | 97 (12.09) |

Table 2. Frequency of *APOE* genotypes in POAG patients and controls.

| <i>APOE</i> Genotypes | POAG patients (n, %) | Controls (n, %) |
|-----------------------|----------------------|-----------------|
| 2/ 2 | 1 (0.25) | 1 (0.25) |
| 2/ 3 | 64 (15.92) | 41 (10.22) |
| 2/ 4 | 3 (0.75) | 6 (1.50) |
| 3/ 3 | 254 (63.18) | 267 (66.58) |
| 3/ 4 | 71 (17.66) | 81 (20.20) |
| 4/ 4 | 9 (2.24) | 5 (1.25) |

Table 3. Comparison of *APOE* genotype frequencies between affected individuals and controls (adjusted for age), through univariate logistic regression analyses.

| Genotype comparison | Odds ratio | Confidence Interval 95% | p -value |
|--|------------|-------------------------|------------|
| $\epsilon 2$ carriers ($\epsilon 2/\epsilon 2 + \epsilon 2/\epsilon 3 + \epsilon 2/\epsilon 4$) vs $\epsilon 3/\epsilon 3$ | 1.516 | 1.005–2.302 | 0.048 |
| $\epsilon 4$ carriers ($\epsilon 3/\epsilon 4 + \epsilon 4/\epsilon 4 + \epsilon 2/\epsilon 4$) vs $\epsilon 3/\epsilon 3$ | 0.987 | 0.698–1.396 | 0.944 |
| $\epsilon 2/\epsilon 3$ vs $\epsilon 3/\epsilon 3$ | 1.655 | 1.077–2.568 | 0.022 |
| $\epsilon 2/\epsilon 4$ vs $\epsilon 3/\epsilon 3$ | 0.597 | 0.123–2.323 | 0.474 |
| $\epsilon 3/\epsilon 4$ vs $\epsilon 3/\epsilon 3$ | 0.953 | 0.660–1.374 | 0.796 |
| $\epsilon 4/\epsilon 4$ vs $\epsilon 3/\epsilon 3$ | 2.202 | 0.745–7.298 | 0.165 |
| $(\epsilon 2/\epsilon 2 + \epsilon 2/\epsilon 3 + \epsilon 2/\epsilon 4)$ vs ($\epsilon 3/\epsilon 3 + \epsilon 3/\epsilon 4 + \epsilon 4/\epsilon 4$) | 1.502 | 1.006–2.258 | 0.047 |

$\epsilon 2/\epsilon 2$ genotype was excluded from the genotypic comparison with $\epsilon 3/\epsilon 3$ due to their low frequency in our sample (one $\epsilon 2/\epsilon 2$ in each group)

Table 4. Requirement of glaucoma surgery among different *APOE* variant carriers.

| <i>APOE</i> Genotype | No surgery [n (%)] | Glaucoma surgery performed [n (%)] |
|---|--------------------|------------------------------------|
| $\epsilon 2$ carriers ($\epsilon 2/\epsilon 2 + \epsilon 2/\epsilon 3 + \epsilon 2/\epsilon 4$) | 29 (46.78) | 33 (53.22) |
| $\epsilon 3/\epsilon 3$ | 116 (47.54) | 128 (52.46) |
| $\epsilon 4$ carriers ($\epsilon 3/\epsilon 4 + \epsilon 4/\epsilon 4 + \epsilon 2/\epsilon 4$) | 31 (38.75) | 49 (61.25) |

p -value: 0.383

the allelic and genotypic frequencies of the *APOE* polymorphisms in POAG patients and controls.

The results of the logistic regression analyses comparing the frequencies of $\epsilon 2$ -carriers and $\epsilon 4$ carriers and the different genotypes versus homozygote $\epsilon 3$, as well as the additive genetic model, are shown in Table 3.

After adjusting for age, we observed that $\epsilon 2$ -carriers had a higher risk of developing POAG than $\epsilon 3/\epsilon 3$ individuals (OR = 1.516; p -value = 0.048). Furthermore, $\epsilon 2\epsilon 3$ individuals showed a higher risk for POAG than $\epsilon 3/\epsilon 3$ individuals (OR = 1.655; p -value = 0.022). Finally, a significant association was found in the additive genetic model, which confirmed the influence of the $\epsilon 2$ allele on the risk of POAG (OR = 1.502; p -value = 0.047).

We also evaluated the relationship between different *APOE* allele carriers and the requirement of glaucoma surgery. Among the 402 POAG patients, 383 (95.27%) were analyzed with respect to surgical treatment, since 19 patients had insufficient information/follow-up. Table 4 demonstrates that the requirement of glaucoma surgery was similar between $\epsilon 2$ carriers, $\epsilon 4$ carriers and individuals with the $\epsilon 3/\epsilon 3$ genotype (p -value = 0.383). Table 5 shows the mean number of glaucoma surgeries among different *APOE* allele carriers. The mean number of glaucoma surgeries did not differ between $\epsilon 2$ carriers, $\epsilon 4$ carriers and individuals with the $\epsilon 3/\epsilon 3$ genotype (p -value = 0.350).

Table 5. Genotypic comparisons between operated patients with the number of antiglaucomatous surgeries performed.

| APOE genotype | n | Mean | Median | SD | Min | Max |
|-------------------------------------|-----|------|--------|------|------|------|
| ε2 carriers (ε2/ε2 + ε2/ε3 + ε2/ε4) | 62 | 0.79 | 1.00 | 0.85 | 0.00 | 3.00 |
| ε3/ε3 | 244 | 0.75 | 1.00 | 0.87 | 0.00 | 3.00 |
| ε4 carriers (ε3/ε4 + ε4/ε4 + ε2/ε4) | 80 | 0.91 | 1.00 | 0.86 | 0.00 | 3.00 |

p-value: 0.350

Discussion

In order to evaluate the effect of the genetic variants of the *APOE* gene in relation to the development of POAG, we conducted this case-control study in a cohort of 803 individuals from Southeast Brazil. To our knowledge, this is the first report to investigate the association between POAG and *APOE* genetic variants in a Brazilian population.

We have observed low frequencies of the *APOE* ε2 (7.34%) and ε4 (11.76%) alleles, but a high frequency (80.88%) of ε3. Similar distributions of *APOE* alleles were reported in the Brazilian (59–61) and other populations around the world. These studies demonstrated allele frequency that ranged from 0 to 12% for ε2, 75 to 90% for ε3, and 6 to 20% for ε4 alleles (34,38,62,63).

Environmental conditions and lifestyle characteristics of a given population may influence their *APOE* genotypic frequency. In fact, *APOE* ε3 is the most frequent allele in all populations, notably in those with a long-established agricultural economy, such as East Asia (82–87%) or the Mediterranean (85–90%). On the other hand, the frequency of *APOE* ε4, the ancestral allele identified as the 'thrifty' one, remains higher in populations where the food supply is (or was until the recent past) sporadically obtainable or qualitatively poor, or where an economy of foraging still exists, such as the Pygmies (41%), Khoi San (37%), Aborigines of Australia (26%) and Malaysia (24%), Papuans (37%), some Native Americans (28%), and Lapps (31%) (38). The exception is *APOE* ε2, whose frequencies fluctuate between 2 and 14%. *APOE* ε2 is absent in Native Americans and Aborigines of Australia, but reaches its highest frequency among the Papuans (14%) (38). Hence, the existence of regional differences in the frequencies of *APOE* genotypes clearly justifies the necessity to perform genetic studies in different geographic areas, including the Brazilian population.

Our findings revealed significant differences in the frequencies of ε2 carriers between POAG patients and the control group (ε2-carriers vs ε3-ε3; OR = 1.516; *p*-value = 0.048). This association was confirmed when we compared the genotype ε2-ε3 vs ε3-ε3 (OR = 1.655; *p*-value = 0.022) and when all ε2 carriers were compared with non-carriers (OR = 1.502; *p*-value = 0.047). Hence, different analyses indicate that the inheritance of the ε2 allele may be a risk factor for the development of POAG in this sample of the Brazilian population.

In this study, we also investigated the rates of glaucoma surgery among the different *APOE* genotypes, attempting to evaluate the aggressiveness of the glaucoma in each group. However, our findings showed that neither the requirement of surgery (*p*-value = 0.383) nor the number of surgeries (*p*-value = 0.350) were different between genotypes.

Several case-control studies have investigated the role of *APOE* gene variants in the development of POAG, but their results were inconclusive or conflicting. Mabuchi et al. (18) showed that the frequencies of *APOE* ε2 and ε4 alleles in Japanese POAG patients were less frequent than in control subjects (*p* = .048), suggesting a reduction in disease risk with the ε2 and ε4 alleles. A similar result was reported by Margeta et al. (64), who identified that *APOE* ε4 allele is associated with a reduced risk of POAG in a large cohort. In contrast, other studies found no significant differences between the frequencies of *APOE* ε2 and ε4 alleles in POAG patients and controls (50,51,65). On the other hand, Al-Dabbagh et al. (66) reported a significantly higher frequency of the ε4 allele in POAG patients than controls in Saudis (*p* = .034), a finding that was confirmed by Yuan et al. (47) in the Chinese population.

