

INVESTIGAÇÃO DE VARIANTES GENÉTICAS EM PACIENTES BRASILEIROS PORTADORES DE GLAUCOMA PRIMÁRIO DE ÂNGULO ABERTO

Palavras-Chave: Gene *MYOC*, Glaucoma Primário de Ângulo Aberto, Genética Humana

Autores:

Thauany Cristina Lemes de Jesus, CBMEG – UNICAMP

Caio Nishihara Marques, CBMEG – UNICAMP

Carolina Scabello Apolonio, CBMEG – UNICAMP

Anna Julia dos Santos, CBMEG – UNICAMP

Geovana Dos Santos Souza, CBMEG – UNICAMP

Vinicius Fernandes Leda, CBMEG – UNICAMP

Me. Thiago Adalton Rosa Rodrigues (Monitor), CBMEG – UNICAMP

Prof.^ª. Mônica Barbosa de Melo (Orientadora), CBMEG – UNICAMP

*Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética – CBMEG

INTRODUÇÃO

O glaucoma primário de ângulo aberto (GPAA) é a principal causa de cegueira irreversível no mundo¹, sendo descrito como uma doença assintomática, neurodegenerativa e de etiologia multifatorial, cuja principal característica é o dano progressivo do disco óptico e perda progressiva das células ganglionares da retina (CGRs)²⁻⁴. Portanto, a identificação de fatores genéticos e ambientais é de grande importância para um diagnóstico precoce e para o estabelecimento de um manejo clínico apropriado⁵.

Vale ressaltar que histórica e geograficamente a população brasileira possui uma composição étnica miscigenada, resultado de múltiplos eventos de migração, provenientes da intersecção de três raízes ancestrais predominantes (ameríndios, europeus e africanos), que juntas configuram a maior parte de nossa base étnica e genética atual^{6,7}. Tais características propiciam um importante modelo genotípico e fenotípico para estudos envolvendo o GPAA. Porém, até hoje, populações miscigenadas como a brasileira permanecem pouco exploradas em relação às de base genética majoritariamente homogêneas, como europeus e asiáticos⁸.

O gene *MYOC* (miocilina) desempenha um papel crucial na etiologia do GPAA, principalmente na forma juvenil da doença (GPAA-J), de início precoce e de difícil controle clínico. A miocilina é uma proteína expressa em diferentes tecidos do corpo humano, mas seu principal papel é desempenhado no olho, particularmente no trabeculado, responsável pela drenagem do humor aquoso. A única consequência clínica conhecida da presença de mutações no gene *MYOC* é o glaucoma. Mutações no gene *MYOC* podem levar à produção de formas anômalas da proteína, que se acumulam nas células do trabeculado, obstruindo o fluxo normal do humor aquoso e resultando em aumento da pressão intraocular. Esse aumento da pressão é um fator de risco significativo para o desenvolvimento de GPAA, pois pode danificar o nervo óptico e comprometer a visão. Portanto, a pesquisa sobre o gene *MYOC* é essencial para entender os mecanismos fisiopatológicos do GPAA, permitir o diagnóstico precoce e desenvolver intervenções terapêuticas eficazes⁹⁻¹¹.

O objetivo deste projeto é avaliar alterações na sequência do gene *MYOC* em pacientes com o diagnóstico de GPAA. Tais avaliações foram realizadas por meio das técnicas de amplificação em cadeia da polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) e sequenciamento em amostras provenientes da população brasileira da região Sudeste. O objetivo desse projeto foi investigar a presença de variantes de risco no gene *MYOC* em pacientes com GPAA.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

Desenho experimental

Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da UNICAMP através da plataforma Brasil, e aprovado segundo o protocolo CAAE nº49120615.4.0000.5404, parecer nº 3.726.380, para uso de amostra biológica para pesquisas em genética humana.

Os métodos desenvolvidos na pesquisa estão descritos no organograma da **Figura 1**.



Figura 1. Métodos das atividades desenvolvidas no projeto PIBIC-EM.

Foram coletados 6 mL de sangue periférico através de punção da veia antecubital em frasco estéril VACUETTE®, contendo EDTA 10% como anticoagulante. Uma vez coletado, o sangue foi transportado até o Laboratório de Estudos em Genética Humana do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética – CBMEG (UNICAMP), onde as amostras foram devidamente identificadas e armazenadas. Posteriormente, foram iniciados os protocolos experimentais de biologia molecular para extração do ácido desoxirribonucleico (DNA), através da técnica de fenol-clorofórmio. A fim de preservar a confidencialidade dos pacientes envolvidos, todas as amostras receberam códigos.

