

RODRIGO EVALDO DE AZEVÊDO COÊLHO



**ESTUDO DA PRESENÇA DAS MUTAÇÕES DO GENE *CYP1B1*
EM PACIENTES COM GLAUCOMA CONGÊNITO PRIMÁRIO NO
NORDESTE DO BRASIL**

**RECIFE-PE
2018**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA**



RODRIGO EVALDO DE AZEVÊDO COÊLHO

**ESTUDO DA PRESENÇA DAS MUTAÇÕES DO GENE *CYP1B1*
EM PACIENTES COM GLAUCOMA CONGÊNITO PRIMÁRIO NO
NORDESTE DO BRASIL**

Dissertação a ser apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Cirurgia.

Orientador

Dr. Rodrigo Pessoa Cavalcanti Lira
Prof. do Departamento de Cirurgia, CCS-UFPE

Coorientador

Dra. Dayse Ribeiro de Sena
Médica - Oftalmologista/ Preceptoria HC - UFPE

Apoio Financeiro

MEC / MCTI / CAPES / CNPQ / FAPS - # 735.884;
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA).

RECIFE-PE
2018

Catálogo na fonte:
bibliotecário: Aécio Oberdam, CRB4:1895

C672e Coelho, Rodrigo Evaldo de Azevêdo.
Estudo da presença das mutações do gene CYP1B1 em pacientes com glaucoma congênito primário no nordeste do Brasil / , Rodrigo Evaldo de Azevêdo Coelho. – Recife: o autor, 2018.
99 f.; 30 cm.

Orientador: Rodrigo Pessoa Cavalcanti Lira.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em cirurgia.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Glaucoma congênito primário. 2. Cegueira. 3. Crianças. 4. Mutação. 5. CYP1B1. I. Lira, Rodrigo Pessoa Cavalcanti (orientador). II. Título.

617 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2018 - 046)

RODRIGO EVALDO DE AZEVÊDO COÊLHO



**ESTUDO DA PRESENÇA DAS MUTAÇÕES DO GENE *CYP1B1*
EM PACIENTES COM GLAUCOMA CONGÊNITO PRIMÁRIO NO
NORDESTE DO BRASIL**

Dissertação a ser apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Cirurgia.

Tese aprovada em: 19 / 02 / 2018

Prof. Dr. Thiago Freire Pinto Bezerra - UFPE

Profa. Dra. Danyelly Brunaska Gondim Martins - UFPE

Dra. Dayse Ribeiro de Sena - UFPE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA



REITOR

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Profa. Florisbela de Arruda Câmara e Siqueira Campos

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIRETOR

Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

DIRETOR SUPERINTENDENTE

Dr. Frederico Jorge Ribeiro

DEPARTAMENTO DE CIRURGIA

CHEFE

Prof. Francisco de Assis Cordeiro Barbosa

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

NÍVEL MESTRADO E DOUTORADO

COORDENADOR

Prof. Rodrigo Pessoa Cavalcanti Lira

VICE-COORDENADOR

Prof. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz

CORPO DOCENTE

Prof. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz

Prof. Carlos Teixeira Brandt

Prof. Eptácio Leite Rolim Filho

Prof. Euclides Dias Martins Filho

Prof. Fernando Ribeiro de Moraes Neto

Prof. Flávio Kreimer

Prof. José Lamartine de Andrade Aguiar

Prof. José Luiz de Figueiredo

Prof. Josemberg Marins Campos

Profa. Lilian Ferreira Muniz

Prof. Lucio Vilar Rabelo Filho

Profa. Magdala de Araújo Novaes

Prof. Rodrigo Pessoa Cavalcanti Lira

Prof. Salvador Vilar Correia Lima

Prof. Sílvio da Silva Caldas Neto

Prof. Thiago Freire Pinto Bezerra

A *Deus*, por tudo.

A minha esposa *Isabela Nogueira Pimentel de Azevêdo Coêlho*, por ser referência na minha vida em todos os aspectos, pelo amor, companheirismo, paciência e incentivo em todos os momentos.

A minha filha *Maria Lara Pimentel Coêlho*, pela paciência pelas horas dedicadas a essa pesquisa e sempre me receber com um sorriso, ainda que sonolento.

A minha mãe *Maria do Perpétuo Socorro Forte Cirne de Azevêdo*, pela dedicação incondicional à minha formação pessoal e profissional, e ao *meu pai José Mário Duarte Coêlho*, pelo incentivo à educação desde criança.

Aos meus sogros *Ricardo Barbosa Pimentel e Silvana Mara Nogueira Pimentel* pelo suporte a mim, minha esposa e minha filha que me permitiu a dedicação total a essa pesquisa.

A meus irmãos *José Mário Filho e Penha Elizabeth*, pelo apoio e incentivo sempre.

A *meus amigos e colegas*, pela imensa ajuda e incentivo na confecção desta dissertação.

AGRADECIMENTOS



À Dra. Dayse Ribeiro de Sena,

minha orientadora externa, pela oportunidade dada e pelo apoio para elaboração desse projeto.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Pessoa Cavalcanti Lira,

coordenador da pós-graduação em cirurgia e meu orientador interno, pelo exemplo de dedicação à pesquisa científica.

Ao Dr. Marcelo Ventura e todos da direção e coordenação, médicos residentes e funcionários da Fundação Altino Ventura
por todo o suporte dado para realização dessa pesquisa.

A Marcia e Mércia,

pela dedicação, paciência, suporte e colaboração na formação desta pesquisa.

À Danyelly Brunaska e Sandra do LIKA,

pelo apoio imediato sem o qual a execução deste trabalho seria impraticável.

A Bosco, Rodrigo e Cheysa do laboratório Genomika,

pela parceria e paciência para realização deste projeto.

Aos pacientes participantes e seus familiares,

sem os quais o trabalho científico não seria possível.

RESUMO



O glaucoma congênito primário (GCP) é uma doença genética rara tipicamente diagnosticada durante o primeiro ano de vida como uma causa importante de cegueira infantil em todo o mundo. A prevalência de GCP varia amplamente. Sobre o GCP poder exibir fenótipo variável, acredita-se que populações etnicamente diversas como a do Nordeste do Brasil sobre a qual não há na literatura pesquisas sobre o tema, podem ter um benefício importante em cuidados com GCP por identificação e tratamento precoces, diminuindo a cegueira desnecessária. O objetivo foi Identificar mutações do gene *CYP1B1* em pacientes portadores de glaucoma congênito primário do Nordeste do Brasil e possíveis correlações genótipo-fenótipo. Estudo tipo série de casos de 17 indivíduos com GCP da FAV, Recife - Brasil. Todos os indivíduos foram submetidos a exames oculares, incluindo informações do registro médico, exame de lâmpada de fenda, fundoscopia, tonografia, medição do diâmetro da córnea e espessura possível.: A média de idade no momento do exame foi de 27,7 anos, 52,9% (n = 9) eram do sexo masculino, 29,4% (n = 5) tinham história de consanguinidade parental, um indivíduo não usava medicação, média de relação/disco 0,7-0,8, 94,1% (n = 16) indivíduos submetidos à cirurgia ocular. A idade individual da cirurgia não foi identificada por falta de informação. Foram encontradas cinco mutações patogênicas (Q19X, Y81N, P437L, T404fs, G61E) e nove polimorfismos de nucleotídeo único, sendo seis em éxons (D449D, V432L, A119S, R48G, V243V, N453S) e 3 em íntrons (rs4987134, rs34468861, rs2617266) e não se encontrou correlação genótipo-fenótipo estatisticamente significativa.

Palavras-chave: Glaucoma congênito primário. Cegueira. Crianças. Mutação. *CYP1B1*.

ABSTRACT



Primary congenital glaucoma (PCG) is a rare genetic disease typically diagnosed during the first year of life as an important cause of childhood blindness worldwide. The prevalence of PCG ranges widely. Due to PCG can exhibit variable phenotype, we believe that in ethnically diverse populations about which no researches were found such as the Northeastern of Brazil may have an important benefit on PCG care by earlier identification and treatment lowering unnecessary blindness. The purpose of this study is to identify mutations of the *CYP1B1* gene in patients with primary congenital glaucoma in Northeast Brazil and possible genotype-phenotype correlations. Case series type study of 17 individuals with PCG from the FAV, Recife - Brazil. All individuals underwent eye examination, including information from the medical record, slit lamp examination, funduscopy, tonography, measurement of cornea diameter and thickness as possible. The mean age at the time of the examination was 27.7 years, 52.9% (n = 9) were male, 29.4% (n = 5) had history of parental consanguinity history of PCG, 1 individual did not use medication, mean 0.7-0.8 disc/cup rate, 94.1% (n =16) individuals had ocular surgery. The individual age of surgery was not identified due to lack of information. We found five pathogenic mutations (Q19X, Y81N, P437L, T404fs, G61E) and nine single nucleotide polymorphisms, among which six in exons (D449D, V432L, A119S, R48G, V243V, N453S) and three in introns (rs4987134, rs344468861, rs2617266). No statistically significant genotype-phenotype correlation was found.

Keywords: Primary congenital glaucoma. Blindness. Children. Mutation. *CYP1B1* gene.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES



Quadro 1	Glaucoma associado a anomalias oculares não adquiridas	21
Quadro 2	Glaucoma associado a doenças sistêmicas não adquiridas ou síndromes	22
Quadro 3	Glaucoma associado a condição adquirida	23
Quadro 4	Genes associados ao GCP	26
Quadro 5	Concentração e qualidade das amostras de DNA	38

LISTA DE TABELAS



Tabela 1	Perfil amostral da população estudada	42
Tabela 2	Principais achados biomicroscópicos na consulta dos pacientes com glaucoma congênito primário	45
Tabela 3	Mutações do gene <i>CYP1B1</i> nos pacientes da pesquisa	46
Tabela 4	SNPs nos éxons do gene <i>CYP1B1</i> nos pacientes da pesquisa	47
Tabela 5	Mutações e Polimorfismos de Nucleotídeo Único encontrados nos pacientes com glaucoma congênito primário	50
Tabela 6	Comparação das características clínicas para as variáveis categóricas entre os grupos de acordo com a presença de mutação no gene <i>CYP1B1</i>	51
Tabela 7	Comparação das características clínicas para as variáveis quantitativas entre os grupos de acordo com a presença de mutação no gene <i>CYP1B1</i>	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS



A	adenosina
Ala	alanina
Arg	arginina
Asn	ácido aspártico
C	citosina
CGRN	<i>childhood Glaucoma Research Network</i>
CONEP	comissão Nacional de Ética em Pesquisa
<i>CYP1B1</i>	citocromo P450, família 1, subfamília B, polipeptídeo 1
DCH	diâmetro corneano horizontal
del	deleção
DNA	ácido desoxirribonucleico
DP	desvio-padrão
ECC	espessura central corneana
EDTA	ácido etilenodiamino tetracético
G	guanina
GCP	glaucoma congênito primário
GLC3	código para locus associado ao glaucoma congênito
Gln	glutamina
Gly	glicina
H ₂ O	água
HCl	ácido clorídrico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
Indels	polimorfismos de inserção/deleção
ins	inserção
Leu	leucina
LIKA	laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro

NaCl	cloreto de sódio
OMIM	<i>On Line Mendelian Inheritance in Man</i>
p	nível de significância estatística
pb	pares de base
PCR	reação em cadeia de polimerase
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	<i>odds ratio</i>
PIO	pressão intraocular
Pro	prolina
Ser	serina
SNPs	polimorfismos de nucleotídeo único
T	timina
Trp	triptofano
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
Val	valina
X	código de parada
WGA	<i>World Glaucoma Association</i>

SUMÁRIO



1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Apresentação do problema	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	Objetivo geral	17
2.2	Objetivo específicos	17
3	REVISÃO DA LITERATURA	18
3.1	Histórico	18
3.2	Definição e classificação	19
3.2.1	Definição da CGRN/WGA (2013)	19
3.2.2	Classificação da CGRN/WGA (2013)	20
3.2.2.1	<i>Glaucoma infantil primário</i>	20
3.2.2.2	<i>Glaucoma infantil secundário</i>	21
3.3	Conceito e tipos de mutações genéticas	23
3.4	Gene <i>CYP1B1</i> , herança e mutações	25
3.5	Fisiopatologia do glaucoma congênito primário	27
3.6	Quadro clínico do glaucoma congênito primário	27
3.7	Investigação da doença	27
3.8	Tratamento	28
3.9	Correlações entre mutações do gene <i>CYP1B1</i> e o fenótipo do GCP	28
4	CASUÍSTICA E MÉTODOS	35
4.1	Local e população do estudo	35
4.2	Delineamento do estudo	35
4.3	Período e amostra do estudo	35
4.4	Seleção dos pacientes	35
4.4.1	Critérios de inclusão	35
4.4.2	Critérios de exclusão	36

4.5	Caracterização da amostra	36
4.6	Procedimentos	36
4.6.1	Procedimentos técnicos	36
4.6.1.1	<i>Coleta e armazenamento das amostras</i>	37
4.6.1.2	<i>Extração automatizada de DNA</i>	37
4.6.1.3	<i>Análise das amostras/Sequenciamento do gene CYP1B1</i>	38
4.7	Procedimentos analíticos	39
4.7.1	Cálculo do tamanho da amostra	40
4.7.2	Expressão das variáveis	40
4.7.3	Testes estatísticos utilizados	40
4.7.4	Força da verdade	41
4.8	Procedimentos éticos	41
5	RESULTADOS	42
5.1	Identificação das mutações reportadas patogênicas do gene CYP1B1	46
5.2	Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) não-patogênicos do gene CYP1B1	48
5.3	Correlação genótipo-fenótipo	51
6	DISCUSSÃO	53
7	CONCLUSÕES	59
	REFERÊNCIAS	60
	APÊNDICE A – Versão do manuscrito conforme a Revista PLOS ONE	68
	APÊNDICE B – Protocolo da Pesquisa	87
	APÊNDICE C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	88
	ANEXO A – Manuscrito submetido: Revista PLOS ONE	96
	ANEXO B – Aprovação do projeto de pesquisa	97
	ANEXO C – Trabalho apresentado no VIII International Symposium on Diagnostics and Therapeutics (SINATER), III International Symposium on Rare Diseases (RDis) and LIKA Scientific Journey - 2017	99



1 INTRODUÇÃO¹

1.1 Apresentação do problema

O glaucoma é uma das maiores causas de cegueira no mundo⁽¹⁾ e consiste da morte progressiva das células ganglionares da retina. A progressão da doença se deve destacadamente à elevação da pressão intraocular⁽²⁾, o principal fator de risco, por acúmulo do humor aquoso, líquido que tem função de nutrição no olho, o que pode levar a dano ao nervo óptico e cegueira irreversível.