There are two reports suggesting a positive association between *APOE* ε2 and glaucoma: Jünemann et al. (46) showed that German individuals carrying the ε2 allele had a significantly higher mean intraocular pressure during a 24-hour diurnal curve than controls. Chiras et al. (67) reported a higher frequency of the ε2 allele in POAG Greek patients (19%) relative to the controls (5%; *p* = .012), which led to an increased risk of developing POAG in ε2 carriers (OR = 4.35, 95% CI = 1.28–14.72).

In addition to case-control studies, some meta-analyses suggested an association between certain types of *APOE* variants and POAG. Liao et al. and Wang et al., for example, reported that the ε4/ε4 genotype was associated with elevated risk for POAG in Asians (20,68). However, other meta-analyses indicated that none of the *APOE* variants was associated with POAG susceptibility (69,70). The diversity of results may be attributed to the broad ethnic specificities of different groups throughout the world, as well as to multiple susceptibility genes and environmental factors, which may independently or interactively influence the pathogenesis of POAG.

An increased incidence of ε4 carriers among patients with neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease (AD) and Parkinson's disease established the theoretical basis to justify a possible etiopathogenic correlation between ε4 carriers and glaucoma (71–73).

The present study is the first to indicate that *APOE*ε2 carriers, especially those with ε2ε3 genotype, are at greater risk for the development of POAG. The association between *APOE*ε2 and some metabolic and neurological diseases may help explain the possible etiopathogenic correlation between the risk of developing glaucoma and the *APOE*ε2 allele.

GWAS studies have placed *APOE* as a novel type 2 diabetes susceptibility locus (74,75). Recently, Santos-Ferreira et al. (76) suggested a two-fold increase in type 2 diabetes mellitus incidence in *APOE*ε2 carriers. There is enough evidence in the literature demonstrating an association between POAG and type 2 diabetes (77–85). Song et al. (86) reported that the occurrence of diabetes mellitus and uncontrolled glucose serum levels are associated with increased intraocular pressure – the primary risk factor for glaucoma optic neuropathy. Therefore, we can hypothesize that *APOE*ε2 carriers may trigger metabolic changes that induce the occurrence of both diabetes and POAG in susceptible patients.

APOE genetic variations have also been shown to increase vascular instability and the risk of hemorrhagic phenomena. Achrol et al. (87) demonstrated a positive association between $\epsilon 2$ genotype and the risk of intracranial hemorrhage after brain arteriovenous malformation treatment in a longitudinal study (3.2-fold risk in *APOE2* carriers), indicating an increased vascular instability and a higher risk of hemorrhagic phenomena. Recently, vascular instability has been proposed as a potential mechanism involved in retinal ganglion cell vulnerability in glaucoma (88). Furthermore, *APOE2*-induced vascular instability may also be associated with an increased risk for optic disc hemorrhages, a well-known risk factor for glaucoma progression.

Some neurological disorders, such as tauopathy, caused by the aggregation of tau protein into gliofibrillary or neurofibrillary tangles in the human brain tissue (89), are more prevalent in individuals carrying the *APOE* $\epsilon 2/\epsilon 2$ genotype (90). Both $\epsilon 4$ and $\epsilon 2$ have direct effects on neural tissue (91–93), and other organs (94–96). However, studies evaluating the key functions of *APOE2*, such as its effect on receptor affinities, synaptic integrity, antioxidant activity and participation on metabolism are scarce. Hence, participation in neurodegenerative events is not exclusive to *APOE4* carriers (97), and both *APOE2* and *APOE4* could potentially influence the optic nerve degenerative events that occur in glaucoma patients.

Degenerative eye diseases such as AMD are also associated with the *APOE* gene. In fact, Xiyang et al. (98) recently published a large meta-analysis including 13842 cases and 38647 controls, which revealed that $\epsilon 4$ exerts a protective role on AMD. Masuda et al. (99) demonstrated that both *APOE2* and *APOE3* promote retinal pathologic neovascularization. Our group recently concluded the analysis of a 963 case-control study of AMD Brazilian patients, which confirmed the protective role of the $\epsilon 4$ variant in the development of AMD (unpublished data). Since there is a positive association between *APOE* and AMD, we decided to exclude patients with AMD from both the glaucoma and control groups.

There are limitations of this exploratory investigation. Although we excluded patients with AMD and neurodegenerative diseases due to the positive association with *APOE*, we did not exclude other diseases known to be correlated with the *APOE* gene, such as atherosclerosis (100) and some renal diseases (101).

Secondly, although our sample size is the second largest compared to the other 12 studies that investigated the association between *APOE* polymorphisms and POAG (20,64,70), a larger number of individuals from different geographic areas is desirable to confirm any finding of gene-specific candidate-driven studies, especially when the investigated variant is rare. In fact, a post-hoc analysis indicated that the statistical power of identifying the variant $\epsilon 2$ and $\epsilon 2/\epsilon 3$ genotype as risk factors for POAG in our series were 51,4% and 66,9%, respectively. Although the small number of patients carrying the $\epsilon 2/\epsilon 2$ genotype did not allow us to determine if the $\epsilon 2/\epsilon 2$ genotype harbored any additional risk over $\epsilon 2/\epsilon 3$, our sample size of 803 individuals was sufficient to detect statistically significant differences in the frequencies of $\epsilon 2$ carriers between POAG patients and the control group according to the established criteria ($p < 0,05$). Moreover, three different statistical analyses

indicate that the inheritance of the $\epsilon 2$ allele may be a risk factor for the development of POAG in the Brazilian population.

Finally, our study did not analyze possible gene-gene interactions with other well-established glaucoma-related genes, which might influence the association between the *APOE* gene and POAG. In fact, it has been suggested that polygenic risk scores can be useful to predict the risk of developing glaucoma, increased risk of advanced disease and probability of requiring surgical intervention for IOP control, as well as the prediction of earlier age at diagnosis for POAG (102–105). This polygenic analysis was beyond the scope of this study and will be the subject of future investigations. However, it is a consensual statement that the acquaintance of multiple-risk alleles throughout the genome might allow the identification of subjects that are at high risk of determined disease, once quantitative complex traits are affected by a large quantity of loci (102).

In summary, our findings suggest that Brazilian *APOE2* allele carriers, especially those with the $\epsilon 2/\epsilon 3$ genotype, are at increased risk for the development of POAG. The present study highlights the importance of investigating all *APOE* variants, including the *APOE2* allele – unfortunately under-represented in the current literature. Our findings need to be replicated by further studies involving a larger number of patients, with polygenic assessments.

Acknowledgments

We thank the patients and volunteers for their inestimable collaboration.

Declaration of interest

Marcelo Luis Occhiutto, Mônica Barbosa de Melo, José Paulo Cabral de Vasconcellos, Thiago Adalton Rosa Rodrigues, Flávia Fialho Bajano, and Fernando Ferreira Costa have nothing to disclose. Vital Paulino Costa has received research funding from Allergan, Alcon, Novartis; honoraria from Allergan, Alcon, Novartis, Aerie, Genom, Ofta, Iridex; and congress expenses from Allergan, Alcon and Novartis.

Funding

São Paulo Research Foundation, FAPESP (grant 2010/18353-9).

ORCID

Marcelo Luis Occhiutto  <http://orcid.org/0000-0003-4744-5894>

References

1. Kumar S, Malik MA, K S, Sihota R, Kaur J. Genetic variants associated with primary open angle glaucoma in Indian population. *Genomics*. 2017;109:27–35. doi: 10.1016/j.ygeno.2016.11.003. Cited in Pubmed; PMID: 27851990.
2. Liu Y, Allingham RR. Major review: Molecular genetics of primary open-angle glaucoma. *Exp Eye Res*. 2017; 160:62–84. doi: 10.1016/j.exer.2017.05.002. Cited in Pubmed; PMID: 28499933.
3. Weinreb RN, Aung T, Medeiros FA. The pathophysiology and treatment of glaucoma: a review. *JAMA*. 2014; 311:1901–11. doi: 10.1001/jama.2014.3192. Cited in Pubmed; PMID: 24825645.