Reação em Cadeia da Polimerase – PCR

A PCR é uma técnica de biologia molecular usada para amplificar fragmentos específicos de DNA. Ela utiliza enzimas denominadas DNA polimerases para copiar repetidamente uma sequência de DNA, criando milhões de cópias a partir de uma pequena amostra inicial. Esse processo envolve ciclos repetidos de aquecimento e resfriamento para desnaturar o DNA, ligar os *primers* às sequências alvo e estender as novas cadeias de DNA. A PCR é fundamental em diversas aplicações, como diagnóstico de doenças, clonagem de genes e estudos forenses.

A sequência dos *primers* utilizados estão descritas na **Tabela 1**. Após a amplificação, foram montados géis de agarose para avaliação da viabilidade das amostras, visando a mitigação de vieses experimentais no sequenciamento. Uma vez observado o *amplicon* (fragmento de interesse) foi então construído o *layout* das placas e realizado o próximo experimento, sequenciamento de Sanger.

Tabela 1. Especificações quanto às sequências dos iniciadores (*Primers*) utilizadas nas reações de PCR e sequenciamento das

regiões codificadoras do gene *MYOC*.

Éxons do gene <i>MYOC</i>	Primer Forward (5' – 3') Primer Reverse (5' – 3')	TA (°C)	Fragmento (pb)
<i>MYOC/1</i>	5'- GGTGCATAAATTGGGATGTTC -3'	62.0	999
	5'- TTGTGCTAGCTGTGCAGTCTC -3'		
<i>MYOC/2</i>	5'- AACATAGTCAATCCTTGGGCC -3'	61.0	346
	5'- GAGAGTTCTGTTCCTCTTCTCCTC -3'		
<i>MYOC/3A</i>	5'- GATTTGTCTCCAGGGCTGTC -3'	65.0	916
	5'- GCTTGGAGGCTTTTCACATC -3'		
<i>MYOC/3B</i>	5'- TCTGTGGCACCTGTACACC -3'	62.0	841
	5'- CCACCTTAAACATCCTGCAATC -3'		

TA = Temperatura de Anelamento, PB = Pares de base, A = Adenina, T = Timina, C = Citosina, G = Guanina

Sequenciamento de Sanger

Técnica de sequenciamento de DNA que determina a ordem das bases nucleotídicas (A, T, C, G) em um indivíduo. Ele usa nucleotídeos modificados (didesoxinucleotídeos) que interrompem a síntese do DNA em pontos específicos. Através de ciclos de desnaturação e anelamento/extensão, são gerados fragmentos de diferentes comprimentos, cada um terminando com um nucleotídeo marcado. Esses fragmentos são então separados por eletroforese capilar, e a ordem dos nucleotídeos é determinada pela leitura dos marcadores fluorescentes. Essa técnica ainda é o padrão-ouro do sequenciamento genético.

As reações de PCR e sequenciamento foram realizadas no termociclador *Veriti 96-Well Thermal Cycler* (*Applied Biosystem-Applera Corporation, Foster City, CA, EUA*). Posteriormente as reações foram purificadas com o objetivo de retirar o excesso de reagentes não utilizados. A purificação baseou-se em etapas de adição de etanol e centrifugação, após as quais os produtos das reações foram ressuspensos em 10 µL de Formamida *Hi-Di* (*Applied BioSystems, Foster City, CA, USA*), desnaturados a 94°C por 5 minutos e colocados em gelo.

Após a leitura do equipamento foi então gerado um arquivo de extensão “*ABI format chromatogram file (.ab1)*”, que por meio do *software FinchTV* versão 1.4.0 (*Geopiza, Informer Technologies Inc.*) pode ser lido, descrito e documentado. Finalmente, as sequências dos pacientes foram alinhadas com o genoma humano de referência, depositado no banco de dados público *Ensembl* para descrição das variantes de risco através da ferramenta online *Clustal Omega - Multiple Sequence Alignment (MSA)* (*EMBL-EBI*).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao todo, foram sequenciados os materiais genéticos de 10 pacientes (2 por aluno do projeto) analisando os exons 1, 2, 3A e 3B. A partir das análises, foram identificadas 3 alterações de nucleotídeo único (*SNV*), todas no exon 3A, entre os pacientes com GPAA: rs61730975, rs74315338, rs61730976, comparadas com o genoma de referência GRCh38.p14, como exemplo das demais análises realizadas. Uma *SNV* pode gerar impactos severos ao organismo, portanto, foram realizadas análises de predição de risco descrevendo cada uma delas.