Pode-se classificar o glaucoma em primário ou secundário, congênito ou adquirido. Dentre os glaucomas congênitos, o primário é a forma mais comum e pode se apresentar de forma devastadora, sendo uma importante causa de cegueira na infância⁽³⁻⁵⁾. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) estipulam que 80% das deficiências visuais podem ser evitadas ou curadas se diagnosticadas e tratadas a tempo. No Brasil, em torno de 11% dos casos de deficiência visual são devidos ao glaucoma congênito⁽⁶⁾.

O glaucoma congênito primário (GCP) é uma trabeculodisgenesia isolada, ou seja, não associada a qualquer outra anomalia ocular importante^(7,8); essa é uma rara doença ocular que pode afetar crianças desde o nascimento e se apresenta, tipicamente, antes dos três anos de idade⁽⁷⁾ e ocorre aproximadamente em 1 a cada 10.000 nascimentos, embora possa variar de acordo com a população estudada. Ainda que a maioria dos casos seja esporádica, de 10 a 40% têm uma história familiar. A distribuição desta doença é mundial e não apresenta preferências entre as raças. Usualmente, em 70 a 80% dos casos, o GCP afeta ambos os olhos (forma bilateral)⁽⁹⁻¹¹⁾.

Doença ocular como o GCP tem um padrão de herança autossômica recessiva⁽¹²⁾ causada por mutações no gene *CYP1B1*. Um gene é composto de algumas regiões como a promotora, a codificadora (éxons) e as não codificadoras. No caso do gene *CYP1B1*, este é composto por três éxons, dentre os quais os dois últimos (éxon 2 e éxon 3) podem sofrer mutações já relacionadas ao glaucoma

¹Dissertação formatada conforme orientação da Biblioteca Central e Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da UFPE: ABNT NBR 14724:2011. Versão do manuscrito conforme a Revista: PLOS ONE (APÊNDICE A). Manuscrito submetido: Revista PLOS ONE (ANEXO A).

congênito⁽¹³⁾. Segundo Chakrabarti⁽¹⁴⁾, em aproximadamente 44.93% de todos os casos de GCP, ocorrem mutações no gene *CYP1B1*.

O gene *CYP1B1* já tem sido analisado em pacientes portadores de glaucoma congênito no Brasil; no entanto, ainda se procura desvendar as correlações genótipo-fenótipo pertencentes às mutações desse gene que ajudariam no entendimento do curso clínico da doença para um melhor prognóstico⁽¹⁵⁾.

Devido ao GCP poder exibir fenótipo variável, acreditamos que em populações etnicamente diversas, como no Nordeste do Brasil, a detecção precoce de mutações pode contribuir para a adoção de tratamento mais eficaz e personalizado. Assim, a perspectiva da investigação genética fomenta a necessidade de pesquisa científica, em busca de novas descobertas no âmbito do glaucoma congênito. Nesse contexto, o objetivo principal deste estudo centra-se em identificar mutações do gene *CYP1B1* em pacientes portadores de glaucoma congênito primário do Nordeste do Brasil e possíveis correlações genótipo-fenótipo, expandindo o conhecimento sobre o perfil dessa população.



2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Identificar mutações do gene *CYP1B1* em pacientes portadores de glaucoma congênito primário do Nordeste do Brasil e possíveis correlações genótipo-fenótipo.

2.2 Objetivos específicos

- 1- Identificar mutações com associação conhecida com o glaucoma congênito na população estudada através de análise laboratorial, como no locus *GLC3A* (2p22-p21) do gene *CYP1B1*;
- 2- Identificar polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) intragênicos do gene *CYP1B1*;
- 3- Identificar as características clínicas: cegueira, biomicroscopia e fundoscopia para avaliar a relação escavação/disco, pressão intraocular e diâmetro corneano, paquimetria corneana;
- 4- Identificar as características demográficas: idade atual e de apresentação da doença, história de consanguinidade dos pais;
- 5- Identificar as características: número de cirurgias oculares para controle da doença e de medicações antiglaucomatosas em uso.



3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Histórico

Segundo Mandal e Chakrabarti (2011), Hipócrates (460-377 aC), Celsus (século I dC) e Galeno (130-201 dC) identificaram o aumento congênito do olho, entretanto não associaram a PIO elevada com essa condição. Berger (1744) citou o aumento da PIO, mas foi em 1869 que von Muralt estabeleceu o tipo clássico de bftalmo dentro da família do glaucoma; todavia, ambos acreditaram que uma inflamação intraocular primária teria sido o motivo para esta condição. Entre o final do século XIX e o início do século XX que, em estudos de von Hippel (1897), Parsons (1904), Siegrist (1905), Gros (1897), Reis (1905-1911), Seefelder (1906-1920) e outros, dissecações anatômicas precisas foram efetuadas e a etiopatologia apontou para várias malformações das estruturas do ângulo da câmara anterior.

No início do século XX, os glaucomas congênitos aparentavam não ter tratamento. O pobre prognóstico do glaucoma infantil mudou drasticamente em 1938⁽¹⁶⁾ com a introdução da goniotomia (do grego: gonio = ângulo; tomein = corte) de Otto Barkan, que reviveu a operação do cirurgião italiano de Vincentis (1892), que "incisou o ângulo da íris no glaucoma". Otto Barkan modificou a operação de Vincentis usando uma lente de contato de vidro especialmente projetada para visualizar as estruturas angulares ao usar uma lâmina para criar uma fenda interna no tecido trabecular. Sem o desenvolvimento instrumental e microscópico, a operação permaneceu essencialmente inalterada.

Em 1949, Barkan descreveu uma membrana fetal persistente sobrepondo a malha trabecular. Isto foi confirmado por Worst (1966), que a chamou de membrana de Barkan. No entanto, estudos patológicos de Anderson, Hansson, Maul, Maumenee e outros não conseguiram encontrar a existência de nenhuma membrana por iluminação ou microscopia eletrônica.

Durante muitos anos, a goniotomia permaneceu a operação clássica para o glaucoma congênito até que uma nova técnica chamada "trabeculectomia *ab externo*" foi descrita de modo simultâneo e independente por Burian e Smith em 1960. Em março de 1960, sem a ajuda de um microscópio cirúrgico, a primeira trabeculectomia externa foi realizada por Burian em uma jovem com síndrome de Marfan e glaucoma.

No mesmo ano, Redmond Smith desenvolveu uma operação que ele chamou de "trabeculotomia com filamento de nylon". Isso implicava a canulação do canal de Schlemm com uma sutura de nylon em um local, subindo a sutura circunferencialmente, retirando-a em outro local e puxando-o como uma corda de arco. A técnica cirúrgica da trabeculotomia *ab externo* foi posteriormente modificada por Harms (1969), Dannheim (1971) e McPherson (1973)⁽¹⁷⁾.

3.2 Definição e classificação

O período da infância é definido com base em critérios nacionais: na União Europeia, Reino Unido e Unicef é de 16 anos ou mais jovem e nos EUA é de menos de 18 anos de idade.

3.2.1 Definição da CGRN/WGA (2013)⁽¹⁸⁾

A definição de glaucoma segundo a *Childhood Glaucoma Research Network (CGRN)/ World Glaucoma Association (WGA)* é:

- **Glaucoma:** danos causados pela PIO no olho; pelo menos 2 critérios necessários para o diagnóstico:
 - ✓ PIO > 21 mm Hg, mas atenção para o fato de que, se o exame foi unicamente sob anestesia, os valores da PIO podem estar influenciados pelo método;
 - ✓ Escavação do disco óptico: aumento progressivo na relação escavação/disco, assimetria escavação/disco de $\geq 0,2$ quando os discos ópticos são de tamanho semelhante ou afinamento focal da rima;
 - ✓ Achados da córnea: estrias de Haab ou diâmetro ≥ 11 mm em recém-nascido, > 12 mm em criança < 1 ano ou > 13 mm em qualquer idade;
 - ✓ Miopia progressiva, mudança miópica ou aumento das dimensões oculares, fora do crescimento normal;
 - ✓ Defeito de campo visual reproduzível consistente com neuropatia óptica glaucomatosa sem outra razão observável para o defeito.

- **Suspeito de glaucoma:** nenhum dano relacionado à PIO e pelo menos 1 dos seguintes critérios:
 - ✓ PIO > 21 mm Hg em 2 ocasiões distintas;
 - ✓ Aparência do disco óptico suspeita para o glaucoma, ou seja, aumento da relação escavação/disco para o tamanho do disco óptico;
 - ✓ Campo visual suspeito para o glaucoma;
 - ✓ Aumento do diâmetro da córnea ou do comprimento axial na presença da PIO normal.

3.2.2 Classificação da CGRN/WGA (2013)⁽¹⁸⁾

A classificação de glaucoma infantil segundo a *Childhood Glaucoma Research Network (CGRN)/World Glaucoma Association (WGA)* é:

3.2.2.1 Glaucoma infantil primário

- **Glaucoma congênito primário (GCP):**
 - ✓ Reune os critérios de definição de glaucoma, geralmente com aumento do globo ocular;
 - ✓ Anomalias de ângulo camerular com ou sem anomalias da íris.
 - ✓ Subcategorias com base na idade do início:
 - ◆ Neonatal ou recém nascido: 0-1 mês;
 - ◆ Infantil:> 1-24 meses;
 - ◆ Início tardio ou reconhecimento tardio:> 2 anos.
 - ✓ Casos resolvidos espontaneamente com PIO normal, mas sinais típicos de GCP, podem ser classificados como GCP.
- **Glaucoma juvenil de ângulo aberto (GJAA):**
 - ✓ Reune os critérios de definição de glaucoma;
 - ✓ Sem aumento ocular;
 - ✓ Sem anomalias oculares congênitas ou síndromes;
 - ✓ Ângulo aberto, aparência normal;

3.2.2.2 Glaucoma infantil secundário

- **Glaucoma associado a anomalias oculares não adquiridas:**
 - ✓ Inclui condições de anomalias predominantemente oculares presentes no nascimento que podem ou não estar associadas a sinais sistêmicos;
 - ✓ Reune os critérios de definição de glaucoma;
 - ✓ Lista de anomalias oculares mais comuns (Quadro 1).
- **Glaucoma associado a anomalias sistêmicas não adquiridas:**
 - ✓ Inclui condições predominantemente de doença sistêmica presente no nascimento que pode estar associada a sinais oculares;
 - ✓ Reune os critérios de definição de glaucoma;
 - ✓ Lista de doenças ou síndromes sistêmicas (Quadro 2).

Quadro 1. Glaucoma associado a anomalias oculares não adquiridas⁽¹⁸⁾

Condições com anomalias predominantemente oculares presentes no nascimento que podem ou não estar associadas a sinais sistêmicos
◆ Anomalia de Axenfeld Rieger (síndrome se associação sistêmica)
◆ Anomalia de Peters (síndrome se associações sistêmicas)
◆ Ectrópio uveal
◆ Hipoplasia congênita da íris
◆ Aniridia
◆ Vasculatura fetal persistente (se glaucoma presente antes de cirurgia de catarata)
◆ Melanocitose oculodérmica (Nevo de Ota)
◆ Distrofia polimorfa posterior
◆ Microftalmia
◆ Microcórnea
◆ <i>Ectopia lentis</i>
◆ Ectopia lenticular (sem associações sistêmicas) ou <i>Ectopia lentis et pupillae</i>

Quadro 2. Glaucoma associado a doenças sistêmicas não adquiridas ou síndromes⁽¹⁸⁾

Condições com síndromes predominantemente conhecidas, anomalias sistêmicas ou doença sistêmica presentes ao nascimento que podem estar associadas a sinais oculares
◆ Desordens cromossômicos, como Trissomia do 21 (síndrome de Down)
◆ Desordens dos tecidos conectivos
◆ Síndrome de Marfan
◆ Síndrome de Weill-Marchesani
◆ Síndrome de Stickler
◆ Desordens metabólicas
◆ Homocistinúria
◆ Síndrome de Lowe
◆ Mucopolissacaridose
◆ Facomatoses
◆ Neurofibromatose (NF-1, NF-2)
◆ Síndrome de Sturge-Weber
◆ Síndrome de Klippel-Trenaunay-Weber
◆ Rubinstein-Taybi
◆ Rubéola congênita

- **Glaucoma associado à condição adquirida**

- ✓ Reune os critérios de definição de glaucoma após a condição adquirida ser reconhecida (uma condição adquirida é aquela que não é hereditária ou está presente no nascimento);
- ✓ O desenvolvimento do glaucoma após a cirurgia de catarata é excluído desta categoria para destacar sua frequência e diferenças de outras condições na categoria de condição adquirida;
- ✓ Lista de condições comuns adquiridas (Quadro 3);
- ✓ Com base nos resultados da gonioscopia:
 - ◆ Glaucoma de ângulo aberto: > / = 50% aberto; *ou*
 - ◆ Glaucoma com ângulo fechado: < 50% aberto ou fechamento angular agudo.

- Glaucoma após cirurgia de catarata
 - ✓ Reune os critérios de definição de glaucoma somente após a cirurgia de catarata e é subdividida em três categorias:
 - ◆ Catarata congênita idiopática;
 - ◆ Catarata congênita associada a anomalias oculares / doença sistêmica, sem glaucoma prévio;
 - ◆ Catarata adquirida, sem glaucoma prévio.
 - ✓ Com base nos resultados da gonioscopia:
 - ◆ Glaucoma de ângulo aberto: $> / = 50\%$ aberto; *ou*
 - ◆ Glaucoma com ângulo fechado: $< 50\%$ aberto ou fechamento angular agudo.

Quadro 3. Glaucoma associado a condição adquirida⁽¹⁸⁾

◆ Uveíte
◆ Trauma (hifema, recessão angular, <i>ectopia lentis</i>)
◆ Induzido por esteroide
◆ Tumores (benigno/maligno, ocular/orbitário)
◆ Retinopatia da prematuridade
◆ Outra cirurgia ocular prévia que não a cirurgia de catarata

3.3 Conceito e tipos de mutações genéticas

Os segmentos de DNA que codificam proteínas estão organizados em sequência de grupos de três bases (códon), que serão transcritos (mRNA) e, em seguida, traduzidos em uma proteína específica. A cada códon do mRNA corresponde um aminoácido. Os códons de iniciação sinalizam o começo da síntese de uma proteína e os de parada (*stop*) sinalizam o término. O DNA está sujeito a alterações de sua sequência de bases que podem ser dos seguintes tipos: mutações de ponto (ou substituição de base), mutações por inserção ou deleção de nucleotídeos e mutações por elementos transponíveis.