4. Wiggs JL, Pasquale LR. Genetics of glaucoma. *Hum Mol Genet.* 2017; 26(R1):R21–R27. doi: 10.1093/hmg/ddx184. Cited in Pubmed; PMID: 28505344.
5. Quigley HA, Broman AT. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br J Ophthalmol.* 2006; 90:262–7. doi: 10.1136/bjo.2005.081224. Cited in Pubmed; PMID: 16488940.
6. Tham YC, Li X, Wong TY, Quigley HA, Aung T, Cheng CY. Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: a systematic review and meta-analysis. *Ophthalmology.* 2014;121:2081–90. doi: 10.1016/j.ophtha.2014.05.013. Cited in Pubmed; PMID: 24974815.
7. Kapetanakis VV, Chan MP, Foster PJ, Cook DG, Owen CG, Rudnicka AR. Global variations and time trends in the prevalence of primary open angle glaucoma (POAG): a systematic review and meta-analysis. *Br J Ophthalmol.* 2016;100:86–93. doi: 10.1136/bjophthalmol-2015-307223. Cited in Pubmed; PMID: 26286821
8. Drewry MD, Challa P, Kuchtey JG, Navarro I, Helwa I, Hu Y, Mu H, Stamer WD, Kuchtey RW, Liu Y. Differentially expressed microRNAs in the aqueous humor of patients with exfoliation glaucoma or primary open-angle glaucoma. *Hum Mol Genet.* 2018;27:1263–1275. doi: 10.1093/hmg/ddy040. Cited in Pubmed; PMID: 29401312.
9. Libby RT, Gould DB, Anderson MG, John SW. Complex genetics of glaucoma susceptibility. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2005;6:15–44. doi: 10.1146/annurev.genom.6.080604.162209. Cited in Pubmed; PMID: 16124852.
10. Hirschhorn JN, Daly MJ. Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nat Rev Genet.* 2005; 6:95–108. doi: 10.1038/nrg1521. Cited in Pubmed; PMID: 15716906.
11. Hewitt AW, Craig JE, Mackey DA. Complex genetics of complex traits: the case of primary open-angle glaucoma. *Clin Exp Ophthalmol.* 2006; 34:472–84. doi: 10.1111/j.1442-9071.2006.01268.x. Cited in Pubmed; PMID: 16872346.
12. Wray NR, Visscher PM. Quantitative genetics of disease traits. *J Anim Breed Genet.* 2015;132:198–203. doi: 10.1111/jbg.12153. Cited in Pubmed; PMID: 25823843.
13. Tielsch JM, Katz J, Sommer A, Quigley HA, Javitt JC. Family history and risk of primary open angle glaucoma. The Baltimore Eye Survey. *Arch Ophthalmol.* 1994;112:69–73. doi: 10.1001/archoph.1994.01090130079022. Cited in Pubmed; PMID: 8285897.
14. Wolfs RC, Klaver CC, Ramrattan RS, van Duijn CM, Hofman A, de Jong PT. Genetic risk of primary open-angle glaucoma. Population-based familial aggregation study. *Arch Ophthalmol.* 1998;116:1640–5. doi: 10.1001/archoph.116.12.1640. Cited in Pubmed; PMID: 9869795.
15. Wu J, Hewitt AW, Green CM, Ring MA, McCartney PJ, Craig JE, Mackey DA. Disease severity of familial glaucoma compared with sporadic glaucoma. *Arch Ophthalmol.* 2006;124:950–4. doi: 10.1001/archoph.124.7.950. Cited in Pubmed; PMID: 16832017.
16. Sakurada Y, Mabuchi F. Advances in glaucoma genetics. *Prog Brain Res.* 2015; 220:107–26. doi: 10.1016/bs.pbr.2015.04.006. Epub 2015 Jul 2. Cited in Pubmed; PMID: 26497787.
17. Vickers JC, Craig JE, Stankovich J, McCormack GH, West AK, Dickinson JL, McCartney PJ, Coote MA, Healey D, Mackey DA. The apolipoprotein epsilon4 gene is associated with elevated risk of normal tension glaucoma. *Mol Vis.* 2002; 8:389–93. Cited in Pubmed; PMID: 12379839.
18. Mabuchi F, Tang S, Ando D, Yamakita M, Wang J, Kashiwagi K, Yamagata Z, Iijima H, Tsukahara S. The apolipoprotein E gene polymorphism is associated with open angle glaucoma in the Japanese population. *Mol Vis.* 2005; 12:11609–12. Cited in Pubmed; PMID: 16110302.
19. Fingert JH. Primary open angle glaucoma genes. *Nat. Eye.* 2011; 25: 587–595. doi: 10.1038/eye.2011.97. Cited in Pubmed; PMID: 21562585.
20. Liao R, Ye M, Xu X. An updated meta-analysis: apolipoprotein E genotypes and risk of primary open-angle glaucoma. *Mol Vis.* 2014; 20:1025–36. Cited in Pubmed; PMID: 25053873.
21. Phillips MC. Apolipoprotein E isoforms and lipoprotein metabolism. *IUBMB Life.* 2014; 66:616–23. doi: 10.1002/iub.1314. Cited in Pubmed; PMID: 25328986.
22. Marais AD. Apolipoprotein E in lipoprotein metabolism, health and cardiovascular disease. *Pathology.* 2019;51:165–176. doi: 10.1016/j.pathol.2018.11.002. Cited in Pubmed; PMID: 30598326.
23. Zannis VI, Breslow JL. Apolipoprotein E. *Mol Cell Biochem.* 1982; 16:423–20. doi: 10.1007/BF00223534. Cited in Pubmed; PMID: 7038438.
24. Emi M, Wu LL, Robertson MA, Myers RL, Hegele RA, Williams RR, White R, Lalouel JM. Genotyping and sequence analysis of apolipoprotein E isoforms. *Genomics.* 1988;3:373–9. doi: 10.1016/0888-7543(88)90130-9. Cited in Pubmed; PMID: 3243553.
25. Bekris LM, Millard SP, Galloway NM, Vuletic S, Albers JJ, Li G, Galasko DR, DeCarli C, Farlow MR, Clark CM, et al. Multiple SNPs within and surrounding the apolipoprotein E gene influence cerebrospinal fluid apolipoprotein E protein levels. *J Alzheimers Dis.* 2008; 13:255–66. doi: 10.3233/jad-2008-13303. Cited in Pubmed; PMID: 18430993.
26. Seripa D, D'Onofrio G, Panza F, Cascavilla L, Masullo C, Pilotto A. The genetics of the human APOE polymorphism. *Rejuvenation Res.* 2011; 14:491–500. doi: 10.1089/rej.2011.1169. Cited in Pubmed; PMID: 21958003.
27. Eichner JE, Dunn ST, Perveen G, Thompson DM, Stewart KE, Stroehla BC. Apolipoprotein E polymorphism and cardiovascular disease: a HuGE review. *Am J Epidemiol.* 2002; 155:487–95. doi: 10.1093/aje/155.6.487. Cited in Pubmed; PMID: 11882522.
28. Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science.* 1988; 240:622–30. doi: 10.1126/science.3283935. Cited in Pubmed; PMID: 3283935.
29. Utermann G, Hees M, Steinmetz A. Polymorphism of apolipoprotein E and occurrence of dysbetalipoproteinaemia in man. *Nature.* 1977; 269:604–7. doi: 10.1038/269604a0. Cited in Pubmed; PMID: 199847.
30. Zannis VI, Just PW, Breslow JL. Human apolipoprotein E isoprotein subclasses are genetically determined. *Am J Hum Genet.* 1981; 33:11–24. Cited in Pubmed; PMID: 7468588.
31. Eto M, Watanabe K, Ishii K. A racial difference in apolipoprotein E allele frequencies between the Japanese and Caucasian populations. *Clin Genet.* 1986;30:422–7. doi: 10.1111/j.1399-0004.1986.tb01901.x. Cited in Pubmed; PMID: 3802561.
32. Benkmann HG, Agarwal DP, Vasisht S, Srivastava LM, Goedde HW. Distribution of apolipoprotein E genotypes in Asian Indians, Hungarians, and Papua New Guineans. *Anthropol Anz.* 1996; 54:31–4. Cited in Pubmed; PMID: 8660002.
33. Davignon J, Gregg R, E., and Sing C. F. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis.* 1988; 8, 1–21. doi: 10.1161/01.atv.8.1.1. Cited in Pubmed; PMID: 3277611.
34. Singh PP, Singh M, Mastana SS. APOE distribution in world populations with new data from India and the UK. *Ann Hum Biol.* 2006; 33:279–308. doi: 10.1080/03014460600594513. Cited in Pubmed; PMID: 17092867.
35. Abondio P, Sazzini M, Garagnani P, Boattini A, Monti D, Franceschi C, Luiselli D, Giuliani C. The Genetic Variability of APOE in Different Human Populations and Its Implications for Longevity. *Genes (Basel).* 2019; 10(3):pii: E222. doi: 10.3390/genes10030222. Cited in Pubmed; PMID: 30884759.
36. Hu P, Qin YH, Jing CX, Lu L, Hu B, Du PF. Does the geographical gradient of ApoE4 allele exist in China? A systemic comparison among multiple Chinese populations. *Mol. Biol. Rep.* 2011; 38, 489–494. doi: 10.1007/s11033-010-0132-0. Cited in Pubmed; PMID: 20354905.
37. Zekraoui L, Lagarde JP, Raisonniere A, Gérard N, Aouizérate A, Lucotte G. High frequency of the apolipoprotein E4 allele in African pygmies and most of the African populations in sub-Saharan Africa. *Hum. Biol.* 1997; 69, 575–581. Cited in Pubmed; PMID: 9198315.
38. Corbo RM, Scacchi R. Apolipoprotein E (APOE) allele distribution in the world. Is APOE * 4 a 'thrifty' allele? *Ann. Hum. Genet.* 1999; 63, 301–310. doi: 10.1046/j.1469-1809.1999.6340301.x. Cited in Pubmed; PMID: 10738542.
39. Uddin MS, Kabir MT, Al Mamun A, Abdel-Daim MM, Barreto GE, Ashraf GM. APOE and Alzheimer's Disease: Evidence Mounts