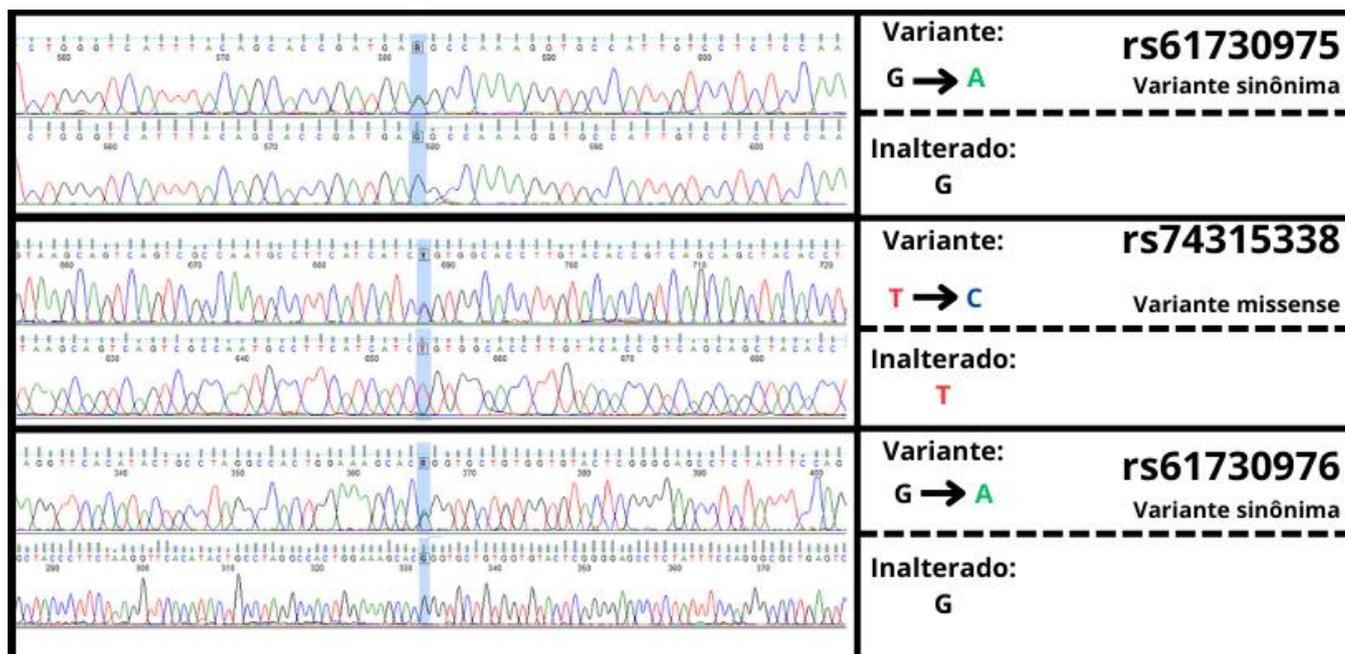


Figura 2. Eletroferograma dos sequenciamentos correspondentes ao éxon 3A do gene *MYOC*. Nas primeiras linhas com as variantes **rs61730975**, **rs74315338** e **rs61730976**, e nas segundas as seqüências inalteradas.

rs61730975 – Variante sinônima, encontrada no exon 3A do gene *MYOC*, com a troca de uma guanina para adenina (G/A) onde, apesar da base ser diferente, o aminoácido Alanina permanece inalterado na codificação proteica. A *SNV* possui um *Highest population minor allele frequency (MAF)* de 0.10 e conta com três citações na literatura acerca do glaucoma (Whigham *et al.* 2011; Liu *et al.* 2012; e Donegan *et al.* 2015). De acordo com Liu, 2012, essa variante não apresenta associação com o desenvolvimento do glaucoma.

rs74315338 – Variante *missense* com a troca de uma timina por uma citosina (T/C), levando à substituição do padrão selvagem do aminoácido Cisteína por uma Arginina. É uma variante que circula majoritariamente pelo Brasil, sendo também denominada Cys433Arg. A *SNV* possui um *Highest population minor allele frequency (MAF)* menor que 0.01 e possui ao menos duas citações na literatura do glaucoma, indicando associação com o desenvolvimento do glaucoma (Vasconcellos *et al.* 2000, Nazir *et al.* 2018 e Svidnicki *et al.* 2018).

rs61730976- Variante sinônima com a troca de uma guanina por uma adenina (G/A), não havendo alteração do aminoácido correspondente. A *SNV* possui um *Highest population minor allele frequency (MAF)* de 0.13 e apresenta ao menos 5 citações na literatura associada ao glaucoma (Rose *et al.* 2007; Rose *et al.* 2011; Whigham *et al.* 2011; Liu *et al.* 2012 e Nakahara e Hulleman 2022). De acordo com Liu, *et al.* 2012, essa variante não apresenta associação com o desenvolvimento do glaucoma.

Dentre os pacientes sequenciados nesse estudo, apenas um paciente apresentou a variante rs61730976, sendo que, este mesmo indivíduo foi o único a apresentar a variante rs74315338. Em contrapartida, apenas um paciente apresenta a variante rs61730975.