As mutações de ponto (substituição de base) levam à troca de um aminoácido

por outro na cadeia polipeptídica pela substituição de uma única base no DNA. Acredita-se que boa parte das variações genéticas (polimorfismos) entre sujeitos de uma dada população seja devida à mudança de um único nucleotídeo no gene e, por isso, é chamada de SNP (*single nucleotide polymorphism*).

Essas mutações podem ser sinônimas, que são aquelas em que a troca do nucleotídeo mantém o aminoácido produzido, pois alguns aminoácidos são codificados por mais de um códon, ou não-sinônimas, que são aquelas em que a troca do nucleotídeo altera o aminoácido codificado. Quando não provocam mudanças de aminoácidos, as mutações ou substituições são fenotipicamente silenciosas. Entretanto, quando a mutação é não-sinônima, ela pode levar a alteração na estrutura da proteína ou parada prematura da síntese da mesma se for criado um códon de parada ou até alongamento da síntese se um códon de parada tiver sido substituído pelo códon de um aminoácido específico. Em todos esses casos, a proteína resultante é alterada. As bases do mRNA são adenina, guanina, citosina e uracil; enquanto as bases do DNA são adenina, guanina, citosina e timina. Elas podem ser púricas (adenina (A) e guanina (G)) ou pirimídicas (citosina (C), uracil (U) e timina (T)).

Se a consequência de uma mutação na região codificadora de um gene for a substituição de um aminoácido por outro, ela é denominada de mutação com perda de sentido ou de sentido errado (*missense*), como na anemia falciforme. Mas, se a consequência da mutação for a substituição de um nucleotídeo, criando um códon de parada, ou o contrário, a mutação é dita sem sentido (*nonsense*).

Quando um ou mais bases são removidas do DNA, a mutação é por deleção. Entretanto, quando são adicionadas uma ou mais bases, a mutação é por inserção. Além disso, se número de bases adicionadas ou removidas não for múltiplo de três, isso altera completamente a mensagem do gene. Ainda mais, se inserida uma sequência igual a outra, ocorre uma duplicação. Seja por inserção ou deleção de nucleotídeos, a mutação é denominada *indel* (inserção+deleção). Portanto, esse tipo, em que o *indel* de um número de nucleotídeos diferente de três e seus múltiplos, altera completamente o quadro de leitura (*frameshift*), uma vez que a leitura do DNA é em sequência de três em três bases do códon de início até o de parada, sem pontos nem vírgulas.

3.4 Gene *CYP1B1*, herança e mutações

Doença ocular como o glaucoma congênito tem um padrão de herança autossômica recessiva⁽¹²⁾ causada por mutações no gene *CYP1B1*. Um gene é composto de algumas regiões como a promotora, a codificadora (éxons) e as não codificadoras. No caso do gene *CYP1B1*, este está localizado no cromossomo 2p21 (GLC3A) e codifica uma proteína de 543 aminoácidos e é expressado em diversos tecidos humanos, inclusive oculares, como trabeculado, íris e retina^(19,20). Sua estrutura é composta por três éxons⁽²¹⁾. Dentre eles, o éxon 1 é não-codificante e o éxon 2 e o éxon 3 podem sofrer mutações já relacionadas ao glaucoma congênito^(13,19,22). O éxon 3 codifica a porção heme ligante na parte C terminal, a qual é fundamental para a função da proteína *CYP1B1*. Demonstrou-se que as mutações do *CYP1B1* associadas ao glaucoma reduzem a atividade enzimática ou a estabilidade da enzima^(3,23,24). As mutações tipo *frameshift* e *nonsense* truncam a proteína e eliminam a região C terminal, envolvida na ligação do grupamento heme e no dobramento da molécula P450, o que leva a um produto proteico inativo ou em dano grave à função enzimática^(25,26).

Cinco loci estão associados com a doença. O mais importante foi o primeiro, mapeado no cromossomo 2p21 (GLC3A); o segundo, no cromossomo 1p36.2-p36.1 (GLC3B); o terceiro, no cromossomo 14q24.3 (GLC3C); o quarto, no cromossomo 14q24.2-q24.3 (GLC3D). Os dois últimos são adjacentes, mas não se sobrepõem⁽²⁷⁾; e o quinto, no cromossomo 9p21.2 (GLC3E). Estão resumidos no quadro 1. Entretanto, apenas três genes foram identificados como causadores de glaucoma congênito primário: *CYP1B1* (citocromo P450, família 1, subfamília B, polipeptídeo 1) no locus GLC3A, LTBP2 (complexo latente de ligação à proteína do fator de transformação de crescimento beta 2) no locus GLC3D e TEK (receptor da tirosina quinase) no locus GLC3E. Ainda se tenta esclarecer o papel das proteínas codificadas por esses genes na etiologia da doença (Quadro 4)⁽²⁵⁻²⁷⁾.

Quadro 4. Genes associados ao GCP^(25–27).

Localização cromossômica	Fenótipo/ Locus (gene)	Número MIM do fenótipo	Número MIM do gene/ locus	Tipo de glaucoma	Padrão de herança	Referência
1p36.2-p36.1	GLC3B	600975	-	GCP	Recessivo	Sarfarazi et al., 1995 ⁽²⁸⁾ , Akarsu et al., 1996 ⁽²⁹⁾
2p22.2	GLC3A (<i>CYP1B1</i>)	231300	601771	GCP, GJ, GPAA	Recessivo	Sarfarazi et al., 1995 ⁽²⁸⁾ , López-Garrido et al., 2006 ⁽³⁰⁾
14q24.3	GLC3C	613085	-	GCP	-	Stoilov and Sarfarazi, 2002 ⁽³¹⁾
14q24.2-q24.3	GLC3D (LTBP2)	613086	602091	GCP	-	Firasat et al., 2008 ⁽³²⁾
9p21.2	GLC3E (TEK)	617272	600221	GCP	Autossômica dominante	Souma et al., 2016 ⁽³³⁾

É membro da superfamília do citocromo P450 de enzimas metabolizadoras de drogas, que provavelmente participam do desenvolvimento normal do segmento anterior do olho, talvez por meio do metabolismo de esteroides⁽²⁰⁾. A regulação do fechamento da fissura ocular pelo *CYP1B1* (a diminuição da expressão causa fechamento prematuro, enquanto a superexpressão resulta em coloboma) afeta indiretamente a migração e o desenvolvimento da crista neural através de uma via independente do ácido retinóico; este mecanismo pode contribuir para alterar a migração de células da crista neural destinadas à malha trabecular de entrarem no segmento anterior do olho; portanto, estudos sobre esse mecanismo fornecem informações sobre o papel do *CYP1B1* no desenvolvimento do olho e elucidam ainda mais a patogênese do glaucoma primário infantil⁽³⁴⁾.

Apesar de diferentes loci já terem sido mapeados para GCP, mutações no *CYP1B1* (GLC3A) são as mais predominantes causadoras da doença e já foram descritas em diferentes etnias^(35–44). Mais de 140 diferentes mutações relacionadas ao gene *CYP1B1* e ligadas ao GCP já foram reportadas^(45,46).

O gene *CYP1B1* já tem sido analisado em pacientes portadores de glaucoma congênito no Brasil⁽¹⁴⁾; no entanto, ainda se procura desvendar as correlações genótipo-fenótipo pertencentes às mutações do *CYP1B1* que ajudariam no entendimento do curso clínico da doença para um melhor prognóstico⁽¹⁵⁾.

No Brasil, Stoilov et al., estudaram o gene *CYP1B1* gene de 52 pacientes com GCP e detectaram 11 diferentes mutações em 26 indivíduos (50%). Dentre elas, a mais frequente foi 4340delG (20,2%), cujos portadores tiveram início mais precoce da doença, bilateralidade e necessidade de múltiplas intervenções⁽³⁸⁾.

3.5 Fisiopatologia do glaucoma congênito primário

O globo ocular é usualmente grande como resultado do aumento da pressão intraocular durante a vida intrauterina, daí o termo bupftalmo (olho de boi). Relata-se que no final da gestação ocorre normalmente uma reabsorção do tecido mesodérmico (ligamento pectíneo) que preenche a região do ângulo da câmara anterior e, caso isso não ocorra no devido momento, ocorrerá obstrução da drenagem do humor aquoso, levando ao aumento da PIO e desenvolvimento do GCP. O canal de Schlemm está presente e se comunica normalmente com as veias, como é provado pelo preenchimento demonstrável com sangue quando as veias jugulares são comprimidas. Acredita-se que o defeito envolva a permeabilidade do trabeculado ao humor aquoso⁽⁷⁾.

3.6 Quadro clínico do glaucoma congênito primário

Os sinais da doença incluem início precoce (antes dos três anos de idade), pressão intraocular elevada, diâmetro corneano aumentado, globo ocular alargado, estrias de Haab (ruptura na membrana de Descemet), edema corneano e escavação da cabeça do nervo óptico e/ou assimetria da relação escavação/disco $> 0,2$, como também blefaroespasmos, epífora e fotofobia^(7,47).

3.7 Investigação da doença

A investigação da doença pode ser feita por teste de triagem como o teste do reflexo vermelho, conhecido como teste do olhinho. Esse exame deve ser realizado ainda na maternidade em todos os recém-nascidos, a fim de detectar qualquer doença que cause opacidades como glaucoma congênito e catarata congênita, além de tumores intraoculares e hemorragias vítreas. Portanto, a triagem oftalmológica possibilita a detecção precoce de doenças e, conseqüentemente, a prevenção da

cegueira infantil, o que é de grande relevância do ponto de vista de saúde pública⁽⁴⁸⁾.

3.8 Tratamento

O tratamento do glaucoma congênito primário é essencialmente cirúrgico. O oftalmologista pode prescrever colírios para diminuir a PIO, mas de modo adjuvante pré-operatório ou para maximizar o resultado da diminuição da PIO no pós-operatório⁽⁴⁹⁾. A goniotomia é o procedimento de escolha sempre que o grau de transparência da córnea permita realizá-la. A trabeculotomia, por sua vez, é indicada quando a visão do seio camerular está prejudicada. Alternativas cirúrgicas são a trabeculectomia com a aplicação de mitomicina C, dispositivos artificiais de drenagem do humor aquoso e procedimentos ciclodestrutivos. Todavia, até mesmo quando a PIO está bem controlada, um número significativo de crianças nunca alcançam boa visão⁽⁵⁰⁾.

3.9 Correlações entre mutações do gene *CYP1B1* e o fenótipo do GCP

O gene *CYP1B1* já tem sido analisado em pacientes portadores de glaucoma congênito no Brasil⁽¹⁴⁾; no entanto, ainda se procura desvendar as correlações genótipo-fenótipo pertencentes às mutações do *CYP1B1* que ajudariam no entendimento do curso clínico da doença para um melhor prognóstico⁽¹⁵⁾.

Em 2003, Ohtake et al.⁽⁵¹⁾ estudaram 66 pacientes japoneses (65 famílias) com GCP. Foram verificadas no início da doença as características clínicas de forma retrospectiva em 32 casos ao se examinar os prontuários em cada um dos cinco hospitais em que a pesquisa foi realizada. Os 32 casos foram divididos em 2 grupos: um grupo com mutação (11 pacientes com mutação em ambos os alelos) e outro grupo sem mutação (21 pacientes). No grupo com mutação, houve 6 pacientes do sexo masculino e 5 do feminino, além de 10 casos de bilateralidade e 1 de unilateralidade, e também de uma idade média de início da doença de 1,7 meses (0-11); enquanto no grupo sem mutação, houve 19 pacientes do sexo masculino e 2 do feminino, além de 17 casos de bilateralidade e 4 de unilateralidade, e também de uma idade média de início da doença de 3,1 meses (0-8). Encontrou-se opacidade de córnea em 55 dos 59 olhos analisados (93,22%) e ruptura de membrana de Descemet em 24 dos 59 olhos estudados (40,68%). Não houve nenhum caso de

consanguinidade parental. As mutações descritas foram 8 (4776insAT, C4645A, 3964delC, G7927A, A4380T, G4793T, C4794T e C3130T). Neste trabalho, os autores citaram no resumo ter avaliado 11 casos com mutação e 21 sem mutação, mas na discussão citaram ter avaliado 11 casos com mutação e 23 sem mutação, o que leva a dúvidas sobre os dados e resultados apresentados.

Em 2009, Weisschuh et al.⁽⁵²⁾, estudaram 39 pacientes alemães com GCP não-relacionados e encontraram 18% com mutação. Foram 58,97% do sexo masculino e 41,03% do feminino. A idade média dos pacientes foi de 37,5 ± 16,5 anos. De 78 olhos, 7 foram enucleados em virtude de PIO incontrolável. As mutações descritas foram 11, sendo 4 novas (c.199_296delGGCCAGGC, L177P, F190L, S282N) e outras 7 já descritas anteriormente (W57X, c.1035_1037delCTC, G61E, V364M, E387K, R390H, R390C) e 6 polimorfismos de nucleotídeo único (g.3793T > C, R48G, A119S, V432L, D449D, N453S). A conclusão foi de que o resultado visual foi pobre independente da presença ou ausência de mutação (31,58% dos olhos tiveram acuidade visual pior que 20/400) e não houve diferenças significativas entre os achados clínicos dos casos com e sem mutação. Além disso, os autores acrescentaram que o conhecimento sobre a genética do GCP está longe de completa e permanece um desafio para pesquisas futuras.

Em 2009, Tanwar et al.⁽⁵³⁾, estudaram 23 pacientes indianos com GCP não-relacionados e encontraram 39,13% de pacientes estudados com mutação. Foram 73,91% do sexo masculino e 26,09% do feminino. As mutações descritas foram 4 novas (p.I94X, p.H279D, p.Q340H, p.K433K), outras 5 já descritas anteriormente (p.E229K, p.A355X, p.R368H, p.R390C, p.R390H) e 5 polimorfismos de nucleotídeo único (p.R48G, p.A119S, p.L432V, p.D449D, p.N453S). Buftalmia foi descrita em 100% dos pacientes, sendo pior em 21,74% no olho direito e 56,52% no olho esquerdo. Estrias de Haab foram encontradas em 13,04% dos pacientes. Não se conseguiu determinar a relação escavação/disco em 43,48% dos olhos. Tratamento clínico e cirúrgico (trabeculotomia combinada com trabeculectomia com mitomicina C) foi realizado em 100% dos olhos, tendo 4,35% dos olhos submetidos também à cirurgia de catarata. A conclusão foi de que a idade de início não interferiu na gravidade da doença comparando-se os com e sem mutação. O fenótipo da doença dos pacientes com mutações foi mais severo.