- that Targeting APOE4 may Combat Alzheimer's Pathogenesis. *Mol Neurobiol.* 2019;56:2450–2465. doi: 10.1007/s12035-018-1237-z. Cited in Pubmed; PMID: 30032423.
40. Tilley L, Morgan K, Kalsheker N. Genetic risk factors in Alzheimer's disease. *Mol Pathol.* 1998; 51:293–304. doi: 10.1136/mp.51.6.293. PMID: 10193509.
 41. Roses AD, Saunders AM. ApoE, Alzheimer's disease, and recovery from brain stress. *Ann NY Acad Sci.* 1997; 826:200–12. doi: 10.1111/j.1749-6632.1997.tb48471.x. Cited in Pubmed; PMID: 9329691.
 42. Teasdale GM, Nicoll JA, Murray G, Fiddes M. Association of apolipoprotein E polymorphism with outcome after head injury. *Lancet.* 1997; 350:1069–71. doi: 10.1016/S0140-6736(97)04318-3. Cited in Pubmed; PMID: 10213549.
 43. Friedman G, Froom P, Sazbon L, Grinblatt I, Shochina M, Tsenter J, Babaey S, Yehuda B, Groswasser Z. Apolipoprotein E-epsilon4 genotype predicts a poor outcome in survivors of traumatic brain injury. *Neurology.* 1999; 52:244–8. doi: 10.1212/wnl.52.2.244. Cited in Pubmed; PMID: 9932938.
 44. Amaratunga A, Abraham CR, Edwards RB, Sandell JH, Schreiber BM, Fine RE. Apolipoprotein E is synthesized in the retina by Müller glial cells, secreted into the vitreous, and rapidly transported into the optic nerve by retinal ganglion cells. *J Biol Chem.* 1996; 271:5628–32. doi: 10.1074/jbc.271.10.5628. Cited in Pubmed; PMID: 8621425.
 45. Lawlor M, Danesh-Meyer H, Levin LA, Davagnanam I, De Vita E, Plant GT. *Glaucoma and the brain: Trans-synaptic degeneration, structural change, and implications for neuroprotection.* *Surv Ophthalmol.* 2018; 63:296–306. doi: 10.1016/j.survophthal.2017.09.010. Cited in Pubmed; PMID: 28986311.
 46. Jänemann A, Bleich S, Reulbach U, Henkel K, Wakili N, Beck G, Rautenstrauss B, Mardin C, Naumann GOH, Reis A, Kornhuber J. Prospective case control study on genetic association of apolipoprotein epsilon2 with intraocular pressure. *Br J Ophthalmol.* 2004;88:581–2. doi: 10.1136/bjo.2003.020305. Cited in Pubmed; PMID: 15031182.
 47. Yuan HP, Xiao Z, Yang BB. [A study on the association of apolipoprotein E genotypes with primary open-angle glaucoma and primary angle-closure glaucoma in northeast of China]. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi.* 2007; 43:416–20. Chinese. Cited in Pubmed; PMID: 17706090.
 48. Lam CY, Fan BJ, Wang DY, Tam POS, Yung Tham CCY, Leung DYLL, Fan DSP, Lam DSC, Pang CP. Association of apolipoprotein E polymorphisms with normal tension glaucoma in a Chinese population. *J Glaucoma.* 2006;15:218–22. doi: 10.1097/01.jgg.0000212217.19804.a7. Cited in Pubmed; PMID: 16778644.
 49. Fan BJ, Wang DY, Fan DS, Tam PO, Lam DS, Tham CC, Lam CY, Lau TC, Pang CP. SNPs and interaction analyses of myocilin, optineurin, and apolipoprotein E in primary open angle glaucoma patients. *Mol Vis.* 2005; 11:625–31. Cited in Pubmed; PMID: 16148883.
 50. Ressiniotis T, Griffiths PG, Birch M, Keers SM, Chinnery PF. Apolipoprotein E promoter polymorphisms do not have a major influence on the risk of developing primary open angle glaucoma. *Mol Vis.* 2004; 10:805–7. Cited in Pubmed; PMID: 15525904.
 51. Lake S, Liverani E, Desai M, Casson R, James B, Clark A, Salmon JF. Normal tension glaucoma is not associated with the common apolipoprotein E gene polymorphisms. *Br J Ophthalmol.* 2004;88:491–3. doi: 10.1136/bjo.2003.023366. Cited in Pubmed; PMID: 15031162.
 52. Zetterberg M, Tasa G, Palmér MS, Juronen E, Teesalu P, Blennow K, Zetterberg H. Apolipoprotein E polymorphisms in patients with primary open-angle glaucoma. *Am J Ophthalmol.* 2007;143:1059–60. doi: 10.1016/j.ajo.2007.01.031. Cited in Pubmed; PMID: 17524782.
 53. Jia LY, Tam PO, Chiang SW, Ding N, Chen LJ, Yam GH, Pang CP, Wang NL. Multiple gene polymorphisms analysis revealed a different profile of genetic polymorphisms of primary open-angle glaucoma in northern Chinese. *Mol Vis.* 2009; 15:89–98. Cited in Pubmed; PMID: 19145250.
 54. Salzano FM, Sans M. Interethnic admixture and the evolution of Latin American populations. *Genet Mol Biol.* 2014;37(1Suppl): 151–70. doi:10.1590/s1415-47572014000200003. Cited in Pubmed; PMID: 24764751.
 55. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100:177–82. doi: 10.1073/pnas.0126614100. Cited in Pubmed; PMID: 12509516.
 56. Sambrook J, Russell DW. Purification of nucleic acids by extraction with phenol: chloroform. *CSH Protoc.* 2006;(1). pii: pdb.prot4455. doi: 10.1101/pdb.prot4455. Cited in Pubme; PMID: 22485786.
 57. Wenham PR, Price WH, Blandell G. Apolipoprotein E genotyping by one-stage PCR. *Lancet.* 1991; 337:1158–9. doi: 10.1016/0140-6736(91)92823-k. Cited in Pubmed; PMID: 1674030.
 58. Anthopoulos PG, Hamodrakas SJ, Bagos PG. Apolipoprotein E polymorphisms and type 2 diabetes: a meta-analysis of 30 studies including 5423 cases and 8197 controls. *Mol Genet Metab.* 2010; 100:283–91. doi: 10.1016/j.ymgme.2010.03.008. Cited in Pubmed; PMID: 20381392.
 59. Tácio LHB, Yamada LN, de Souza Pinhel MA, Yugar-Toledo JC, Souza DRS. Influence of Apolipoprotein E on the Lipid Profile and Postprandial Triglyceride Levels in Brazilian Postmenopausal Women with Artery Disease. *Clin Med Insights Cardiol.* 2017; 11:1179546817731110. doi: 10.1177/1179546817731110. Cited in Pubmed; PMID: 28974920.
 60. Alvim RO, Freitas SR, Ferreira NE, Santos PC, Cunha RS, Mill JG, Krieger JE, Pereira AC. APOE polymorphism is associated with lipid profile, but not with arterial stiffness in the general population. *Lipids Health Dis.* 2010; 9:128. doi: 10.1186/1476-511X-9-128. Cited in Pubmed; PMID: 21059196.
 61. Megale RZ, de Loyola Filho AI, Firmo JO, Lima-Costa MF, Peixoto SV. Apolipoprotein E polymorphism and functional disability in Brazilian elders: the Bambuí Health and Aging Study. *Cad Saude Publica.* 2016; 32:e00080115. doi: 10.1590/0102-311X00080115. Cited in Pubmed; PMID: 26958821.
 62. Gerdes LU, Klausen IC, Sihm I, Faergeman O. Apolipoprotein E polymorphism in a Danish population compared to findings in 45 other study populations around the world. *Genet Epidemiol.* 1992; 9:155–67. doi: 10.1002/gepi.1370090302. Cited in Pubmed; PMID: 1381696.
 63. Mastana SS, Calderon R, Pena J, Reddy PH, Papiha SS. Anthropology of the apolipoprotein E (apo E) gene: low frequency of apo E4 allele in Basques and in tribal (Baiga) populations of India. *Ann Hum Biol.* 1998; 25:137–43. doi: 10.1080/0301446980005512. Cited in Pubmed; PMID: 9533513.
 64. Margeta MA, Letcher SM, Igo Jr RP, Cooke Bailey JN, Pasquale LR, Haines JL, Butovsky O, Wiggs JL, NEIGHBORHOOD consortium. Association of APOE With Primary Open-Angle Glaucoma Suggests a Protective Effect for APOE ε4. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2020;1;61(8):3. Cited in Pubmed; PMID: 32614373.
 65. Copin B, Brézin AP, Valtot F, Dascotte JC, Béchetoille A, Garchon HJ. Apolipoprotein E-promoter single-nucleotide polymorphisms affect the phenotype of primary open-angle glaucoma and demonstrate interaction with the myocilin gene. *Am J Hum Genet.* 2002; 70:1575–81. doi: 10.1086/340733. Cited in Pubmed; PMID: 11992263.
 66. Al-Dabbagh NM, Al-Dohayan N, Arfin M, Tariq M. Apolipoprotein E polymorphisms and primary glaucoma in Saudis. *Mol Vis.* 2009; 15:912–9. Cited in Pubmed; PMID: 19421411.
 67. Chiras D, Tzika K, Kokotas H, Oliveira SC, Grigoriadou M, Kastania A, Dima K, Stefanidou M, Aspiotis M, Petersen MB, et al. Development of novel LOXL1 genotyping method and evaluation of LOXL1, APOE and MTHFR polymorphisms in exfoliation syndrome/glaucoma in a Greek population. *Mol Vis.* 2013; 6; 19: 1006–16. Cited in Pubmed; PMID: 23687437.
 68. Wang Y, Zhou YF, Zhao BY, Gu ZY, Li SL. Apolipoprotein E gene ε4ε4 is associated with elevated risk of primary open angle glaucoma in Asians: a meta-analysis. *BMC Med Genet.* 2014. 19; 15: 60. doi: 10.1186/1471-2350-15-60. Cited in Pubmed; PMID: 24885013.
 69. Song Q, Chen P, Liu Q. Role of the APOE ε2/ε3/ε4 polymorphism in the development of primary open-angle glaucoma: evidence

