

Sequenciamento de Exomas para a Identificação de Variantes Genéticas Relacionadas ao Desenvolvimento do Glaucoma Primário de Ângulo Fechado em Duas Famílias Brasileiras

Palavras-chave: Glaucoma Primário de Ângulo Fechado – GPAF, Sequenciamento de Exomas, Bioinformática

Thiago Henrique Paes, **LEGH / CBMEG – UNICAMP**
Me. Thiago Adalton Rosa Rodrigues, **LEGH / CBMEG – UNICAMP**
Dr. Bruno Batista de Souza, **LEGH / CBMEG – UNICAMP**
Dr^a. Ana Carolina Lima Camargo, **LEGH / CBMEG – UNICAMP**
Lislíe Vitória Rodrigues Guimarães, **LEGH / CBMEG – UNICAMP**
Prof. Dr. José Paulo Cabral de Vasconcellos, **Departamento de Oftalmologia- Unicamp**
Prof^a. Dr^a. Mônica Barbosa de Melo (**Orientadora**), **LEGH / CBMEG – UNICAMP**

INTRODUÇÃO:

O glaucoma é a principal causa de cegueira irreversível no mundo, afetando 76 milhões de pessoas em 2020, com projeção de 111,8 milhões até 2040¹. Trata-se de uma afecção neurodegenerativa e multifatorial oriunda da perda progressiva das células ganglionares da retina, resultando no dano permanente e irreversível do disco óptico e respectiva redução do campo visual². O diagnóstico é baseado na relação escavação/disco óptico, afilamento das fibras nervosas e perdas de campo visual³. Dentre seus diversos subtipos, o glaucoma primário de ângulo fechado (GPAF) se destaca pela obstrução do fluxo de humor aquoso, devido ao contato entre a íris periférica e a malha trabecular, elevando de forma patológica a pressão intraocular (PIO), seu principal fator de risco⁴. Embora fatores como idade, sexo, etnia e anatomia ocular influenciem o GPAF, evidências robustas apontam um forte componente genético⁵. Neste sentido, um estudo demonstrou que irmãos de indivíduos com GPAF possuem risco significativamente maior de desenvolver ângulos estreitos⁶. O avanço das técnicas genômicas têm impulsionado cada vez mais a busca por genes candidatos em doenças complexas⁷. Estudos de Associação Genômica Ampla (*GWAS*), embora robustos na análise de variantes comuns, têm sido complementados por abordagens como o sequenciamento de exoma. Esta última se destaca por sua capacidade de identificar tanto variantes raras quanto comuns com potencial impacto funcional, oferecendo uma perspectiva mais abrangente na compreensão de complexas etiologias genéticas, como o GPAF⁸. Avanços nessas abordagens têm sido cruciais para desvendar os mecanismos genéticos da doença, abrindo portas para o diagnóstico precoce, estratificação de risco e terapias direcionadas. No entanto, a predominância de tais investigações se concentrou majoritariamente em populações asiáticas

e/ou europeias, deixando uma significativa lacuna no conhecimento acerca da genética do GPAF em populações latino-americanas e miscigenadas, como a população brasileira. Diante disso, o objetivo do trabalho foi investigar variantes genéticas potencialmente associadas ao GPAF em indivíduos pertencentes a duas famílias brasileiras com o histórico da doença, em oito indivíduos, sendo quatro de cada família (família 1 e família 2).