Em 2009, Campos-Mollo et al.⁽³⁾, estudaram 39 pacientes espanhóis de 38 probandos com GCP não-relacionados. Foram 72% do sexo masculino e 28% do

feminino. Bilateralidade foi encontrada em 77% dos pacientes. O diâmetro corneano horizontal foi de 12 a 15mm com média de $13,25 \pm 0,9$ mm. O tamanho da relação escavação/disco médio foi de $0,36 \pm 1,2$. Foram necessárias mais uma cirurgia em 60,8% dos olhos. As 16 mutações descritas foram encontradas em 13 (38,4%) de 38 casos-índice não-relacionados, das quais 6 foram novas (A106D, E173X, F261L, E262X, W341X, P513_K514del) e outras 10 já descritas anteriormente (p.G61E, p.T404fsX30, p.390S, p.A179fsX18s, p.355fsX69, p.P52L, p.Y81N, p.R469W, p.P400S, p.P437L). A conclusão foi de que os dados indicam que os genótipos nulos carregam um fenótipo mais severo, mas vale salientar que nenhum parâmetro clínico obteve significância estatística.

Em 2010, Della Paolera et al.⁽⁵⁴⁾, estudaram 30 pacientes brasileiros do estado de São Paulo com GCP não-relacionados e encontraram 30% de pacientes estudados com mutação. Foram 53,33% do sexo masculino e 46,67% do feminino. Não foi reportado casamento consanguíneo. As mutações descritas foram 4 novas (4635delT, 4523delC, L378Q), outras 7 já descritas anteriormente (Q19X, P437L, A443G, g.4340delG, g.7901_79013delGAGTGCAGGCAGA, g.8182delG, e g.8214_8215delG) e 5 polimorfismos de nucleotídeo único (3793T→C, R48G, A119S, L432V, D449D e N453S). A conclusão foi de que os resultados das mutações podem refletir o grau de miscigenação da população brasileira com GCP e que, na presença de mutações, o glaucoma foi associado a um pior prognóstico, tanto em relação ao número de cirurgias realizadas para controle da PIO (quer quando ambos os olhos foram avaliados ($p = 0,003$) ou quando o olho pior do paciente foi analisado ($p = 0,011$), quanto ao número de olhos afetados (com mutações ($n = 9/9$) desenvolveram glaucoma bilateral, enquanto 11/21 pacientes sem mutações no gene *CYP1B1* tiveram glaucoma bilateral ($p = 0,013$)). Os autores acrescentam que a avaliação do núcleo familiar sugeriu um padrão de herança autossômica recessiva, mas que não foi possível excluir a presença de mutações *de novo* e a participação de outros genes.

Em 2011, Abu-Amero et al.⁽⁵⁵⁾, estudaram 54 famílias sauditas não-relacionadas (74 pacientes) com GCP. Foram 51,35% do sexo masculino (38 pacientes) e 48,65% do feminino (36 pacientes). Consanguinidade foi um fator em 37 das 54 famílias (68,5%). Bilateralidade foi encontrada em 20 (37%) das famílias estudadas. Mutações foram encontradas em mais de 75% dos pacientes. Na última visita de pós-operatório, o diâmetro corneano (com desvio-padrão) foi de 12,45 ($\pm 1,1$) nos casos com mutação e de 12,85 ($\pm 1,1$) nos casos sem mutação com um p-valor

de 0,264; enquanto isso, o grau de opacidade foi de 0,49 (\pm 0,9 DP) e 0,00 (0), respectivamente, com um p-valor de 0,025; além disso, o número de medicações em uso foi de 0,59 (\pm 0,9) e de 0,00 (0) com p-valor de 0,015. Especificamente, os pacientes com a mutação g.3987 G > A tiveram um grau de opacidade de córnea⁽⁵⁶⁾ significativamente maior ($p = 0,027$) que os sem nenhuma mutação, mas uma relação escavação/disco insignificante ($p = 0,518$). As mutações descritas foram 2 novas (G466S e D441G), outras 9 já descritas anteriormente (G61E, R390H, P437L, G466D, R468W, g.4238_4247del, g.7901_79013del, R355X e R444X) e 2 polimorfismos de nucleotídeo único (A119S, A443G). A conclusão foi de que a presença de mutações se refletem, em termos de pós-operatório, em maior número de visitas, em maior opacidade de córnea e maior necessidade de medicações antiglaucomatosas. Além disso, os autores acrescentam que testes genéticos para pacientes suspeitos de GCP seriam benéficos e que esses testes, para famílias com história de GCP, poderiam dar um senso de alívio da incerteza e ajudar às pessoas a tomar decisões informadas sobre sua saúde.

Em 2012, Suh e Kee⁽⁵⁷⁾, estudaram 85 pacientes não-relacionados com diagnóstico de GCP e suas famílias na Coreia do Sul, recrutados de sete hospitais. Não houve consanguinidade encontrada. Foram divididos em dois grupos (com e sem mutação) e comparadas as características clínicas, incluindo idade de início da doença, lateralidade, gênero e severidade já utilizada em estudo anterior⁽³⁹⁾ (este índice foi baseado nos parâmetros diâmetro corneano, PIO, relação escavação/disco e transparência corneana e foi dividido em normal, moderada e severa/muito severa). Não houve predominância de sexo: 54,2% do sexo masculino (46 pacientes) e 45,8% do feminino (39 pacientes). A proporção de idade no início da doença, lateralidade, índice de severidade severo/muito severo e sexo feminino foram mais frequentes no grupo com mutações, mas não houve diferença clinicamente significativa ao comparar com o grupo sem mutações. A acuidade visual final não teve associação significativa com mutações no gene *CYP1B1*. As mutações foram 9 e descritas em 25,88%, sendo elas: T325SfsX104, V364M, G329S, Y81X, A330F, V419GfsX11, V320L, R444Q e R390H. A conclusão mostrou que não houve correlação consistente observada entre as manifestações iniciais e o genótipo *CYP1B1*. Entretanto, a resposta ao tratamento foi associada com os alelos mutantes do *CYP1B1*.

Em 2013, López-Garrido et al.⁽²⁶⁾, estudaram 161 probandos espanhóis diagnosticados com GCP. Foram avaliadas a atividade enzimática das mutações do

gene *CYP1B1* e o diagnóstico do GCP foi baseado em exame clínico. Encontraram-se 31 diferentes mutações em 56 casos-índice de GCP, das quais 3 eram novas (337G>T, F123L e I399_P400del). O número médio de trabeculectomias por olho foi significativamente maior nos carreadores de mutações. Seus dados revelaram que o sequenciamento dos três éxons foi requerido para um diagnóstico molecular da doença. Ao se examinar cuidadosamente os indivíduos com padrão não-penetrante, sugeriu-se que os genótipos *CYP1B1* exibem expressividade variável mais que não-penetrância. Além disso, a relação genótipo-fenótipo claramente mostrou que o genótipo influencia a severidade clínica da doença por alterar os níveis de atividade enzimática.

Em 2013, Chen et al.⁽⁵⁸⁾, estudaram 238 pacientes chineses, sendo 116 já descritos previamente. Nos 122 pacientes, foram encontradas 18 diferentes mutações em 21 pacientes, sendo 9 novas (g.T3836C, g.4022delTC, g.G4151T, g.G4322A, g.T4338A, g.G4493A, g.T4509C, g.T8137C e g.C8167T) e outras 9 já descritas anteriormente. Os autores afirmam que seus dados suportam a ideia de que a opacidade corneana responde pela severidade da doença e que uma maior opacidade está associada a um melhor resultado cirúrgico, possivelmente por ser detectado mais precocemente pelos parentes e encaminhado para tratamento cirúrgico também de modo mais precoce. Além disso, a presença de estrias de Haab (encontrada em 32,0%) pode ser usada como fator de risco adicional na graduação da transparência corneana. A conclusão foi de que a combinação de escore de opacidade corneana e genótipo do *CYP1B1* podem predizer o resultado cirúrgico em termos de controle da PIO no pós-operatório.

Em 2014, Al-Haddad et al.⁽⁵⁹⁾, estudaram 18 famílias libanesas (66 pessoas) com pelo menos 1 paciente com GCP (18 pacientes). Foram 50% do sexo masculino (9 pacientes) e 50% do feminino (9 pacientes). Consanguinidade foi um fator em 9 das 18 famílias (50%). Bilateralidade foi encontrada em 8 (44,44%) dos pacientes. Mutações foram encontradas em 6 (33,3%) dos pacientes. Mutações foram mais comuns no grupo com consanguinidade ($p = 0,44$). A idade no início da doença variou de 2 dias a 18 meses (mediana 1,5 meses). A doença foi diagnosticada no período neonatal em 7 de 18 pacientes (39%). Edema corneano severo e bftalmo estavam presentes em 8 de 18 pacientes (44%). O diâmetro corneano horizontal, medido sob anestesia geral, variou de 9 a 15 mm com uma média de $13,3 \pm 1,3$ mm. As mutações descritas foram 1 nova (1793delC) e outras 5 já descritas anteriormente (p.E229K,

p.R444Q, p.G61E, p.R469W, p.M1T). Nesse estudo de coorte, os pacientes com mutações no gene *CYP1B1* identificadas pareceram ter um fenótipo mais severo com início da doença em idade mais precoce quando comparada com outras populações^(51,60). Outras diferenças também foram percebidas, mas não alcançaram significância estatística por conta do pequeno tamanho amostral: apresentação da doença mais severa (bftalmo e edema corneano), maior taxa de consanguinidade, história familiar positiva, maior envolvimento bilateral e maior número de cirurgias. Entretanto, o resultado visual final, a relação escavação/disco e os níveis de PIO foram semelhantes entre os grupos.

Em 2015, Berraho et al.⁽⁶¹⁾, publicaram um estudo com 94 pacientes de 84 famílias marroquinas não-relacionadas. Consanguinidade foi encontrada em 45 das 84 famílias estudadas (53,60%). Foram 53 indivíduos do sexo masculino (56,4%) e 41 do feminino (43,6%). A doença foi bilateral em 86 pacientes (91,5%). O diâmetro corneano variou de 11 a 18 mm com média de $14,08 \pm 0,14$ mm. A média da relação escavação/disco foi de $0,59 \pm 0,22$ (0,1 a 1,0). Opacidades corneanas severas estavam presentes em 65,2% dos olhos. Precisaram mais de uma cirurgia 24,5% dos olhos. Os resultados mostraram média de PIO, diâmetro corneano e número de cirurgias e taxas de relação escavação/disco, e porcentagens de pacientes com GCP bilateral, olhos com opacidades severas e fenótipo severo significativamente maior no grupo com mutação.

Em 2015, De Melo et al.⁽¹⁵⁾, estudaram 901 pacientes de dois grandes coortes da Índia (301 pacientes e 300 controles) e Brasil (150 pacientes e 150 controles). As mutações mais prevalentes foram R368H (na Índia) e 4340delG (no Brasil). As mutações encontradas em comum nos coortes foram: R368H, P437L, A443G, S476P, 8037_8046dup10 e 9214_8215delAG. Concluiu-se a ausência de correlação genótipo-fenótipo no início da doença do GCP dos traços demográficos e clínicos com mutações do *CYP1B1*.

Em 2015, Cardoso et al.⁽⁶²⁾, estudaram 21 pacientes portugueses com GCP. Foram 66,7% do sexo masculino (14 pacientes) e 33,3% do feminino (7 pacientes). Bilateralidade foi encontrada em 13 (61,9%) dos pacientes e foram mais comuns no grupo com mutação (100%) quando comparado ao grupo sem mutação (46,67%). Mutações foram encontradas em 6 (28,57%) dos pacientes. A idade no início da doença foi mais precoce no grupo com mutação ($0,0 \pm 0,00$ versus $4,5 \pm 2,63$ meses, $p < 0,01$), o que já foi mostrado em outros estudos^(51,60). As outras variáveis estudadas

(idade na primeira cirurgia, PIO e diâmetro corneano no pós-operatório, acuidade visual final, número de reintervenções cirúrgicas e medicações antiglaucomatosas necessárias no pós-operatório) não tiveram diferenças estatísticas significantes com $p > 0,05$ para todas as comparações. As mutações descritas foram 7, sendo 2 novas (c.317C > A e c.1390dupT) e outras 5 já descritas anteriormente (c.182G > A, c.1159G > A, c.1310C > T, c.535delG e c.1064_1076del)⁽³⁾. A maior limitação desse estudo foi o tamanho da amostra.

Em 2016, Yazdani et al.⁽⁶³⁾, estudaram 17 pacientes iranianos (32 olhos) com GCP. Os pacientes com mutação foram comparados aos sem mutação em termos de idade de início da doença, PIO, diâmetro corneano e relação escavação/disco no exame inicial e o número de procedimentos antiglaucomatosos. Foram 58,82% do sexo masculino (10 pacientes) e 41,18% do feminino (7 pacientes). Consanguinidade foi encontrada em 47% dos participantes. Bilateralidade foi encontrada em 100% dos pacientes, sendo a doença assimétrica em 11,76% dos casos. A idade no início da doença foi mais precoce no grupo com mutação ($0,20 \pm 0,28$ versus $2,46 \pm 2,03$ meses, $p < 0,026$). O diâmetro corneano médio foi de 12,84 mm, a relação vertical escavação/disco foi de 0,57 e o número médio de procedimentos cirúrgicos foi de 2,75. Essas e outras variáveis estudadas (idade na primeira cirurgia, PIO e diâmetro corneano no pós-operatório, acuidade visual final, número de reintervenções cirúrgicas e medicações antiglaucomatosas necessárias no pós-operatório) não tiveram diferenças estatísticas significantes com $p > 0,05$ para todas as comparações. Foram encontradas 8 diferentes mutações em 10 dos 17 pacientes (58,82%), sendo as mutações mais comuns Gly61Glu e Arg390His; as outras foram Tyr81X, Glu229Lys, Pro289Fs, Gly329Val, Arg368Cys e Val397Fs. As conclusões deste estudo foram de que os pacientes com mutações parecem ter início mais precoce, apresentam quadro clínico mais severo e necessitam de mais cirurgias quando comparados aos sem mutações. A maior limitação desse estudo foi o tamanho da amostra.