- from a comprehensive meta-analysis. *PLoS One*. 2013; 8: e82347. doi: 10.1371/journal.pone.0082347. Cited in Pubmed; PMID: 24312416.
70. Wang W, Zhou M, Huang W, Chen S, Zhang X. Lack of association of apolipoprotein E (Apo E) $\epsilon 2/\epsilon 3/\epsilon 4$ polymorphisms with primary open-angle glaucoma: a meta-analysis from 1916 cases and 1756 controls. *PLoS One*. 2013; 8: e72644. doi: 10.1371/journal.pone.0072644. Cited in Pubmed. PMID: 24023758.
 71. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*. 1993; 261:921-923. doi: 10.1126/science.8346443. Cited in Pubmed; PMID: 8346443.
 72. Benjamin R, Leake A, Edwardson JA, McKeith IG, Ince PG, Perry RH, Morris CM. Apolipoprotein E genes in Lewy body and Parkinson's disease. *Lancet*. 1994; 343:1565. doi: 10.1016/s0140-6736(94)92961-0. Cited in Pubmed; PMID: 7911882.
 73. Đurić G, Svetel M, Nikolaević SI, Dragadević N, Gavrilović J, Kostić VS. [Polymorphisms in the genes of cytochrome oxidase P450 2D6 (CYP2D6), paraoxonase 1 (PON1) and apolipoprotein E (APOE) as risk factors for Parkinson's disease]. *Vojnosanit Pregl*. 2007;64(1):25-30. Serbian. doi: 10.2298/vsp0701025d. Cited in Pubmed; PMID: 17304721.
 74. Scott RA, Scott LJ, Mägi R, Marullo L, Gaulton KJ, Kaakinen M, Pervjakova N, Pers TH, Johnson AD, Eicher JD, et al. An Expanded Genome-Wide Association Study of Type 2 Diabetes in Europeans. *Diabetes*. 2017; 66:2888-2902. doi: 10.2337/db16-1253. Cited in Pubmed; PMID: 28566273.
 75. Cook JP, Morris AP. Multi-ethnic genome-wide association study identifies novel locus for type 2 diabetes susceptibility. *Eur J of Hum Gen*. 2016; 24: 1175-1180. doi: 10.1038/ejhg.2016.17. Cited in Pubmed; PMID: 27189021.
 76. Santos-Ferreira C, Baptista R, Oliveira-Santos M, Costa R, Pereira Moura J, Gonçalves L. Apolipoprotein E2 Genotype Is Associated with a 2-Fold Increase in the Incidence of Type 2 Diabetes Mellitus: Results from a Long-Term Observational Study. *J Lipids*. 2019;1 8610. doi: 10.1155/2019/1698610. Cited in Pubmed; PMID: 31485353.
 77. Pasquale LR, Kang JH, Manson JE, Willett WC, Rosner BA, Hankinson SE. Prospective study of type 2 diabetes mellitus and risk of primary open-angle glaucoma in women. *Ophthalmology*. 2006; 113:1081-6. doi: 10.1016/j.ophtha.2006.01.066. Cited in Pubmed; PMID: 16757028.
 78. Gupta D, Chen PP. Glaucoma. *Am Fam Physician*. 2016; 15; 93: 668-74. Cited in Pubmed; PMID: 27175839.
 79. Zhao D, Cho J, Kim MH, Friedman DS, Guallar E. Diabetes, fasting glucose, and the risk of glaucoma: a meta-analysis. *Ophthalmology*. 2015; 122:72-8.
 80. Zhao D, Cho J, Kim MH, Friedman DS, Guallar E. Diabetes, glucose metabolism, and glaucoma: the 2005-2008 National Health and Nutrition Examination Survey. *PLoS One*. 2014; 9: e112460. doi: 10.1016/j.ophtha.2014.07.051. Cited in Pubmed; PMID: 25283061.
 81. Ko F, Boland MV, Gupta P, Gadkaree SK, Vitale S, Guallar E, Zhao D, Friedman DS. Diabetes, triglyceride levels, and other risk factors for glaucoma in the National Health and Nutrition Examination Survey 2005-2008. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016; 57:2152-7. doi: 10.1167/iovs.15-18373. Cited in Pubmed; PMID: 27111561.
 82. Boland MV, Quigley HA. Risk factors and open-angle glaucoma: classification and application. *J Glaucoma*. 2007; 16:406-18. doi: 10.1097/IJG.0b013e31806540a1. Cited in Pubmed; PMID: 17571004.
 83. Mitchell P, Smith W, Chey T, Healey PR. Open-angle glaucoma and diabetes: the Blue Mountains eye study, Australia. *Ophthalmology*. 1997; 104:712-8. doi: 10.1016/s0161-6420(97)30247-4. Cited in Pubmed; PMID: 9111268.
 84. Klein BE, Klein R, Jensen SC. Open-angle glaucoma and older-onset diabetes. The Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology*. 1994; 101:1173-7. doi: 10.1016/s0161-6420(94)31191-2. Cited in Pubmed; PMID: 8035979.
 85. Shen L, Walter S, Melles RB, Glymour MM, Jorgenson E. Diabetes pathology and risk of primary open-angle glaucoma: evaluating causal mechanisms by using genetic information. *Am J Epidemiol*. 2016; 183:147-55. doi: 10.1093/aje/kwv204. Cited in Pubmed; PMID: 26608880.
 86. Song BJ, Aiello LP, Pasquale LR. Presence and Risk Factors for Glaucoma in Patients with Diabetes. *Curr Diab Rep*. 2016; 16:124. doi: 10.1007/s11892-016-0815-6. Cited in Pubmed; PMID: 27766584.
 87. Achrol AS, Kim H, Pawlikowska L, Trudy Poon KY, McCulloch CE, Ko NU, Johnston SC, McDermott MW, Zaroff JG, Lawton MT, Kwok PY, Young WL. Association of tumor necrosis factor- α -238G>A and apolipoprotein E2 polymorphisms with intracranial hemorrhage after brain arteriovenous malformation treatment. *Neurosurgery*. 2007; 61:731-9discussion 740. doi: 10.1227/01.NEU.0000298901.61849.A4. Cited in Pubmed; PMID: 17986934.
 88. Wang AY, Lee PY, Bui BV, Jobling AI, Greferath U, Brandli A, Dixon MA, Findlay Q, Fletcher EL, Vessey KA. Potential mechanisms of retinal ganglion cell type-specific vulnerability in glaucoma. *Clin Exp Optom*. 2019 Dec;1-10. doi: 10.1111/cxo.13031. Cited in Pubmed; PMID: 31838755.
 89. Dickson DW. Neuropathology of non-Alzheimer degenerative disorders. *Int J Clin Exp Pathol*. 2009; 3:1-23. Cited in Pubmed; PMID: 19918325.
 90. Zhao N, Liu CC, Van Ingelgom AJ, Linares C, Kurti A, Knight JA, Heckman MG, Diehl NN, Shinohara M, Martens YA, Attrebi ON, et al. APOE $\epsilon 2$ is associated with increased tau pathology in primary tauopathy. *Nat Commun*. 2018; 9(1):4388. doi: 10.1038/s41467-018-06783-0. Cited in Pubmed; PMID: 30348994.
 91. Suri S, Heise V, Trachtenberg AJ, Mackay CE. The forgotten APOE allele: a review of the evidence and suggested mechanisms for the protective effect of APOE $\epsilon 2$. *Neurosci Biobehav Rev*. 2013; 37(10 Pt 2):2878-86. doi: 10.1016/j.neubiorev.2013.10.010. Cited in Pubmed; PMID: 24183852.
 92. Roses AD, Saunders AM, Corder EH, Pericak-Vance MA, Han SH, Einstein G, Hulette C, Schmechel DE, Holst M, Huang D, et al. Influence of the susceptibility genes apolipoprotein E-epsilon 4 and apolipoprotein E-epsilon 2 on the rate of disease expressivity of late-onset Alzheimer's disease. *Arzneimittelforschung*. 1995; 45:413-7. Cited in Pubmed; PMID: 7763336.
 93. Caselli RJ, Duck AC. APOE varepsilon2 and presymptomatic stage Alzheimer disease: how much is not enough? *Neurology*. 2010; 75:1952-3. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181ff94f7. Cited in Pubmed; PMID: 20980668.
 94. Anuurad E, Rubin J, Lu G, Pearson TA, Holleran S, Ramakrishnan R, Berglund L. Protective effect of apolipoprotein E2 on coronary artery disease in African Americans is mediated through lipoprotein cholesterol. *J Lipid Res*. 2006; 47:2475-81. doi: 10.1194/jlr.M600288-JLR200. Cited in Pubmed; PMID: 16888319.
 95. Vaisi-Raygani A, Rahimi Z, Nomani H, Tavilani H, Pourmotabbed T. The presence of apolipoprotein epsilon4 and epsilon2 alleles augments the risk of coronary artery disease in type 2 diabetic patients. *Clin Biochem*. 2007; 40:1150-6. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2007.06.010. Cited in Pubmed; PMID: 17689519.
 96. Baird PN, Guida E, Chu DT, Vu HT, Guymer RH. The epsilon2 and epsilon4 alleles of the apolipoprotein gene are associated with age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004; 45:1311-5. doi: 10.1167/iovs.03-1121. Cited in Pubmed; PMID: 15111582.
 97. Verghese PB, Castellano JM, Holtzman DM. Apolipoprotein E in Alzheimer's disease and other neurological disorders. *Lancet Neurol*. 2011; 10:241-52. doi: 10.1016/S1474-4422(10)70325-2. Cited in Pubmed; PMID: 21349439.
 98. Xiyang M, Wenbo W, Wangyi F, Qinghuai L. Association of Apolipoprotein E Polymorphisms with Age-related Macular Degeneration Subtypes: An Updated Systematic Review and Meta-analysis. *Arch Med Res*. 2017; 48:370-377. doi: 10.1016/j.arcmed.2017.08.002. Cited in Pubmed; PMID: 28889998.
 99. Masuda T, Shimazawa M, Hashimoto Y, Kojima A, Nakamura S, Suemori S, Mochizuki K, Kawakami H, Kawase K, Hara H. Apolipoprotein E2 and