METODOLOGIA:

Foram investigadas duas famílias distintas (heredogramas disponíveis na **Figura 1**), sendo a Família 1 composta por um pai e um filho afetados, além de duas pessoas não afetadas; por sua vez, na Família 2, foram investigadas uma mãe e uma filha afetadas, assim como dois indivíduos não afetados do mesmo núcleo familiar. As amostras de DNA foram extraídas a partir de sangue periférico. Após o preparo das bibliotecas de DNA genômico e respectiva hibridização para captura de *arrays*, estas foram submetidas ao sequenciamento de nova geração. Prosseguiu-se com a construção e execução de um *pipeline* de bioinformática para alinhamento, controle de qualidade e anotação funcional das variantes de interesse biológico. A partir dos arquivos brutos gerados pelo sequenciamento foi executado um controle de qualidade por meio da ferramenta *FastQC* (v. 0.12.0). O alinhamento foi implementado utilizando o *software BWA* (v.0.6), mediante o genoma de referência *GRCh38*. O processamento pós-alinhamento, incluindo marcação de duplicatas e recalibração da qualidade, foi desempenhado com o uso das ferramentas *Picard* (v.3.4.0) e *GATK* (v.4.6.1.0), por meio do gerenciador de ambientes *Miniconda3* (v24.5.0). A anotação funcional das variantes identificadas foi desenvolvida utilizando o *Variant Effect Predictor (VEP)*, disponibilizado através do servidor genômico *Ensembl Genome Browser*. Todas as análises subsequentes foram realizadas em ambiente *RStudio* (v.4.1.2), baseado nos seguintes critérios de filtragem: seleção de variantes que interrompam a formação do transcrito (ganho/perda de códon de parada, mudança de matriz de leitura e alteração de sítio de *splicing* canônico); seleção de variantes sinônimas (controle de qualidade) e com perda de sentido; exclusão de variantes com cobertura de leitura menor que 10; exclusão de variantes com frequência alélica e frequência alélica máxima $> 0,05$ na base de dados *gnomAD*; exclusão de variantes consideradas toleradas/benignas por *SIFT* e/ou *Polyphen-2*; exclusão de variantes homozigotas; e variantes presentes nos afetados e ausentes em não afetados. A fim de validar funcionalmente os achados computacionais, será efetuado o sequenciamento de Sanger para os indivíduos da Família 1. Foram desenhados os *primers* para as sequências de interesse de cada gene candidato utilizando a ferramenta online *Primer3Plus*. Para a variante no gene *CHAT*, um *amplicon* de 620 pares de base foi construído e para a segunda variante, no gene *ABCC5*, um *amplicon* de 494 pb. A *PCR* do gene *CHAT* foi padronizada e a do gene *ABCC5* está em andamento. Em seguida, os produtos de *PCR* serão submetidos ao sequenciamento direto de Sanger. Posteriormente, os eletroferogramas serão avaliados via *software FinchTV* (v.1.4.0).

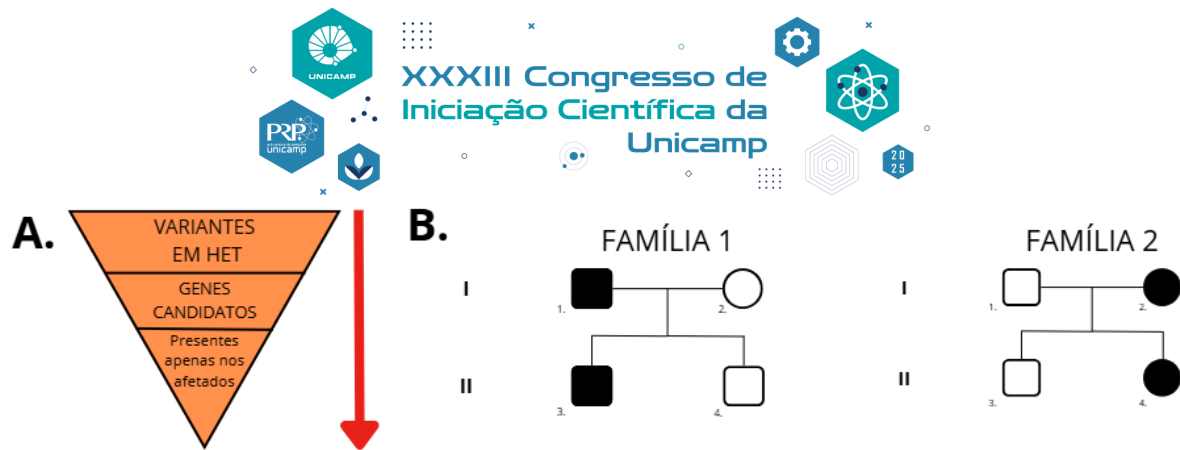


Figura 1: A. Etapas da filtragem das variantes germinativas após a anotação funcional. B. Heredograma das famílias investigadas.