4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 Local e população do estudo

A população deste estudo foi composta por pacientes em atendimento ambulatorial na Fundação Altino Ventura diagnosticados com glaucoma congênito primário.

4.2 Delineamento do estudo

Estudo tipo série de casos em uma população de pacientes diagnosticados com glaucoma congênito primário. Todos os dados foram colhidos e registrados em prontuário eletrônico.

4.3 Período e amostra do estudo

Os pacientes foram avaliados no período de dezembro de 2016 a fevereiro de 2017. A amostra do estudo foi de 17 pacientes, totalizando 30 olhos, em virtude de 4 olhos terem sido eviscerados anteriormente à pesquisa.

4.4. Seleção dos pacientes

Os pacientes diagnosticados com glaucoma congênito primário foram selecionados para o estudo na Fundação Altino Ventura.

4.4.1 Critérios de inclusão

Portadores de glaucoma congênito primário;

1. Pacientes atendidos nos ambulatórios de Oftalmologia da Fundação Altino Ventura;
2. Qualquer faixa etária;
3. Ambos os sexos.

4.4.2 Critéri

os de exclusão

- ◆ Indivíduos com outras doenças oftalmológicas e/ou sistêmicas que pudessem estar associadas a glaucoma congênito.

4.5 Caracterização da amostra

Segundo os critérios de inclusão, os participantes da pesquisa foram selecionados por ocasião do atendimento ambulatorial e/ou da avaliação durante consulta oftalmológica na Fundação Altino Ventura.

As seguintes etapas foram seguidas após a identificação dos sujeitos do estudo:

- ◆ Assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido pelo paciente e/ou responsável;
- ◆ Preenchimento de formulário para registro de dados clínicos e epidemiológicos pelos pesquisadores responsáveis;
- ◆ Realização dos exames oftalmológicos especializados;
- ◆ Agendamento e realização de exame sob sedação no bloco cirúrgico para o paciente em que não foi possível o exame oftalmológico ambulatorial;
- ◆ Coleta de uma amostra de 10 mL de sangue dos pacientes selecionados para realização dos exames relacionados à pesquisa.

4.6 Procedimentos

4.6.1 Procedimentos técnicos

No exame oftalmológico, foi feita a medida da acuidade visual com a melhor correção, biomicroscopia e fundoscopia para avaliação da relação escavação/disco, medida da pressão intraocular com tonômetro de Goldmann, paquimetria corneana com paquímetro DGH4000B (DGH Technology, Inc., Exton, PA, USA) e medida do diâmetro corneano horizontal foi realizada com uso de compasso para todos pacientes

examinados no ambulatório. No caso do paciente examinado sob sedação, a mesma avaliação foi realizada, exceto por não ter sido medida a acuidade visual e, para minimizar os efeitos do agente anestésico, na ocasião do exame sob sedação, a tonometria ter sido realizada com tonômetro portátil de Perkins (Haag-Streit) dentro dos primeiros cinco minutos da indução anestésica.

Após a coleta da amostra de sangue, o material foi imediatamente armazenado em tubos de vácuo estéreis, contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), mantido em temperatura ambiente e levado e armazenado em um banco de amostras do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA - UFPE), onde foi extraído o DNA de forma automatizada. Após essa fase, as amostras foram encaminhadas ao Genomika para sequenciamento genético.

4.6.1.1 Coleta e armazenamento das amostras

Foram coletados 10 mL de sangue periférico em tubos contendo EDTA de cada um dos 17 participantes da pesquisa. A coleta ocorreu no dia da consulta na FAV e os pacientes foram identificadas pelos códigos RC 01 até RC 17. As amostras coletadas foram enviadas, em caixa de isopor com gelo, para congelamento à temperatura de -80°C no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), e foram descongeladas apenas no momento do processamento e análise.

4.6.1.2 Extração automatizada de DNA

A extração automatizada do DNA foi realizada com QIASymphony DNA Mini Kit (Qiagen) no QIASymphony SP automated system (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. A concentração do DNA eluído foi avaliada em NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™) e posteriormente armazenado a -20°C até a realização do sequenciamento. A concentração e a qualidade das amostras estão descritas na Quadro 5. Os ácidos nucleicos absorvem luz no comprimento de onda de 260 nm, enquanto as proteínas absorvem luz no comprimento de onda de 280 nm. Desta forma, a relação A260/A280 fornece um parâmetro de avaliação da qualidade das preparações de ácidos nucleicos. Valores inferiores a 1,8 resultam de contaminação com proteína.

Quadro 5. Concentração e qualidade das amostras de DNA

Concentração das amostras do DNA		
Participante	ng/mL	Fator de qualidade
RC 01	121,1	1,85
RC 02	73,7	1,84
RC 03	98,8	1,85
RC 04	93,2	1,85
RC 05	80,8	1,85
RC 06	86,6	1,85
RC 07	83,2	1,85
RC 08	62,7	1,84
RC 09	72,1	1,85
RC 10	48,8	1,88
RC 11	101,3	1,85
RC 12	92,6	1,86
RC 13	67,5	1,85
RC 14	73,7	1,86
RC 15	80,3	1,84
RC 16	108,3	1,84
RC 17	74,3	1,83

Fonte: autor

Após essa fase, as amostras de DNA extraído foram encaminhadas ao laboratório Genomika, onde foram submetidas ao sequenciamento genético.

4.6.1.3 Análise das amostras/Sequenciamento do gene CYP1B1

O DNA extraído foi submetido ao processo de amplificação por meio técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com o reagente GoTaq Green Master Mix 2X (Promega, Madison, WI) de acordo com as especificações do fornecedor. O procedimento de amplificação consiste em ciclos de 3 fases: desnaturação do DNA, hibridação dos iniciadores específicos para a região alvo e a extensão pela Taq polimerase. Estes ciclos foram repetidos 30 vezes em cada reação de amplificação. Para isso foram utilizados 3 pares de primers, referentes aos 2 éxons do gene CYP1B1. Foram amplificados todas as regiões codificadoras e pelo menos 40 pares de bases de regiões intrônicas flanqueando os éxons.

Após a confirmação do sucesso da amplificação em gel de agarose a 1%, as regiões de interesse de cada paciente foram misturadas em um único tubo (realização de um pool) e quantificadas no equipamento Qubit 2.0. Cada *pool* (grupo) de pacientes diferentes foram preparados para o sequenciamento de segunda geração utilizando Nextera XT DNA Library Prep Kit (Illumina), que funciona a partir do produto de PCR por tagmentação (marcação) e adição de adaptadores de acordo com o protocolo fornecido pela fabricante. O sequenciamento de segunda geração, também conhecido por Next Generation Sequencing (NGS), no equipamento Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, USA), utiliza a tecnologia de sequenciamento década amplicon por síntese em um kit MiSeq Reagent Kit V2 (composto por enzima, dNTPs, ddNTPs marcados com fluorescência e tampões), conforme protocolo e programas recomendados pelo fabricante. Esta técnica é capaz de amplificar centenas de milhares de vezes fragmentos de DNA de diferentes indivíduos simultaneamente através de nucleotídeos marcados com fluorescência e lidos por um microscópio de alta precisão. Após o resultado ser adquirido pelo equipamento, os dados brutos são processados por ferramentas específicas de bioinformática gerando arquivos individuais por pool de paciente. A utilização de controles de qualidade interno e externo assegura que todas as etapas, desde a preparação da amostra até a análise para a liberação, geraram resultados confiáveis. As sequências produzidas foram processadas por uma equipe de bioinformática e transformada em dados analisáveis.

4.7 Procedimentos analíticos

Os dados foram coletados e organizados em uma planilha no programa Microsoft Excel 2010. Os resultados das variáveis categóricas foram apresentados em forma de tabela com suas respectivas frequências absoluta e relativa. As variáveis quantitativas foram representadas por suas médias (medida de tendência central) e desvios-padrão (medida de dispersão). Para verificação da existência de associação das variáveis categóricas, foi utilizado o Teste Exato de Fisher e a para o cálculo das variáveis quantitativas para comparação entre dois grupos foi utilizado o teste de Mann-Whitney. A significância estatística foi considerada admitindo-se como índice de confiança 95% em todos os casos ($p < 0,05$) para rejeição da hipótese de nulidade.

4.7.1 Cálculo do tamanho da amostra

Não houve cálculo do tamanho amostral tendo em vista que a amostra foi de conveniência, sendo composta por 17 pacientes que satisfizeram os critérios de inclusão.

4.7.2 Expressão das variáveis

As variáveis quantitativas estudadas foram a idade na consulta, a idade no diagnóstico, o número de medicações antiglaucomatosas em uso, a pressão intraocular (aferida com tonômetro de Goldmann para 16 participantes da pesquisa e para 1 participante com tonômetro portátil de Perkins (Haag-Streit) cujo exame foi realizado sob sedação, dentro dos primeiros cinco minutos após a indução anestésica para minimizar os efeitos do agente anestésico), a paquimetria corneana, o diâmetro corneano horizontal e a relação escavação/disco. Também foram estudadas a presença de cegueira e as principais características encontradas na biomicroscopia: trabeculectomia, buftalmo, opacidade de córnea, estrias de Haab, presença de tubo de Ahmed e catarata, dentre outras. As variáveis quantitativas referentes a características clínicas foram estudadas para o olho direito e para o olho esquerdo.

As variáveis qualitativas ou categóricas estudadas foram o sexo, a presença de parentesco entre os pais (consanguinidade parental), a lateralidade e o número de cirurgias, que foi uma variável categorizada em dois grupos: até 1 cirurgia e 2 ou mais cirurgias em virtude de a maioria dos pacientes não dispor de informação precisa deste número por meio de entrevista e de dados analisados do histórico médico no prontuário. Também foram analisadas a presença de mutações e a de SNPs.

Com o objetivo de caracterizar a população estudada, apresentamos as frequências relativas (percentuais) e absolutas (n) da variável qualitativa.

4.7.3 Testes estatísticos utilizados

Para análise dos dados foi construído um banco de dados com informações de 17 pacientes com diagnóstico de glaucoma congênito primário (APÊNDICE B). Os dados foram analisados através do pacote estatístico do programa para Windows

Statistical Package for the Social Sciences versão 13.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, EUA).

4.7.4 Força da verdade

Foram adotados os seguintes parâmetros: foi utilizada uma força da verdade de 95% ($p = 0.05$).

4.8 Procedimentos éticos

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/UFPE), conforme parecer Consubstanciado número 1.783.121 no dia 20 de outubro de 2016 (ANEXO B), bem como foi autorizada por Carta de Anuência da Coordenação da Fundação Altino Ventura.

Os participantes foram convidados a participar do estudo, e a inclusão do mesmo somente foi permitida, a partir da assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE C).

Este trabalho não adicionou riscos ao paciente em virtude de se coletar uma amostra de sangue de apenas 10 mL.



5 RESULTADOS

Dezessete pacientes com glaucoma congênito primário foram selecionados. As características da população estudada estão demonstradas na tabela 1.

Tabela 1. Perfil amostral da população estudada

Variáveis	n	%
Sexo		
Feminino	8	47,1
Masculino	9	52,9
Parentesco entre os pais		
Sim	5	29,4
Não	12	70,6
Lateralidade		
Unilateral	2	11,8
Bilateral	15	88,2
Número de cirurgias OD		
Até 1	7	41,2
2 ou mais	10	58,8
Número de cirurgias OE		
Até 1	9	52,9
2 ou mais	8	47,1
	Média ± DP	Mínimo – Máximo
Idade (anos)	27,7 ± 11,4	2,7 – 48,5
Idade no diagnóstico (anos)	0,5 ± 2,2	0,0 – 9,0
Número de medicações em uso	2,7 ± 1,3	0,0 – 4,0
PIO OD (mmHg)	18,3 ± 8,7	6,0 – 40,0
PIO OE (mmHg)	15,9 ± 11,6	4,0 – 48,0
Paquimetria OD (µm)	578,6 ± 100,2	436,0 – 857,0
Paquimetria OE (µm)	551,3 ± 106,5	454,0 – 831,0
DCH OD (mm)	13,9 ± 1,3	12,0 – 16,0
DCH OE (mm)	14,2 ± 1,6	12,0 – 16,0
Relação escavação/ disco OD	0,7 ± 0,3	0,3 – 1,0
Relação escavação/ disco OE	0,8 ± 0,3	0,2 – 1,0

DP= desvio padrão; N= número de pacientes; OD=olho direito; OE=olho esquerdo; PIO=pressão intraocular; DCH=Diâmetro corneano horizontal

Quanto à idade de início da doença, isto é, quando ela foi diagnosticada, encontramos 16 (94,12%) pacientes até completar os 3 anos de idade (todos esses ao nascimento) e um (5,88%) paciente após os 3 anos.

Quanto ao uso de medicação antiglaucomatosa, 15 (88,23%) indivíduos faziam uso. Nenhuma medicação era usada por 2 (11,77%) participantes, 1 medicação por nenhum participante, 2 medicações por 4 (23,53%) participantes, 3 medicações por 6 (35,29%) participantes, 4 medicações por 5 (29,41%) participantes. Não se determinou quais medicações eram usadas no olho direito e quais no olho esquerdo por falta de informação precisa.

Quanto ao número de cirurgias para controle da PIO, 16 (94,12%) pacientes tiveram cirurgia ocular, mas 1 (5,88%) não teve. Não se determinou o número exato de cirurgias em todos os participantes por falta de informação precisa tanto no prontuário quanto obtida do paciente e/ou do acompanhante presente na avaliação.

A cegueira foi diagnosticada em pelo menos um olho em 14 (87,50%) de 16 pacientes em quem essa variável foi avaliada. Ao se categorizar, a acuidade visual com correção: até 20/70 (deficiência visual leve ou sem deficiência) que foi descrita em 4 olhos direitos e em 2 olhos esquerdos; pior que 20/70 até 20/200 (deficiência visual moderada) que foi descrita em 4 olhos direitos e em 1 olho esquerdo; pior que 20/200 até 20/400 (deficiência visual grave) que não foi descrita em nenhum olho direito e em 2 olhos esquerdos; pior que 20/400 (cegueira) que foi descrita em 8 olhos direitos e em 11 olhos esquerdos; observação: em 2 olhos (1 participante), não foi avaliada pois o exame foi sob sedação.