- E3, but Not E4, Promote Retinal Pathologic Neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2017; 58:1208-1217. doi: 10.1167/iovs.16-20539. Cited in Pubmed; PMID: 28241308.
100. Zhu H, Xue H, Wang H, Ma Y, Liu J, Chen Y. The Association of Apolipoprotein E (APOE) Gene Polymorphisms with Atherosclerosis Susceptibility: A Meta-Analysis. *Minerva Cardioangiol.* 2016; 64(1):47-54. Cited in Pubmed; PMID: 26005211.
 101. Liberopoulos E, Siamopoulos K, Elisaf M. Apolipoprotein E and Renal Disease. *Am J Kidney Dis.* 2004; 43(2):223-33. doi: 10.1053/j.ajkd.2003.10.013. Cited in Pubmed; PMID: 14750087.
 102. Wray NR, Goddard ME, Visscher PM. Prediction of individual genetic risk to disease from genome-wide association studies. *Genome Res.* 2007 Oct;17(10):1520-8. doi: 10.1101/gr.6665407. Cited in Pubmed; PMID: 17785532.
 103. Craig JE, Han X, Qassim A, Hassall M, Cooke Bailey JN, Kinzy TG, Khawaja AP, An J, Marshall H, Gharahkhani P, et al. Multitrait Analysis of Glaucoma Identifies New Risk Loci and Enables Polygenic Prediction of Disease Susceptibility and Progression. *Nat Genet.* 2020;52(2):160-166. doi: 10.1038/s41588-019-0556-y. Cited in Pubmed; PMID: 31959993.
 104. Fan BJ, Cooke Bailey J, Igo Jr RP, Kang JH, Boumenna T, Brilliant MH, Budenz DL, Fingert JH, Gaasterland T, Gaasterland D, et al. Association of a Primary Open-Angle Glaucoma Genetic Risk Score With Earlier Age at Diagnosis. *JAMA Ophthalmol.* 2019;137(10):1190-1194. doi: 10.1001/jamaophthalmol.2019.3109. Cited in Pubmed; PMID: 31436842.
 105. Gao XR, Huang H, Kim. Polygenic Risk Score Is Associated With Intraocular Pressure and Improves Glaucoma Prediction in the UK Biobank Cohort. *H.Transl Vis Sci Technol.* 2019;8(2):10. doi: 10.1167/tvst.8.2.10. Cited in Pubmed; PMID: 30972231.

*Link de acesso ao artigo:

<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/13816810.2020.1849314?journalCode=iopg20>

Ref.: Occhiutto ML, Melo MB, Vasconcelos JPC, Rodrigues TAR, Bajano FF, Costa FF, Costa VP. Association of *APOE* gene polymorphisms with primary open angle glaucoma in Brazilian patients. *Ophthalmic Genet.* 2021. 42(1):53-61. doi: 10.1080/13816810.2020.1849314

Anexo 8.3 - Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)



CENTRO DE BIOLOGIA MOLECULAR E ENGENHARIA GENÉTICA – CBMEG

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto: **Aspectos genéticos de doenças oftalmológicas**

Pesquisadora principal: Dra. Mônica Barbosa de Melo (tel: 019 3521-1143)

Número do CAAE: 49120615.4.0000.5404

SUBPROJETO ASSOCIADO:

- Estudo de mutações nos genes *CX46*, *CX50* e *HSF4* em pacientes com catarata congênita
- Análise de haplótipos da mutação CYS433ARG no gene *MYOC* associada ao glaucoma na população brasileira
- Aspectos genéticos do glaucoma primário de ângulo fechado
- Análise dos genes COL8A2 E SLC4A11 em pacientes com distrofia de FUCHS
- Avaliação do polimorfismo Y402H e da deleção *CFHR3/CFHR1* no gene *CFH* em relação à etiologia da degeneração macular relacionada à idade (DMRI) em uma amostra da população brasileira
- Citocinas inflamatórias e associação com o tratamento e etiologia do glaucoma primário de ângulo aberto
- Avaliação de aspectos genéticos do glaucoma primário de ângulo aberto por meio do sequenciamento de exoma total
- Análise de polimorfismos de base única (SNPs) na região 10q26 E SEU envolvimento na etiologia da degeneração macular relacionada à idade (DMRI) em uma amostra da população brasileira
- Avaliação de variantes genéticas na determinação da área do disco óptico em indivíduos normais e com glaucoma na população brasileira
- Avaliação dos polimorfismos E2/ E3/ E4 no gene *APOE* em relação à etiologia do glaucoma primário de ângulo aberto em uma amostra da população brasileira
- Análise dos polimorfismos rs1410996 (gene *CFH*) e rs2230199 (gene *C3*) em relação ao risco para o desenvolvimento da Degeneração Macular Relacionada à Idade (DMRI) em uma amostra da população brasileira
- Análise dos polimorfismos rs9332739 (gene *C2*) e rs641153 (gene *CFB*) em relação ao risco para o desenvolvimento da Degeneração Macular Relacionada à Idade (DMRI) em uma amostra da população brasileira

OBJETIVO DA PESQUISA:

Você está sendo convidado (a) a participar em um projeto de pesquisa envolvendo indivíduos:

- Com catarata

- Com glaucoma de ângulo aberto
- Com glaucoma de ângulo fechado
- Com degeneração macular relacionada à idade
- Com distrofia endotelial de Fuchs

Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, visa assegurar seus direitos como participante e é elaborado em duas vias, uma que deverá ficar com você e outra com o pesquisador.

Por favor, leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas. Se houver perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá esclarecê-las com o pesquisador. Se preferir, pode levar este Termo para casa e consultar seus familiares ou outras pessoas antes de decidir participar. Se você não quiser participar ou retirar sua autorização, a qualquer momento, não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo.

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS:

Propõe-se avaliar variantes que contribuam para a suscetibilidade a doenças oftalmológicas, assim como identificar novos genes, ampliando o conhecimento sobre os processos biológicos envolvidos. Isso poderá melhorar o diagnóstico da doença e poderá levar a um melhor tratamento no futuro.

PROCEDIMENTO:

Caso concorde em participar desse estudo, os pesquisadores farão perguntas a respeito dos seus antecedentes médicos e familiares. Uma amostra de sangue venoso será colhida (10 a 20 mL, o equivalente a duas colheres de sopa). Além disso, você poderá ser submetido (a) a:

- Exame de refração
- Biomicroscopia anterior e de fundo
- Tonometria
- Gonioscopia
- Paquimetria
- Medida de comprimento axial
- Retinografia
- Campo visual (Perimetria)
- Tomografia de coerência óptica
- Microscopia Especular

RISCO E DESCONFORTO:

Uma coleta de 10 a 20 mL de sangue venoso será efetuada. Os riscos associados a esse procedimento são mínimos, podendo ocorrer dor e manchas roxas (equimoses) no local da coleta do sangue. O desconforto será mínimo, pois se trata de uma coleta de sangue geralmente da veia do braço que será realizada por profissional treinado e habilitado para realizar esse procedimento. Hospitalização não será necessária. Os procedimentos mencionados acima, fazem parte dos cuidados médicos de rotina para um (a) pacientes com doenças oftalmológicas. Para minimizar o desconforto nos exames onde o contato com a superfície ocular é necessário (tonometria e paquimetria) será instilada uma gota de colírio anestésico em cada olho antes de cada procedimento. Pode ocorrer um desconforto de curta duração associado à luminosidade emitida no olho durante os exames. Durante o exame de campo

visual também poderá ocorrer fadiga devido ao nível de atenção exigido. Em caso de dano decorrente da pesquisa, está garantida a assistência integral e imediata, de forma gratuita, pelo tempo que for necessário. Você também tem direito a indenização em caso de danos.