RESULTADOS:

Após a execução do *pipeline*, foram selecionadas as variantes *missense* de maior interesse na Família 1: *ABCC5*:c.2449C>T (rs776943581) e *CHAT*:c.1682G>A (rs80097077). Até o momento, nenhuma variante possivelmente associada ao GPAF foi identificada na Família 2. Para avaliar o possível impacto dessas variantes no contexto da doença, foi realizada sua classificação segundo os critérios do American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)⁹, utilizando a plataforma *online Franklin*. A primeira alteração foi identificada como variante de significado incerto (*VUS*) e a segunda como benigna. A variante no gene *ABCC5*, para o transcrito *ENST00000334444*, apresentou uma cobertura de 39 leituras no Indivíduo 1 e 83 leituras no Indivíduo 3. As análises preditivas *in silico* indicaram um escore de 0,08 no *SIFT* (0-1, sendo considerados escores tolerados aqueles maiores que 0,5) e 0,003 no *PolyPhen-2* (0-1, sendo acima de 0,15 os escores possivelmente danosos), com frequência alélica de $4,021 \times 10^{-6}$ na base de dados *gnomAD*. Ainda, a variante no gene *CHAT*, localizada no transcrito *ENST0000037653*, apresentou cobertura de 20 leituras no Indivíduo 1 e 25 leituras no Indivíduo 3, com escores de 0 no *SIFT* e 0,996 no *PolyPhen-2*, além de uma frequência alélica de $7,5 \times 10^{-3}$.

DISCUSSÃO:

O gene *ATP binding Cassette Subfamily C Member 5* (*ABCC5*) codifica uma proteína importante para o transporte de várias moléculas através da membrana intra/extracelular¹⁰. Ademais, este é expresso em estruturas do segmento anterior do olho (íris, corpo ciliar e córnea) e suas *SNVs* já foram associadas à variação na profundidade da câmara anterior, característica quantitativa relevante ao GPAF^{11,12}. Outra análise em *zebrafish* sugeriu um importante papel do *ABCC5* relacionado ao desenvolvimento ocular por meio da regulação dos níveis intracelulares de *cGMP*. No entanto, não se sabe ao certo seu papel no contexto da afecção¹³. O preditor *SIFT* para a variante no gene *ABCC5* indicou possibilidade de tolerância biológica, contudo apresentando baixa confiabilidade; além disso, a mesma foi considerada benigna pelo *Polyphen-2*. No entanto, essa variante apresentava outros critérios que levaram à sua classificação como *VUS*: 1) frequência extremamente baixa nas bases de dados do *gnomAD* (<0,001%); 2) localização em um gene com baixa tolerância a variantes *missense* (*z-score* = 3,6), o que indica que mutações *missense* benignas são raras nesse gene e que esse tipo de mutação pode estar associado ao mecanismo da doença. O segundo gene, *Choline O-Acetyltransferase* (*CHAT*), codifica uma enzima responsável por catalisar a biossíntese do neurotransmissor acetilcolina, exercendo função na contração pupilar¹⁴. Há evidências que

indicam que medicações anticolinérgicas podem precipitar o GPAF agudo através da dilatação pupilar e subsequentemente, do bloqueio pupilar^{15,14}. É sugerido que, dessa forma, o risco de GPAF esteja sob o controle da variação genética natural em *CHAT* por regular os níveis de acetilcolina¹⁶. Assim, a alteração molecular no gene *CHAT* foi indicada como deletéria em ambos os preditores. Embora sua classificação tenha sido benigna, este foi apontado como deletério em outros preditores *in silico* disponíveis no *Franklin (REVEL e Aggregated Prediction)*. Para a validação experimental das variantes na Família 1, serão necessárias análises das regiões das variantes para cada gene, por meio do sequenciamento, atualmente em andamento.