As principais alterações encontradas na biomicroscopia foram descritas depois de examinados 17 olhos direitos e 13 olhos esquerdos, pois 4 olhos esquerdos tinham sido eviscerados, mas cujas razões não foram determinadas. Em relação à córnea, a mesma foi considerada transparente em 10 olhos direitos e em 9 olhos esquerdos e com opacidade em 7 olhos direitos e em 4 olhos esquerdos; além disso, foram encontrados bupftalmo em 4 olhos direitos e em 4 olhos esquerdos e estrias de Haab em 3 olhos direitos e em 6 olhos esquerdos.

A média da relação escavação/disco foi 0,7-0,8.

A doença foi bilateral em 15 (88,2%) pacientes e unilateral em 2 (11,8%), sendo 1 no olho direito e 1 no olho esquerdo.

O diâmetro corneano horizontal foi em média 14,05 mm (variando de 12 a 16 mm). Para o olho direito foi em média de 13,9 mm e para o olho esquerdo foi em média de 14,2 mm.

A paquimetria corneana foi em média 578,6 μm (de 436 a 857 μm) para o olho direito e 551,3 μm (de 454 a 831 μm) para o olho esquerdo.

Os principais achados biomicroscópicos no exame oftalmológico dos 30 olhos dos 17 pacientes com glaucoma congênito primário são mostrados na tabela 2.

Tabela 2. Principais achados biomicroscópicos na consulta dos pacientes com glaucoma congênito primário

Variáveis	n	%
Cegueira OD	8	50,0
Cegueira OE	11	68,8
Cegueira qualquer um dos olhos	14	87,5
Cegueira Bilateral	5	31,3
Trabeculectomia OD	11	64,7
Trabeculectomia OE	3	17,6
Buftalmo OD	5	29,4
Buftalmo OE	4	23,5
Opacidade de córnea OD	6	35,3
Opacidade de córnea OE	4	23,5
Estrias de Haab OD	3	17,6
Estrias de Haab OE	6	35,3
Tubo de Ahmed OD	4	23,5
Tubo de Ahmed OE	5	29,4
Ceratopatia em faixa OD	3	17,6
Ceratopatia em faixa OE	2	11,8
Neovasos de córnea OD	1	5,9
Neovasos de córnea OE	1	5,9
Catarata OD	5	29,4
Catarata OE	2	11,8
Corectopia OD	1	5,9
Corectopia OE	0	0,0
Nistagmo OD	3	17,6
Nistagmo OE	1	5,9
Iridotomia OD	1	5,9
Iridotomia OE	0	0,0
Megalocórnea OD	3	17,6
Megalocórnea OE	1	5,9
Subluxação do cristalino OD	1	5,9
Subluxação do cristalino OE	0	0,0
Transplante de córnea OD	1	5,9
Transplante de córnea OE	0	0,0
Iridectomia OD	2	11,8
Iridectomia OE	0	0,0
Protrusão corneana OD	0	0,0
Protrusão corneana OE	1	5,9
Pseudofacia OD	0	0,0
Pseudofacia OE	4	23,5
Evisceração OD	0	0,0
Evisceração OE	4	23,5
Prótese OD	0	0,0
Prótese OE	3	17,6
Sinéquia posterior OD	0	0,0
Sinéquia posterior OE	1	5,9

OD=olho direito; OE-olho esquerdo

Um total de 14 alterações de nucleotídeos foram observadas neste estudo. Destas, seis foram previamente relatados como codificação de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) em região exônica e três já foram relatados como SNPs intrônicos. Cinco foram consideradas mutações de *CYP1B1* patogênicas. Os resultados estão mostrados nas tabelas 3, 4 e 5.

Tabela 3. Mutações do gene *CYP1B1* nos pacientes da pesquisa

Defeito no nucleotídeo	Mudança na proteína	Éxon	Códon	Tipo de mutação
c.55C>T	p.Q19X	2	19	Nonsense
c.241T>A	p.Y81N	2	81	Missense
c.1310C>T	p.P437L	3	437	Missense
c.1209_1210insTCATGCCACC	p.T404fs	3	404	Frameshift
c.182G>A	p.G61E	2	61	Missense

Os detalhes de todas as mudanças de nucleotídeos são apresentados abaixo.

5.1 Identificação das mutações reportadas patogênicas do gene *CYP1B1*

Mutação 10-bp insertion c.1209_1210insTCATGCCACC — Esta mutação resultou em inserção de 10 pares de base, no éxon 3, na posição genômica 38298287 (rs72466463)⁽⁶⁴⁾, entre os códons 1209 e 1210. Esta variante é uma duplicação e altera o quadro de leitura (*frameshift*). Esta mutação foi encontrada em dois pacientes (RC15 e RC17) em heterozigose.

Mutação Glutamina19stop (p.Q19X) — Esta mutação resultou em G sendo substituído por A, no éxon 2, na posição genômica 38302477 (rs72549388), codificando nucleotídeo número c.55. Isto resultou em mudança de um códon de CAG por TAG e uma mudança de aminoácido de glutamina por códon de parada (Q19X), o que provoca a perda de 524 aminoácidos. Esta mutação foi encontrada em um paciente (RC09) em heterozigose. É uma variante tipo *Nonsense*. Número OMIM 601771.0017.

Mutação Tirosina81asparagina (p.Y81N) — Esta mutação resultou em A sendo substituído por T, no éxon 2, na posição 38302291 (rs9282671), codificando

nucleotídeo número c.241. Isto resultou em mudança de um códon de TAC por AAC e uma mudança de aminoácido de tirosina por asparagina (Y81N). Esta mutação foi encontrada em um paciente (RC09) em heterozigose. É uma variante tipo *Missense*. Número OMIM 601771.0017.

Mutação Glicina61ácido glutâmico (p.G61E) — Esta mutação resultou em C sendo substituído por T, no éxon 2, na posição 38302350 (rs28936700), codificando nucleotídeo número c.182. Isto resultou em mudança de um códon de GGA por GAA e uma mudança de aminoácido de glicina por ácido glutâmico (G61E). Esta mutação foi encontrada em um paciente (RC17) em heterozigose. É uma mutação tipo *Missense*.

Mutação Prolina437leucina (p.P437L) — Esta mutação resultou em G sendo substituído por A, no éxon 3, na posição 38298187 (rs56175199), codificando nucleotídeo número c.1310. Isto resultou em mudança de um códon de CCG por CTG e uma mudança de aminoácido de prolina por leucina (P437L). Esta mutação foi encontrada em um paciente (RC15) em heterozigose e em um paciente (RC16) em homozigose. É uma mutação tipo *Missense*.

Tabela 4. SNPs nos éxons do gene *CYP1B1* nos pacientes da pesquisa

SNP	Nucleotídeo codificado	Éxon	Base de referência	Base observada	Aminoácido de referência	Aminoácido observado	Tipo de mutação
p.D449D	c.1347	3	A	G	Aspartato	Aspartato	Sinônima
p.V432L	c.1294	3	C	G	Valina	Leucina	Não-sinônima
p.A119S	c.355	2	C	A	Alanina	Serina	Não-sinônima
p.R48G	c.142	2	G	C	Arginina	Glicina	Não-sinônima
p.V243V	c.729	2	C	G	Valina	Valina	Sinônima
p.N453S	c.1358	3	A	G	Asparagina	Serina	Não-sinônima

5.2 Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) não-patogênicos do gene *CYP1B1*

Além das mutações patogênicas descritas anteriormente, nove SNPs já reportados previamente foram identificados. Detalhes dos mesmos foram relatados abaixo.

Aspartato449aspartato (p.D449D) — Nesta mutação, uma única base A foi substituída por G, no éxon 3, na posição genômica 38298150 (rs1056837), posição de nucleotídeo 5174 no gene, codificando o nucleotídeo número c.1347. Isto resultou em uma mudança de códon de GAT to GAC e não houve mudança de aminoácido (aspartato) (p.D449D), uma mutação sinônima na proteína CYP1B1. Esta mutação foi encontrada em 12 pacientes e foi homozigota em 5 (RC01, RC06, RC09, RC10 e RC11) e heterozigota em 7 (RC02, RC03, RC04, RC08, RC12, RC13 e RC14).

Valina432leucina (p.V432L) — Nesta mutação, uma única base C foi substituída por G, no éxon 3, na posição genômica 38298203 (rs1056836), codificando o nucleotídeo número c.1294. Isto resultou em uma mudança de códon de GTG para CTG e uma mudança de aminoácido de valina para leucina (p.V432L), uma mutação não-sinônima na proteína CYP1B1. Esta mutação foi encontrada em 12 pacientes e foi homozigota em 5 (RC01, RC06, RC09, RC10 e RC11) e heterozigota em 7 (RC02, RC03, RC04, RC08, RC12, RC13 e RC14).

Alanina119serina (p.A119S) — Nesta mutação, uma única base G foi substituída por T, no éxon 2, na posição genômica 38302177 (rs1056827), codificando o nucleotídeo número c.355. Isto resultou em uma mudança de códon de GCC para TCC e uma mudança de aminoácido de alanina to serina (p.A119S), uma mutação não-sinônima na proteína CYP1B1. Esta mutação foi encontrada em 7 pacientes, todas em heterozigose (RC01, RC04, RC05, RC07, RC09, RC12 e RC14).

Arginina48glicina (p.R48G) — Nesta mutação, uma única base C foi substituída por G, no éxon 2, na posição genômica 38302390 (rs10012), codificando o nucleotídeo número c.142. Isto resultou em uma mudança de códon de CGG to GGG e uma mudança de aminoácido de arginina to glicina (p.R48G), uma mutação não-sinônima na proteína CYP1B1. Esta mutação foi encontrada em 7 pacientes, todas em heterozigose (RC01, RC04, RC05, RC07, RC09, RC12 e RC14).

Valina243valina (p.V243V) — Nesta mutação, uma única base C foi substituída por G, no éxon 2, na posição genômica 38301803 (rs9341249), codificando o nucleotídeo número c.729. Isto resultou em uma mudança de códon de GAG to GTC

e não houve mudança de aminoácido (valina), uma mutação sinônima na proteína CYP1B1. Esta mutação foi encontrada em 2 pacientes, ambos em heterozigose (RC05 e RC07).

Asparagina453serina (p.N453S) — Nesta mutação, uma única base A foi substituída por G, no éxon 3, na posição genômica 38298139 (rs1800440), codificando o nucleotídeo número c.1358. Isto resultou em uma mudança de códon de AAC para AGC e uma mudança de aminoácido de asparagina to serina (p.N453S), uma mutação não-sinônima na proteína CYP1B1. Esta mutação foi encontrada em 4 pacientes e foi homozigota em 1 (RC06) e heterozigota em 3 (RC08, RC11 e RC13).

Também foram encontradas SNPs nos íntrons, descritas a seguir :

Substituição de Guanina (G) por Adenina (A) no íntron 1 — Nesta mutação, G foi substituída por A na posição genômica 38302544, posição de nucleotídeo 780 no gene *CYP1B1* (rs2617266) no íntron 1. Isso foi observado em 5 pacientes, todos em heterozigose (RC04, RC05, RC07, RC09 e RC12).

Substituição de Guanina (G) por Adenina (A) no íntron 1 — Nesta mutação, G foi substituída por A na posição genômica 38302546, no gene *CYP1B1* (rs4987134) no íntron 1. Isso foi observado em 2 pacientes e foi homozigota em 1 (RC14) e heterozigota em 1 (RC01).

Inserção de Adenina (A) no íntron 2 — Nesta mutação, A foi inserida na posição genômica 38298593, no gene *CYP1B1* (rs34468862) no íntron 2. Isso foi observado em 10 pacientes e foi homozigota em 1 (RC16) e heterozigota em 9 (RC04, RC05, RC07, RC08, RC12, RC13, RC14, RC15 e RC17).

Tabela 5. Mutações e Polimorfismos de Nucleotídeo Único encontrados nos pacientes com glaucoma congênito primário

Variáveis	n	%
Mutações		
Sim	4	23,5
Não	13	76,5
Tipo de mutação		
Mutação homozigose c.55C>T:p.Q19X	0	0,0
Mutação heterozigose c.55C>T:p.Q19X	1	5,9
Mutação homozigose c.241T>A:p.Y81N	0	0,0
Mutação heterozigose c.241T>A:p.Y81N	1	5,9
Mutação homozigose c.182G>A:p.G61E	0	0,0
Mutação heterozigose c.182G>A:p.G61E	1	5,9
Mutação homozigose c.1310C>T:p.P437L	1	5,9
Mutação heterozigose c.1310C>T:p.P437L	1	5,9
Mutação homozigose c.1209_1210insTCATGCCACC:p.T404fs	0	0,0
Mutação heterozigose c.1209_1210insTCATGCCACC:p.T404fs	2	11,8
Tipo de SNP		
SNP homozigose p.D449D	5	29,4
SNP heterozigose p.D449D	7	41,2
SNP homozigose p.V432L	5	29,4
SNP heterozigose p.V432L	7	41,2
SNP homozigose p.A119S	0	0,0
SNP heterozigose p.A119S	7	41,2
SNP homozigose p.R48G	0	0,0
SNP heterozigose p.R48G	7	41,2
SNP homozigose p.V243V	0	0,0
SNP heterozigose p.V243V	2	11,8
SNP homozigose p.N453S	1	5,9
SNP heterozigose p.N453S	3	17,6
SNP homozigose íntron rs4987134	1	5,9
SNP heterozigose íntron rs4987134	1	5,9
SNP homozigose íntron rs2617266	0	0,0
SNP heterozigose íntron rs2617266	5	29,4
SNP homozigose íntron rs34468862	1	5,9
SNP heterozigose íntron rs34468862	9	52,9

SNP= Polimorfismo de nucleotídeo único

5.3 Correlação genótipo-fenótipo

As características clínicas para as variáveis categóricas foram comparadas entre os grupos com e sem mutação no gene *CYP1B1*. Não houve associação significativa entre as características analisadas e a presença de mutação. Os dados estão descritos na tabela 6.