SIGILO:

Você deve entender que toda informação médica que consta em seu prontuário médico será submetida aos regulamentos do HC-UNICAMP referentes ao sigilo da informação médica, excetuando-se os resultados dos testes genéticos decorrentes desse projeto de pesquisa. Se os resultados ou informações fornecidas resultarem em publicação científica, nenhum nome será utilizado.

RESSARCIMENTO:

Os procedimentos serão realizados durante as consultas de rotina ao Hospital das Clínicas da UNICAMP. Você não receberá qualquer valor em dinheiro.

BENEFÍCIOS:

Você não obterá nenhum benefício direto com a colaboração nesse estudo, seu tratamento provavelmente não será modificado, exceto nos casos em que for descoberto novo diagnóstico através dos exames realizados. Contudo, os resultados desse estudo podem, em longo prazo, oferecer benefícios para indivíduos com doenças oftalmológicas, possibilitando melhor diagnóstico e tratamento adequado. É importante notar que o diagnóstico pré-sintomático não faz parte dessa pesquisa, mas se você desejar obter orientação genética, ela será oferecida no Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética – CBMEG/UNICAMP, tel. (19 3521-1147).

FORNECIMENTO DE INFORMAÇÃO ADICIONAL:

Entende-se que é possível requisitar informações adicionais relativas ao estudo a qualquer momento. Dra. Mônica Barbosa de Melo estará disponível para responder possíveis dúvidas e preocupações. Em caso de recurso, denúncias, dúvidas ou reclamações sobre os aspectos éticos da pesquisa, contatar a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa.

Contatos:

Dra. Mônica Barbosa de Melo: Tel: (19) 3521-1143, e-mail: melomb@uol.com.br, endereço: Av Cândido Rondon, 400, Cidade Univeritária, (CBMEG-UNICAMP), Distrito de barão Geraldo, Campinas- SP. CEP: 13083-875.

Comitê de Ética em pesquisa da UNICAMP (CEP): Tel: (19) 3521-8936, e-mail: cep@fcm.unicamp.br, endereço: Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126, Distrito de Barão Geraldo , Campinas - SP. CEP: 13083-887.

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO:

A participação é voluntária, você pode se recusar a participar ou retirar seu consentimento e interromper a participação no estudo a qualquer momento (incluindo a retirada da amostra de sangue) sem comprometer os cuidados médicos que recebe atualmente ou receberá no futuro no HC-UNICAMP. A Dra. Mônica Barbosa de Melo pode interromper sua participação nesse estudo a qualquer momento que julgar apropriado, como quando houver fatores de exclusão que sejam descobertos durante a pesquisa, por exemplo, através da análise dos prontuários.

Você leu e compreendeu esse termo de consentimento e está de pleno acordo em participar desse estudo. Logo, informa que:

() Autoriza o armazenamento do material biológico e deseja ser consultado (a) para consentimento em caso de uso de sua amostra em outras pesquisas.

() **NÃO** autoriza o armazenamento do material biológico, devendo o mesmo ser descartado após o encerramento de sua participação nessa pesquisa.

Obs: O tempo de armazenamento é de 5 anos, podendo ser prorrogado por mais 5 anos.

RESULTADOS DOS EXAMES REALIZADOS (Genéticos):

() Deseja ser informado (a) sobre o resultado de meus exames.

() **NÃO** deseja ser informado (a) sobre o resultado de meus exames.

COLETA DE INFORMAÇÕES CLÍNICAS (Prontuários)

() Autoriza a utilização dos dados de seus prontuários.

() **NÃO** autoriza a utilização dos dados de seus prontuários.

DISPONIBILIZAÇÃO PÚBLICA DOS DADOS GENÔMICOS

Com o avanço das pesquisas na área genômica, é hoje de grande importância compartilhar em bancos de dados públicos os resultados de alguns testes moleculares. No compartilhamento dos dados genômicos é sempre assegurado que não haverá qualquer referência aos identificadores das amostras, (exemplo de identificadores: nome, filiação, endereço, número de registro hospitalar), mas poderão ser incluídas informações relevantes para a interpretação dos dados genômicos no contexto das pesquisas, tais como: sexo, idade, país e região de procedência, diagnóstico e outras informações clínicas pertinentes.

() Autoriza que os resultados dos testes genômicos realizados no âmbito deste projeto de pesquisa sejam disponibilizados em bancos de dados públicos que poderão ser consultados por pesquisadores da área médica, desde que esses dados não sejam vinculados com identificadores da amostra.

() **NÃO** autoriza a disponibilização dos resultados dos testes genéticos realizados neste projeto de pesquisa.

Nome do (a) participante ou responsável

Assinatura do (a) participante ou responsável

Data

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR:

Asseguro ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma via deste documento ao participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

Assinatura do (a) pesquisador (a) ou associado

Data

Anexo 8.4 - Questionário “Fatores de risco ambientais e genéticos em GPAA”**QUESTIONÁRIO: FATORES DE RISCO AMBIENTAIS E GENÉTICOS EM GPAA****DADOS GERAIS**

DATA: ____/____/____

NOME: _____ IDADE _____

____ PRONTUARIO/HC: _____ DN: ____/____

____/____

PROCEDÊNCIA/NASCIMENTO: CIDADE/UF: _____

END: _____

BAIRRO _____ CEP _____ CID/UF _____

TEL: _____ CEL: _____ RECADO _____

SEÇÃO A: INFORMAÇÕES DEMOGRÁFICAS1. SEXO: 1 F 2 M

2. Antes de vir para o Brasil, de que país eram seus pais/avós?

1 Maternos _____ NÃO SEI2 Paternos _____ NÃO SEI

3. De qual raça/etnia se considera? (AUTO-DECLARADO)

1 Branco 2 asiática 3 mulato/Pardo 4 Negra 5 outro: _____

4. Cor da pele observada

1 Branco 2 asiática 3 mulato/Pardo 4 Negra 5 outro: _____**SEÇÃO B: ANAMNESE GERAL****ANTECEDENTES FAMILIARES**

5. História de glaucoma?

0 NÃO 1 SIM 2 pai 3 mãe 4 irmãos 5 avô/avó paterno(s) 6 avô/avó materno(s)
7 outro(s) _____**ANTECEDENTES PESSOAIS**

6. Outras doenças oculares:

0 NÃO 1 uveíte OD 2 uveíte OE 3 Descolamento de retina OD 4 Descolamento de retina
OE 5 pterígio OD 6 pterígio OE 7 DMRI OD 8 DMRI OE
9 outra(s): _____7. Doenças sistêmicas: 0 NÃO 1 HAS (sist. \geq 160mmHg/diast. \geq 95 mmHg) 2 diabetes
(insulina) 3 diabetes (uso de hipoglicemiantes) 4 diabetes (dieta) 5 angina 6 AVC 7
outra(s) _____

8. Medicções sistêmicas em uso:

0 NÃO 1 SIM
 QUAIS? _____

AVALIAÇÃO OFTALMOLÓGICA

9. Diagnóstico: _____

10. Idade do Diagnóstico _____

11. PIO Máxima registrada: OD: _____ OE: _____ Data: / /

12. Número máximo de colírios utilizados durante o tratamento/Quais?
 OD _____ OE _____

13. PIO Atual: OD: _____ OE: _____

Colírios hoje? Não Sim
 Qual(is): _____

14. CIRURGIA antiglaucomatosa 0 NÃO 1 SIM

Número de cirurgias: OD: _____ OE: _____

tipo de cirurgia: OD: _____ OE: _____

15. CATARATA: 0 NÃO 1 OD 2 OE 3 OD operado 4 OE operado

Pseudofácico? (colocou lente intraocular?) _____

EXAME OFTALMOLÓGICO

16. Refração: OD _____ AVcc: _____ OE _____
 AVcc: _____

17. PAQUIMETRIA: OD _____ OE _____

18. GONIOSCOPIA:

OD _____ OE _____

19. CAMPO VISUAL

Índices globais do perímetro Humphrey:

(primeiro exame): OD: _____ OE: _____ Data _____

(último exame): OD: _____ OE: _____ Data _____

20. Escavação (Observação clínica) 1º exame:
 OD: _____ OE: _____

Escavação (Observação clínica) último exame
 :OD: _____ OE: _____

21. RETINOGRAFIA (primeiro exame):

Escavação OD: _____ OE: _____ Data: / /

RETINOGRAFIA (último exame):

Escavação OD: _____ OE: _____ Data: / /

22. OCT (*average thickness* – primeiro exame): OD _____ OE _____ Data / /

OCT (*average thickness* – último exame): OD _____ OE _____ Data: /

Anexo 8.5 - Permissão da editora para utilização do artigo

10/01/2021 Re: RE: Welcome to Taylor & Francis Production: Ophthalmic Genetics 1849314 #TrackingId:7750569 - marceloocchitto@uol.co...



Re: RE: Welcome to Taylor & Francis Production: Ophthalmic Genetics 1849314 #TrackingId:7750569

De: IOPG-production@journals.tandf.co.uk
 Para: marceloocchitto@uol.com.br
 Cópia: permissionrequest@tandf.co.uk
 Cópia oculta:
 Assunto: Re: RE: Welcome to Taylor & Francis Production: Ophthalmic Genetics 1849314 #TrackingId:7750569
 Enviada em: 24/11/2020 | 01:06
 Recebida em: 24/11/2020 | 01:06

Dear Marcelo,

Thank you for your email.