O glaucoma primário de ângulo aberto é uma condição oftalmológica crônica que causa danos ao nervo óptico devido à pressão intraocular elevada. Exames oftalmológicos representam a única estratégia de detecção da doença. Com o auxílio da genética, é possível identificar variantes com papel na fisiopatologia e herdabilidade do GPAA. Conhecer tais alterações pode permitir o diagnóstico precoce e, conseqüentemente, o controle mais eficiente da progressão da doença.

Nesta avaliação de uma amostra da população brasileira, foram identificadas três variantes (rs61730975, rs74315338, rs61730976). Dentre elas, duas não possuem relação significativa com o desenvolvimento do glaucoma. Porém, a variante rs74315338, codificante da alteração Cys433Arg, possui severo impacto no desenvolvimento do GPAA. Estudos de identificação de variantes em genes candidatos podem ampliar nossa compreensão acerca do comportamento do GPAA, tornando o manejo da afecção mais eficiente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 – QUIGLEY, H. A.; BROMAN, A. T. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *British Journal of Ophthalmology*, v. 90, p. 262-267, 2006.
- 2 – LESKE, M. C. The epidemiology of open-angle glaucoma: a review. *American Journal of Epidemiology*, v. 118, p. 166-191, 1983.
- 3 – RITCH, R.; SHIELDS, M. B.; KRUPIN, T. *The Glaucomas*. 2. ed. Saint Louis: Mosby-Yearbook, 1996. p. 875-885.
- 4 – QUIGLEY, H. A.; VITALE, S. Models of open-angle glaucoma prevalence and incidence in the United States. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v. 38, p. 83-91, 1997.
- 5 – SAMPLES, J. et al. Introductory ophthalmic genetics. *Ophthalmology Clinics of North America*, v. 16, p. 501-503, 2003.
- 6 – SALZANO, F. M.; SANS, M. Interethnic admixture and the evolution of Latin American populations. *Genetics and Molecular Biology*, v. 37, n. 1 Suppl, p. 151-170, 2014.
- 7 – PARRA, F. C. et al. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 100, n. 1, p. 177-182, 2003.
- 8 – NHGRI. Polygenic Risk Score. Disponível em: <https://www.genome.gov/Health/Genomics-and-Medicine/Polygenic-risk-scores>. Acesso em: 22 jun. 2024.
- 9 – ENNIS, S. et al. Prevalence of myocilin gene mutations in a novel UK cohort of POAG patients. *Eye (London, England)*, v. 24, p. 328-333, 2010.
- 10 – FINGERT, J. H. et al. Myocilin glaucoma. *Survey of Ophthalmology*, v. 47, p. 547-561, 2002.
- 11 – STONE, E. M. et al. Identification of a gene that causes primary open angle glaucoma. *Science*, v. 275, p. 668-670, 1997.
- 12- DONEGAN, R. K. et al. Structural basis for misfolding in myocilin-associated glaucoma. *Human Molecular Genetics*, v. 24, n. 8, p. 2111-2124, abril de 2015.
- 13- LIU, W. et al. Low prevalence of myocilin mutations in an African American population with primary open-angle glaucoma. *Molecular Vision*, v. 18, p. 2241-2246, 2012.
- 14- WHIGHAM, B. T. et al. Myocilin mutations in black South Africans with POAG. *Molecular Vision*, v.17, p.1064-69, 2011.
- 15- VASCONCELLOS, J. P. et al. Novel mutation in the MYOC gene in primary open glaucoma patients. *Journal of Medical Genetics*, v. 37, n. 4, p. 301-303, abril de 2000.
- 16- NAZIR, S. et al. A novel single nucleotide polymorphism in exon 3 of MYOC enhances the risk of glaucoma. *PLOS ONE*, v. 13, n. 4, e0195157, 2018.
- 17- SVIDNICKI, P. V. et al. Occurrence of MYOC and CYP1B1 variants in juvenile open angle glaucoma Brazilian patients. *Ophthalmic Genetics*, v. 39, n. 6, p. 724-717, 2018
- 18- NAKAHARA, E.; HULLEMAN, J. D. A Simple Secretion Assay for Assessing New and Existing Myocilin Variants. *Current Eye Research*, v. 47, n. 6, p. 918-922, junho de 2022.
- 19- ROSE, R. et al. Myocilin mutations among POAG patients from two populations of Tamil Nadu, South India, a comparative analysis. *Molecular Vision*, v. 17, p. 3243-3253, 2011.
- 20- ROSE, R.; et al. Myocilin mutations among primary open angle glaucoma patients of Kanyakumari district, South India. *Molecular Vision*, v. 13, p. 497-503, abril de 2007.