CONCLUSÕES:

Os achados deste estudo sugerem um possível envolvimento das variantes nos genes *ABCC5* e *CHAT* na etiologia do GPAF. No entanto, a confirmação dessas variantes ainda depende da realização do sequenciamento de Sanger. Além disso, estudos funcionais e a investigação em coortes independentes são essenciais para validar o papel biológico dessas variantes, fortalecendo sua associação com a doença.

BIBLIOGRAFIA

1. 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(11):2081-2090.
2. Weinreb RN, Khaw PT. Primary open-angle glaucoma. *Lancet*. 2004 May 22;363(9422):1711-20
3. Kwon YH, Fingert JH, Kuehn MH, et al. Primary open-angle glaucoma. *N Engl J Med*. 2009 Mar 12;360(11):1113-24.
4. Choplin NT, Traverso CE. Atlas of Glaucoma, 3th ed. *Boca Raton: CRC Press*, 2014.
5. Foster PJ, Buhrmann R, Quigley HA, et al. The definition and classification of glaucoma in prevalence surveys. *Br J Ophthalmol*. 2002 Feb;86(2):238-42.
6. Sun X, Dai Y, Chen Y, Yu DY, Cringle SJ, Chen J, Kong X, Wang X, Jiang C. Primary angle closure glaucoma: What we know and what we don't know. *Prog Retin Eye Res*. 2017 Mar; 57:26-45.
7. Amerasinghe N, Zhang J, Thalamuthu A, He M, Vithana EN, Viswanathan A, Wong TY, Foster PJ, Aung T. The heritability and sibling risk of angle closure in Asians. *Ophthalmology*. 2011 Mar;118(3):480-5.
8. Uitterlinden AG. An Introduction to Genome-Wide Association Studies: GWAS for Dummies. *Semin Reprod Med*. 2016;34(4):196-204.
9. Majewski J, Schwartzentruber J, Lalonde E, Montpetit A, Jabado N. What can exome sequencing do for you? *J Med Genet*. 2011 Sep;48(9):580-9.
10. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015 May;17(5):405-24.
11. Jedlitschky G, Burchell B, Keppler D (2000) The multidrug resistance protein 5 functions as an ATP-dependent export pump for cyclic nucleotides. *J Biol Chem* 275: 30069–30074.
12. Nongpiur ME, Khor CC, Jia H, et al. *ABCC5*, a gene that influences the anterior chamber depth, is associated with primary angle closure glaucoma. *PLoS Genet*. 2014;10(3):e1004089. Published 2014 Mar 6.

12. Karla PK, Quinn TL, Herndon BL, Thomas P, Pal D, Mitra A. Expression of multidrug resistance associated protein 5 (MRP5) on cornea and its role in drug efflux. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2009;25(2):121-132.
13. Long Y, Li Q, Li J, Cui Z. Molecular analysis, developmental function and heavy metal-induced expression of ABCC5 in zebrafish. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2011;158(1):46-55.
14. Mandak JS, Minerva P, Wilson TW, Smith EK. Angle closure glaucoma complicating systemic atropine use in the cardiac catheterization laboratory. *Cathet Cardiovasc Diagn.* 1996; 39:262–4.
15. Lachkar, Y. & Bouassida, W. Drug-induced acute angle closure glaucoma. *Curr. Opin. Ophthalmol.* 18, 129–133 (2007).
16. Gowtham L, Halder N, Angmo D, Singh SB, Jayasundar R, Dada T, et al. Elevated histamine levels in aqueous humor of patients with glaucoma. *Mol Vis* 2021; 27:564-73.