Taylor & Francis is pleased to offer reuses of its content for a thesis or dissertation free of charge contingent on resubmission of permission request if work is published.

Should you have further queries, please do let me know.

Best regards,
 Michaela

.....
 Michaela Bautista – Production Editor.
 Taylor & Francis Journals
 Web: www.tandfonline.com

To successfully download attachments, you may need to switch off any pop up blockers that your web browser is running. Your browser may present you with the option to 'allow once', or you can find the option to permanently switch off pop up blockers under your browser's Settings menu. Attachments may not open up straight away when you click on the link as they are first being downloaded from the cloud. Please check for a downloaded document icon at the bottom of your screen (in Chrome, IE or Firefox) or in your downloads folder in Safari.

Ophthalmic Genetics

.....
From: marceloocchitto@uol.com.br
Sent: 23-11-2020 09:01
To: Michaela.C.Bautista@informa.com
Cc: permissionrequest@tandf.co.uk
Subject: Re: RE: Welcome to Taylor & Francis Production: Ophthalmic Genetics 1849314

Dear Michaela Bautista,
 would like to request authorization from the publisher to include my article entitled "" Association of APOE gene polymorphisms with primary open angle glaucoma in Brazilian patients" (Ophthalmic Genetics 1849314) as part of my doctoral (PhD) thesis to be held at the State University of Campinas, in the year 2021.
 Yours sincerely,
 Marcelo Luis Occhitto, M.D., MSc
 University of Campinas (UNICAMP)
 Brazil

.....
De: "IOPG-production@journals.tandf.co.uk" <cats@taylorandfrancis.com>
Enviada: 2020/11/09 11:24:33
Para: marceloocchitto@uol.com.br
Assunto: Welcome to Taylor & Francis Production: Ophthalmic Genetics 1849314

Any copyrighted material reproduced in your paper must include an accompanying attribution. Brief extracts of third-party material may be cleared for use under the fair use / fair dealing policy, and don't require full copyright clearance from the Rightsholder. For further information and to access a template form for requesting permission, please see <https://authorservices.taylorandfrancis.com/using-third-party-material-in-your-article/>. Please keep copies of all correspondence.

Article: Association of APOE gene polymorphisms with primary open angle glaucoma in Brazilian patients

Journal: *Ophthalmic Genetics* IOPG

<https://mail.uol.com.br/?xc=84f06c73b116383fd0058bae672b167c#/webmail/0cGVybWlzc2lvbnN8/INBOX/page:1/NJE1Mzg>

1/2

Anexo 8.6 - Declaração de não-infração de direitos autorais cedidos à editora

A cópias do artigo de minha autoria, já publicado na revista científica sujeita a arbitragem “*OPHTHALMIC GENETICS*” (“***Association of APOE gene polymorphisms with primary open angle glaucoma in Brazilian patients***”) que consta da minha tese de Doutorado intitulada “**AVALIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS E2, E3, e E4 NO GENE APOE EM RELAÇÃO À ETIOLOGIA DO GLAUCOMA PRIMÁRIO DE ÂNGULO ABERTO EM UMA AMOSTRA DA POPULAÇÃO BRASILEIRA**”, não infringe os dispositivos da Lei no. 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 08 de março de 2021.

Autor: Marcelo L. Occhiutto

DocuSigned by:
Marcelo Luis Occhiutto
EC571613B1954D8...

Orientador: Prof. Dr. Vital P. Costa

DocuSigned by:
Vital Paulino Costa
88458754CAB54B5...

Anexo 8.7 - Permissão para uso de Figuras/Tabelas

1/11/2021

RightsLink Printable License

ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Jan 11, 2021

This Agreement between Dr. Marcelo Occhiutto ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

| | |
|---------------------------------|--|
| License Number | 4980740075923 |
| License date | Jan 02, 2021 |
| Licensed Content Publisher | Elsevier |
| Licensed Content Publication | Progress in Retinal and Eye Research |
| Licensed Content Title | Critical pathogenic events underlying progression of neurodegeneration in glaucoma |
| Licensed Content Author | David J. Calkins |
| Licensed Content Date | Nov 1, 2012 |
| Licensed Content Volume | 31 |
| Licensed Content Issue | 6 |
| Licensed Content Pages | 18 |
| Start Page | 702 |
| End Page | 719 |

1/11/2021

RightsLink Printable License

| | |
|--|--|
| Type of Use | reuse in a thesis/dissertation |
| Portion | figures/tables/illustrations |
| Number of figures/tables/illustrations | 1 |
| Format | electronic |
| Are you the author of this Elsevier article? | No |
| Will you be translating? | Yes, including English rights |
| Number of languages | 1 |
| Title | Association of APOE gene polymorphisms with primary open angle glaucoma in Brazilian patients |
| Institution name | University of Campinas |
| Expected presentation date | Apr 2021 |
| Portions | Figure 7 |
| Specific Languages | portuguese |
| Requestor Location | Dr. Marcelo Occhiutto rua Crasso São Paulo, SP 05043010 Brazil Attn: Dr. Marcelo Occhiutto |
| Publisher Tax ID | GB 494 6272 12 |
| Total | 0.00 USD |

28/12/2020

RightsLink Printable License

ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Dec 28, 2020

This Agreement between Dr. Marcelo Occhiutto ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

| | |
|------------------------------|---|
| License Number | 4977770493403 |
| License date | Dec 28, 2020 |
| Licensed Content Publisher | Elsevier |
| Licensed Content Publication | Pathology |
| Licensed Content Title | Apolipoprotein E in lipoprotein metabolism, health and cardiovascular disease |
| Licensed Content Author | A.David Marais |
| Licensed Content Date | Feb 1, 2019 |
| Licensed Content Volume | 51 |
| Licensed Content Issue | 2 |
| Licensed Content Pages | 12 |
| Start Page | 165 |
| End Page | 176 |

28/12/2020

RightsLink Printable License

| | |
|--|--|
| Type of Use | reuse in a thesis/dissertation |
| Portion | figures/tables/illustrations |
| Number of figures/tables/illustrations | 1 |
| Format | electronic |
| Are you the author of this Elsevier article? | No |
| Will you be translating? | Yes, including English rights |
| Number of languages | 1 |
| Title | Association of APOE gene polymorphisms with primary open angle glaucoma in Brazilian patients |
| Institution name | University of Campinas |
| Expected presentation date | Apr 2021 |
| Portions | Figure 1 on page 167 |
| Specific Languages | portuguese |
| Requestor Location | Dr. Marcelo Occhiutto rua Crasso São Paulo, SP 05043010 Brazil Attn: Dr. Marcelo Occhiutto |
| Publisher Tax ID | GB 494 6272 12 |
| Total | 0.00 USD |

1/11/2021

RightsLink Printable License

**ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Jan 11, 2021

This Agreement between Dr. Marcelo Occhiutto ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number 4980960154801

License date Jan 02, 2021

Licensed Content Publisher Elsevier

Licensed Content Publication Elsevier Books

Licensed Content Title Progress in Molecular Biology and Translational Science

Licensed Content Author Janey L. Wiggs

Licensed Content Date Jan 1, 2015

Licensed Content Pages 28

Start Page 315

End Page 342

Type of Use reuse in a thesis/dissertation

Portion figures/tables/illustrations

Number of 1

| | |
|--|--|
| 1/11/2021 | RightsLink Printable License |
| figures/tables/illustrations | |
| Format | electronic |
| Are you the author of this Elsevier chapter? | No |
| Will you be translating? | Yes, including English rights |
| Number of languages | 1 |
| Title | Association of APOE gene polymorphisms with primary open angle glaucoma in Brazilian patients |
| Institution name | University of Campinas |
| Expected presentation date | Apr 2021 |
| Portions | Table 1 |
| Specific Languages | portuguese |
| Requestor Location | Dr. Marcelo Occhiutto rua Crasso São Paulo, SP 05043010 Brazil Attn: Dr. Marcelo Occhiutto |
| Publisher Tax ID | GB 494 6272 12 |
| Total | 0.00 USD |
| Terms and Conditions | |

*Permissão para utilização das Figuras 3 e 4 do artigo de Abondio e col. (183) *The Genetic Variability of APOE in Different Human Populations and Its Implications for Longevity*. Genes (Basel). 2019. 15;10(3):222. doi: 10.3390/genes10030222, concedido pela editora MDPI, como de uso livre, segundo informações obtidas no endereço eletrônico: <https://www.mdpi.com/openaccess>*

*“MDPI Open Access Information and Policy

All articles published by MDPI are made immediately available worldwide under an open access license. This means:

- everyone has free and unlimited access to the full-text of all articles published in MDPI journals;
- everyone is free to re-use the published material if proper accreditation/citation of the original publication is given;
- open access publication is supported by the authors' institutes or research funding agencies by payment of a comparatively low [Article Processing Charge \(APC\)](#) for accepted articles.

Permissions

“No special permission is required to reuse all or part of article published by MDPI, including figures and tables. For articles published under an open access Creative Common CC BY license, any part of the article may be reused without permission provided that the original article is clearly cited. Reuse of an article does not imply endorsement by the authors or MDPI.”