Tabela 6. Comparação das características clínicas para as variáveis categóricas entre os grupos de acordo com a presença de mutação no gene *CYP1B1*

Variáveis	Mutação		p-valor *
	Sim n (%)	Não n (%)	
Sexo			
Feminino	3 (37,5)	5 (62,5)	0,294
Masculino	1 (11,1)	8 (88,9)	
Parentesco entre os pais			
Sim	2 (40,0)	3 (60,0)	0,538
Não	2 (16,7)	10 (83,3)	
Lateralidade			
Unilateral	0 (0,0)	2 (100,0)	1,000
Bilateral	4 (26,7)	11 (73,3)	
Número de cirurgias OD			
Até 1	1 (14,3)	6 (85,7)	0,603
2 ou mais	3 (30,0)	7 (70,0)	
Número de cirurgias OE			
Até 1	3 (33,3)	6 (66,7)	0,576
2 ou mais	1 (12,5)	7 (87,5)	
Características Clínicas			
Cegueira OD	2 (25,0)	6 (75,0)	1,000
Cegueira OE	2 (18,2)	9 (81,8)	0,547
Cegueira qualquer um dos olhos	3 (21,4)	11 (78,6)	0,450
Cegueira Bilateral	1 (20,0)	4 (80,0)	1,000
Trabeculectomia OD	2 (18,2)	9 (81,8)	0,584
Trabeculectomia OE	0 (0,0)	3 (100,0)	0,541
Buftalmo OD	1 (20,0)	4 (80,0)	1,000
Buftalmo OE	0 (0,0)	4 (100,0)	0,519
Opacidade de córnea OD	1 (16,7)	5 (83,3)	1,000
Opacidade de córnea OE	0 (0,0)	4 (100,0)	0,519
Estrias de Haab OD	0 (0,0)	3 (100,0)	0,541
Estrias de Haab OE	0 (0,0)	6 (100,0)	0,237
Tubo de Ahmed OD	1 (25,0)	3 (75,0)	1,000
Tubo de Ahmed OE	1 (20,0)	4 (80,0)	1,000
Catarata OD	1 (20,0)	4 (80,0)	1,000
Catarata OE	0 (0,0)	2 (100,0)	1,000

(*) Teste Exato de Fisher

OD=olho direito; OE=olho esquerdo

As características clínicas para as variáveis quantitativas foram comparadas entre os grupos com e sem mutação no gene *CYP1B1*. Não diferença estatisticamente significativa em nenhuma das variáveis analisadas entre os grupos com e sem mutação. Os dados estão descritos na tabela 7.

Tabela 7. Comparação das características clínicas para as variáveis quantitativas entre os grupos de acordo com a presença de mutação no gene *CYP1B1*

Variáveis	Mutação		p-valor *
	Sim	Não	
	Média ± DP	Média ± DP	
Idade (anos)	25,2 ± 15,6	28,5 ± 10,5	0,071
Idade no diagnóstico (anos)	2,3 ± 4,5	0,0 ± 0,0	---
Número de medicações em uso	3,5 ± 1,0	2,5 ± 1,3	0,111
PIO OD (mmHg)	15,0 ± 2,4	19,3 ± 9,7	0,569
PIO OE (mmHg)	12,5 ± 3,5	16,6 ± 12,6	0,746
Paquimetria OD (µm)	524,3 ± 20,6	598,4 ± 111,0	0,117
Paquimetria OE (µm)	523,0 ± 17,0	557,6 ± 117,9	0,814
DCH OD (mm)	13,6 ± 1,3	14,0 ± 1,4	0,605
DCH OE (mm)	13,5 ± 2,1	14,3 ± 1,6	0,478
Relação escavação/ disco OD	0,5 ± 0,4	0,8 ± 0,2	0,404
Relação escavação/ disco OE	0,5 ± 0,4	0,9 ± 0,3	0,073

(*) Teste de Mann-Whitney

OD=olho direito; OE=olho esquerdo

DCH=Diâmetro corneano horizontal



6 DISCUSSÃO

O glaucoma congênito primário (GCP; *OMIM 231300*)⁽⁷⁾ é o tipo mais comum de glaucoma na infância, mas continua sendo raro. É uma doença clinicamente e geneticamente heterogênea e uma causa importante de cegueira infantil em todo o mundo e as características de deficiência visual em uma população variam de acordo com a acessibilidade aos serviços de saúde^(65,66). O tratamento é principalmente cirúrgico^(17,50) e o gerenciamento dura a vida inteira. No mundo em desenvolvimento, em destaque o Brasil, o diagnóstico tardio, o tratamento limitado e o acompanhamento inadequado levam a um fardo mais pesado para o paciente e a comunidade. No Brasil, um estudo avaliou 3.210 crianças portadoras de deficiência visual, tendo o glaucoma congênito como responsável por aproximadamente 11% dos casos⁽⁶⁾. Destacam-se a epidemiologia e a genética da doença, seu gerenciamento e prognóstico atuais e as limitações que enfrentam tanto os médicos oftalmologistas quanto os pacientes do mundo em desenvolvimento.

De acordo com a Classificação Internacional de Doenças e Problemas de Saúde Relacionados 10ª Revisão (CID-10) - Versão para 2016⁽⁶⁷⁾, uma pessoa tem comprometimento visual leve ou visão normal, moderado ou grave quando sua visão no melhor olho corrigido é igual ou melhor do que 20/400 (categorias 0, 1 e 2 de deficiência visual) e são cegos quando esse valor é pior do que 20/400 (categorias 3, 4 e 5)⁽⁶⁷⁾. A cegueira foi diagnosticada em pelo menos um olho em 14 (87,50%) de 16 pacientes em quem essa variável foi avaliada. Ao se categorizar, a acuidade visual com correção: até 20/70 (deficiência visual leve ou sem deficiência) que foi descrita em 4 olhos direitos e em 2 olhos esquerdos; pior que 20/70 até 20/200 (deficiência visual moderada) que foi descrita em 4 olhos direitos e em 1 olho esquerdo; pior que 20/200 até 20/400 (deficiência visual grave) que não foi descrita em nenhum olho direito e em 2 olhos esquerdos; pior que 20/400 (cegueira) que foi descrita em 8 olhos direitos e em 11 olhos esquerdos; observação: em 2 olhos (1 participante), não foi avaliada pois o exame foi sob sedação.

Neste estudo, a maior prevalência do acometimento do sexo masculino (52,9%) é consistente com estudos anteriores^(3,52,53). A doença foi bilateral em 15 (88,24%) pacientes e este resultado está de acordo com a literatura^(3,50). Também foi observada

uma frequência de consanguinidade (29,4%) semelhante a estudo brasileiro prévio que encontrou em 26,9%⁽³⁸⁾.

Quanto à idade de início da doença, isto é, quando ela foi diagnosticada, encontramos 16 (94,12%) pacientes até completar os 3 anos de idade e 1 paciente (5,88%) após os 3 anos, semelhante à literatura⁽⁵⁰⁾.

A média de idade dos pacientes é de 27,7 anos ($\pm 11,4$). Este parâmetro foi importante para mostrar o resultado a longo prazo da doença, já que tivemos 59,38% dos olhos (32 olhos) com acuidade visual final pior que 20/400. A presente pesquisa é semelhante, nesse ponto de avaliação de resultado a longo prazo, à de Weisschuh et al.⁽⁵²⁾, cuja idade média dos pacientes foi de $37,5 \pm 16,5$ anos e cujo resultado visual foi pobre independente da presença ou ausência de mutação (31,58% dos olhos tiveram acuidade visual pior que 20/400). Além disso, no atual estudo, a cegueira foi diagnosticada em pelo menos um olho em 14 (87,50%) de 16 pacientes em quem essa variável foi avaliada e, em 63,3% dos olhos, houve diagnóstico de cegueira. Este dado é bem diferente do estudo prévio alemão de Weisschuh et al.⁽⁵²⁾, em que 31,58% dos olhos evoluíram para cegueira. A diferença entre as percentagens pode se dever ao tamanho amostral e/ou a rapidez do acesso ao serviço de saúde com diagnóstico e tratamento adequados tenha minimizado o efeito terrível desta doença.

O tratamento medicamentoso é limitado para controle da PIO no GCP, tendo papel adjuvante no pré-operatório e no pós-operatório⁽⁴⁹⁾. Neste estudo, o grupo com mutação teve maior necessidade de manter uso de medicação antiglaucomatosa como tratamento adjuvante a longo prazo em comparação com o grupo sem mutação e este dado está de acordo com estudo prévio de Cardoso et al.⁽⁶²⁾.

O número de procedimentos cirúrgicos a que os pacientes avaliados neste estudo foram submetidos ao longo da vida para controle da PIO foi de 2 ou mais cirurgias em mais de 50% dos casos e isto é preocupante por deixar claro que a 1ª cirurgia foi ineficiente para a maioria. Isto é corroborado por Campos-Mollo et al.⁽³⁾, em estudo anterior, mas é contradito por Beharro et al.⁽⁶¹⁾, em outro estudo. Ainda, de acordo com Papadopoulos et al.⁽⁶⁸⁾, em 2007, 50% dos olhos requerem mais de uma cirurgia para controle da PIO dentro do primeiro ano.

A média da relação escavação/disco foi $0,7 \pm 0,3$ para o olho direito e $0,8 \pm 0,3$ para o olho esquerdo. Este resultado é diferente do que já foi publicado na literatura em diferentes partes do mundo com médias entre 0,36 e 0,59^(3,61,63).

O diâmetro corneano horizontal foi em média 14,05 mm (variando de 12 a 16mm). Em pesquisas realizadas em outros países, esta média foi semelhante à do presente estudo^(3,55,59).

A paquimetria corneana foi em média $578,6 \pm 100,2$ μm para o olho direito e $551,3 \pm 106,5$ μm para o olho esquerdo. Na literatura, correlações entre espessura corneana central e outras variáveis já foram estudadas e nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada para esta variável entre os olhos direitos e esquerdos. Pode-se considerar a paquimetria como exame a ser realizado para seguimento dos casos suspeitos ou confirmados de glaucoma congênito⁽⁶⁹⁾. O resultado da presente pesquisa foi importante para aumentar o conhecimento sobre essa variável no GCP já que tanto há autores como Henriques et al.⁽⁷⁰⁾, que mostraram córneas mais finas nos portadores de GCP quanto há outros quanto outros que mostraram não haver diferença estatisticamente significativa entre os portadores e os controles⁽⁷¹⁾.

O gene *CYP1B1* é reconhecidamente associado ao glaucoma congênito primário^(7,12,14,15,45,46). A prevalência de mutações associadas com a doença é variável em diferentes populações e etnias, como menos de 10% no México⁽⁷²⁾, 20% no Japão⁽⁵¹⁾, 28,57% em Portugal⁽⁶²⁾, 40% em Marrocos⁽⁷³⁾, 70% no Irã⁽⁷⁴⁾ e de 80 a 100% na Arábia Saudita^(44,55) e na população cigana da Eslováquia⁽⁴²⁾. A consanguinidade parental pode ser relacionada à prevalência relativamente maior de variantes patogênicas nessas últimas duas populações. No Brasil, diferentes resultados em termos de porcentagem de mutações foram encontrados pelos autores: 50% por Stoilov et al.⁽³⁸⁾ e 30% por Della-Paolera et al.⁽⁵⁴⁾. No presente estudo, encontrou-se a prevalência de 23,53% de pacientes com mutações.

Jansson et al.⁽⁷⁵⁾, em 2001, descreveram que a proteína mutante p.G61E perdeu 60% de sua estabilidade e os efeitos da mutação na função da proteína, por meio de um ensaio enzimático, confirmou ainda a diminuição da sua atividade catalítica (50% a 70%) para todos os substratos quando comparada à proteína do tipo selvagem e os resultados sugerem que, se um metabólito de *CYP1B1* ou eliminação de um metabólito pela *CYP1B1* for necessário para o desenvolvimento normal de tecido embrionário ou fetal, a aparência dessa mutação pode resultar em anormalidades de desenvolvimento. Já Chavarria-Soley et al.⁽²³⁾, encontraram uma atividade enzimática de menos de 10% para esta mutação. No presente estudo,

encontramos essa mutação em um único paciente (5,9% dos casos), que era do sexo feminino.

Algumas proteínas mutantes, como a p.P437L já foram estudadas por Medina-Trillo et al.⁽⁷⁶⁾, em 2016, e se mostraram valores de atividade catalítica variando de 0% a 4% da proteína de tipo selvagem e foram consideradas variantes nulas. Esses resultados confirmam a patogenicidade das variantes mutantes analisadas e ainda apoiam o conceito de que os níveis de atividade de *CYP1B1* ausentes ou muito baixos são o principal defeito molecular envolvido na patogênese de GCP.

Choudhary et al.⁽²⁴⁾, em 2008, afirmam que as mutações da proteína *CYP1B1* afetaram fortemente a estabilidade, facilidade de expressão e propriedades enzimáticas da proteína e que isto foi relacionado à posição das substituições de aminoácidos na estrutura proteica. A mutação Y81N envolve resíduo localizado perto da superfície distal e causa uma estabilidade muito reduzida e inibe severamente todo o volume de renovação do substrato. Já Chavarria-Soley et al.⁽²³⁾, propuseram que essa mutação pode agir diminuindo a abundância da enzima.

Lim et al.⁽⁶⁴⁾, em 2012, observaram que a inserção de 10 pb (c.1209_1210insTCATGCCACC) resulta em um deslocamento de quadro de leitura seguido de códons de parada prematura, causando alterações de aminoácidos p.Thr404fs*30 em seu novo quadro de leitura. Tais deslocamentos alteram a composição dos aminoácidos que compõem a enzima *CYP1B1* e modificam drasticamente a estrutura da proteína *CYP1B1*, tornando a proteína funcionalmente inativa.

A mutação Q19X citada por Stoilov et al.⁽³⁸⁾, em 2002, produz uma proteína *CYP1B1* truncada por provocar uma mudança de glutamina por um códon de parada prematuramente e que não possui todos os domínios funcionais. Torna-se, portanto, uma proteína não-funcionante.

Os seis SNPs descritos em éxons neste estudo não alteram o fenótipo da doença e já foram previamente identificados em indivíduos afetados e controles saudáveis^(3,38,52–55). Também foram encontrados três SNPs em íntrons que não alteram o fenótipo da doença e dos quais dois (rs4987134 e rs34468862) não tiveram citação encontrada na literatura, mas um (rs2617266) foi descrito por Tanwar et al.⁽⁵³⁾, em 2009.

A correlação genótipo-fenótipo tem mostrado grande variabilidade em relação ao gene *CYP1B1* e o glaucoma congênito primário. Weisschuh et al.⁽⁵²⁾, em 2009, compararam um grupo de pacientes com glaucoma congênito primário com mutações

no gene *CYP1B1* com um grupo sem mutação, não observaram diferenças significativas entre eles em relação à idade de aparecimento, à gravidade do quadro clínico e à resposta ao tratamento e concluíram que o resultado visual foi pobre independente da presença ou ausência de mutação. Campos-Mollo et al.⁽³⁾, em 2009, não mostraram diferenças com significância estatística entre portadores e não portadores de mutações em relação ao acometimento ocular, à idade do diagnóstico, ao gênero e ao número de intervenções cirúrgicas. O presente estudo também não apontou diferença estatisticamente significativa no fenótipo entre a população com glaucoma congênito primário com e sem mutação no gene *CYP1B1*, embora a limitação dos custos da pesquisa e, conseqüentemente, o número limitado de participantes possa ter contribuído com esta conclusão. Outros estudos descreveram resultados similares^(15,44).

Entretanto, outras pesquisas relataram que os pacientes com glaucoma congênito primário e mutações no gene *CYP1B1* tendiam a ter um fenótipo mais grave com idade de aparecimento mais precoce^(26,27,38,60,62,63), envolvimento bilateral^(27,38,61) e prognóstico pior, com mais de uma intervenção cirúrgica para atingir a PIO alvo^(26,54,61,63). Chen et al.⁽⁵⁸⁾, em 2013, afirmaram que a combinação de escore de opacidade corneana e genótipo do *CYP1B1* podem predizer o resultado cirúrgico em termos de controle da PIO no pós-operatório. Abu-Amero et al.⁽⁵⁵⁾, em 2011, concluíram que os indivíduos com variantes patogênicas do *CYP1B1* apresentaram maiores índices de visitas pós-operatório em termos de opacidade de córnea pós-operatória e a necessidade de medicamentos antiglaucomatosos do que indivíduos sem variantes patogênicas.

Martin et al.⁽⁷⁷⁾, em 2000, especularam que indivíduos com alterações heterozigóticas do gene *CYP1B1* podem exibir menor gravidade da doença do que aqueles com alterações homozigóticas. Todavia, Lim et al.⁽⁶⁴⁾, em 2012, em sua coorte, observou que ambos os casos heterozigóticos quanto os homozigotos compostos tiveram cursos clínicos de doença indiscriminadamente.

Essa divergência de resultados não está bem explicada e, possivelmente, poderia ser conseqüência das diferenças regionais, porcentagem de casamentos consanguíneos, variedade de técnicas cirúrgicas, acesso imediato ao serviço de saúde, tempo de seguimento pós-operatório, composição das amostras populacionais estudadas e outros fatores ainda não estabelecidos.

Nesta pesquisa, o resultado visual foi escasso independente da presença ou ausência de mutação para grande parte dos pacientes estudados e não houve diferenças significativas entre os achados clínicos dos casos com e sem mutação. Além disso, o conhecimento sobre a genética do GCP ainda está longe de ser completo e permanece um desafio para mais pesquisas futuras. Assim, a identificação precoce de sinais e sintomas do GCP e também de famílias portadoras de mutações ligadas à doença pode ter um impacto significativo na predição da gravidade da mesma e pode ajudar a prever o resultado cirúrgico. São necessários mais esforços para fornecer efetividade, triagem oportuna das crianças e alocação de recursos adequados para permitir que os profissionais de saúde reduzam a taxa de cegueira evitável no Brasil.



7 CONCLUSÕES

A análise dos resultados encontrados no presente estudo permite concluir que:

1. Mutações patogênicas no gene CYP1B1 foram encontradas em 23,5% dos pacientes, sendo elas 5 diferentes (Q19X, Y81N, P437L, T404fs, G61E) e não se encontrou correlação genótipo-fenótipo estatisticamente significativa ($p < 0,05$);
2. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) intragênicos do gene CYP1B1 foram detectados em todos os pacientes, sendo eles 9 diferentes tipos: seis em éxons (D449D, V432L, A119S, R48G, V243V, N453S) e 3 em íntrons (rs4987134, rs34468861, rs2617266);
3. A cegueira e as principais alterações encontradas na biomicroscopia foram descritas em 17 olhos direitos e 13 olhos esquerdos, pois 4 olhos esquerdos tinham sido eviscerados. A cegueira foi diagnosticada em pelo menos um olho em 14 (87,50%) de 16 pacientes e em 63,3% dos olhos, sendo em 8 olhos direitos e em 11 olhos esquerdos. A córnea foi considerada transparente em 10 olhos direitos e em 9 olhos esquerdos e com opacidade em 7 olhos direitos e em 4 olhos esquerdos; além disso, foram encontrados buftalmo em 4 olhos direitos e em 4 olhos esquerdos e estrias de Haab em 3 olhos direitos e em 6 olhos esquerdos. A média da relação escavação/disco foi $0,7 \pm 0,3$ para o olho direito e $0,8 \pm 0,3$ para o olho esquerdo. A pressão intraocular foi em média $18,3 \pm 8,7$ mmHg para o olho direito e $15,9 \pm 11,6$ mmHg para o olho esquerdo. O diâmetro corneano horizontal foi em média 14,05 mm (variando de 12 a 16 mm), sendo para o olho direito de 13,9 mm e para o olho esquerdo de 14,2 mm. A paquimetria corneana foi em média 578,6 μ m (de 436 a 857 μ m) para o olho direito e 551,3 μ m (de 454 a 831 μ m) para o olho esquerdo;
4. A idade média dos pacientes foi de 27,7 anos e a idade do diagnóstico foi em 94,1% ao nascimento e em 5,9% após os 3 anos. Houve relato de consanguinidade parental em 29,4% dos casos;
5. A média de medicações antiglaucomatosas em uso foi de $2,7 \pm 1,3$. Os pacientes foram submetidos a cirurgia ocular em 94,1% dos casos, embora o número exato de cirurgias não tenha sido possível identificar em todos os sujeitos por falta de informação.



REFERÊNCIAS

1. Rastreado os genes do glaucoma. 2009;2009. Available from: <<http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=vtls000238353>>. Access in: 02 Dec 2017.
2. Wiggs JL, Hewitt AW, Fan BJ, Wang DY, Figueiredo Sena DR, O'Brien C, et al. The p53 Codon 72 PRO/PRO Genotype May Be Associated with Initial Central Visual Field Defects in Caucasians with Primary Open Angle Glaucoma. *PLoS One*. 2012;7(9):e45613.
3. Campos-mollo E, Blanco-Marchite C, Garcia-Feijoo J, Peralta J, Belmonte-martínez J, Ayuso C, et al. *CYP1B1* mutations in Spanish patients with primary congenital glaucoma: phenotypic and functional variability. *Mol Vis*. 2009;15(1):417-31.
4. Biglan AW. Glaucoma in children: Are we making progress? *J AAPOS*. 2006;10(1):7-21.
5. Reddy ABM, Kaur K, Mandal AK, Panicker SG, Thomas R, Hasnain SE, et al. Mutation spectrum of the *CYP1B1* gene in Indian primary congenital glaucoma patients. *Mol Vis*. 2004;10(9):696-702.
6. Haddad MA, Sei M, Sampaio MW, Kara-Jose N. Causes of visual impairment in children: a study of 3,210 cases. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*. 2007;44(4):232-40.
7. Amberger JSS, Bocchini CAA, Schiettecatte F, Scott AFF, Hamosh A. OMIM.org: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®), an Online catalog of human genes and genetic disorders. *Nucleic Acids Res [Internet]*. 2015;43(D1):D789-98.
8. Stamper R, Liberman M, Drake M editors. Developmental and childhood glaucoma. *Becker-Shaffer's Diagnosis and Therapy of the Glaucomas*. 8th ed. Mosby Elsevier; 2009. p.294-329.
9. Cascella R, Strafella C, Germani C, Novelli G, Ricci F, Zampatti S, et al. The

- Genetics and the Genomics of Primary Congenital Glaucoma. *Biomed Res Int*. 2015. Available from: <<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/321291/>>. Access in: 24 Jan 2017.
10. Francois J. Congenital glaucoma and its inheritance. *Ophthalmologica* [Internet]. 1980;181(2):61–73.
 11. Morin JD, Merin S, Sheppard RW. Primary congenital glaucoma--a survey. *Can J Ophthalmol*. 1974;9(1):17-28.
 12. Chen L, Huang L, Zeng A, He J. *CYP1B1* gene mutations with incomplete penetrance in a Chinese pedigree with primary congenital glaucoma: A case report and review of literatures. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(8):14538-41.
 13. Sena D, Finzi S, Rodgers K, Del Bono E, Haines JL, Wiggs JL. Founder mutations of *CYP1B1* gene in patients with congenital glaucoma from the United States and Brazil. *J Med*. 2004;41(1):e6.
 14. Chakrabarti S, Kaur K, Kaur I, Mandal AK, Parikh RS, Thomas R, et al. Globally, *CYP1B1* mutations in primary congenital glaucoma are strongly structured by geographic and haplotype backgrounds. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47(1):43-7.
 15. de Melo MB, Mandal AK, Tavares IM, Ali MH, Kabra M, De Vasconcellos JPCJPC, et al. Genotype-Phenotype Correlations in *CYP1B1*-Associated Primary Congenital Glaucoma Patients Representing Two Large Cohorts from India and Brazil. *PLoS One*. 2015;10(5):e0127147.
 16. Barkan O. Technique of goniotomy. *Arch Ophthalmol*. 1938;19:217-21.
 17. Mandal AK, Chakrabarti D. Update on congenital glaucoma. *Indian J Ophthalmol*. 2011;59 Suppl:S148-57.
 18. Weinreb R, Grajewski AL, Papadopoulos M, Grigg J, Freedman S, editors. *Childhood glaucoma*. Amsterdam: Kugler Publications; 2013.
 19. Sutter TR, Tang YM, Hayes CL, Wo YY, Jabs EW, Li X, et al. Complete cDNA sequence of a human dioxin-inducible mRNA identifies a new gene subfamily of cytochrome P450 that maps to chromosome 2. *J Biol Chem*. 1994;269(18):13092-9.
 20. Allingham RR, Damji KF, Freedman SF, Moroi SE, Shafranov G, Shields MB, editors. *Shields' Textbook of Glaucoma*. 5th ed. Philadelphia, PA 19106 USA: Lippincott Williams & Wilkins, USA; 2005.
 21. Tang YM, Wo YY, Stewart J, Hawkins AL, Griffin CA, Sutter TR, et al. Isolation

- and characterization of the human cytochrome P450 *CYP1B1* gene. *J Biol Chem.* 1996;271(45):28324-30.
22. Wiggs JL, Langguth AM, Allen KF. Carrier frequency of *CYP1B1* mutations in the United States (an American Ophthalmological Society thesis). *Trans Am Ophthalmol Soc.* 2014;112:94-102.
 23. Chavarria-Soley G, Sticht H, Akillu E, Ingelman-Sundberg M, Pasutto F, Reis A, et al. Mutations in *CYP1B1* cause primary congenital glaucoma by reduction of either activity or abundance of the enzyme. *Hum Mutat.* 2008;29(9):1147–53.
 24. Choudhary D, Jansson I, Sarfarazi M, Schenkman JB. Characterization of the biochemical and structural phenotypes of four *CYP1B1* mutations observed in individuals with primary congenital glaucoma. *Pharmacogenet Genomics [Internet].* 2008;18(8):665–76.
 25. Stoilov I, Akarsu AN, Alozie I, Child A, Barsoum-Homsy M, Turacli ME, et al. Sequence analysis and homology modeling suggest that primary congenital glaucoma on 2p21 results from mutations disrupting either the hinge region or the conserved core structures of cytochrome P4501B1. *Am J Hum Genet.* 1998;62(3):573–84.
 26. López-Garrido MP, Medina-Trillo C, Morales-Fernandez L, Garcia-Feijoo J, Martínez-De-La-Casa JM, García-Antón M, et al. Null *CYP1B1* genotypes in primary congenital and nondominant juvenile glaucoma. *Ophthalmology.* 2013;120(4):716–23.
 27. Chen Y, Jiang D, Yu L, Katz B, Zhang K, Wan B, et al. *CYP1B1* and MYOC mutations in 116 Chinese patients with primary congenital glaucoma. *Arch Ophthalmol.* 2008;126(10):1443-7.
 28. Sarfarazi M, Akarsu AN, Hossain A, Turacli ME, Aktan SG, Barsoum-Homsy M, et al. Assignment of a locus (GLC3A) for primary congenital glaucoma (Buphthalmos) to 2p21 and evidence for genetic heterogeneity. *Genomics [Internet].* 1995 Nov 20;30(2):171-7.
 29. Akarsu AN, Turacli ME, Aktan SG, Barsoum-Homsy M, Chevrette L, Sayli BS, et al. A second locus (GLC3B) for primary congenital glaucoma (Buphthalmos) maps to the 1p36 region. *Hum Mol Genet.* 1996;5(8):1199-203.
 30. López-Garrido M-P, Sánchez-Sánchez F, López-Martínez F, Aroca-Aguilar J-D, Blanco-Marchite C, Coca-Prados M, et al. Heterozygous *CYP1B1* gene mutations in Spanish patients with primary open-angle glaucoma. *Mol Vis.*

- 2006;12(7):748–55.
31. Stoilov I, Sarfarazi M. The Third Genetic Locus (GLC3C) for Primary Congenital Glaucoma (PCG) Maps to Chromosome 14q24.3. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43(12):e3015.
 32. Firasat S, Riazuddin SA, Hejtmancik JF, Riazuddin S. Primary congenital glaucoma localizes to chromosome 14q24.2-24.3 in two consanguineous Pakistani families. *Mol Vis.* 2008;14:1659-65.
 33. Souma T, Tompson SW, Thomson BR, Siggs OM, Kizhatil K, Yamaguchi S, et al. Angiopoietin receptor TEK mutations underlie primary congenital glaucoma with variable expressivity. *J Clin Invest.* 2016;126(7):2575-87.
 34. Williams AL, Eason J, Chawla B, Bohnsack BL. *CYP1B1* Regulates Ocular Fissure Closure Through a Retinoic Acid-Independent Pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2017;58(2):1084-97.
 35. Stoilov I, Akarsu AN, Sarfarazi M. Identification of three different truncating mutations in cytochrome P4501B1 (*CYP1B1*) as the principal cause of primary congenital glaucoma (Buphthalmos) in families linked to the GLC3A locus on chromosome 2p21. *Hum Mol Genet.* 1997;6(4):641–7.
 36. Tanwar M, Dada T, Sihota R, Das TK, Yadav U, Dada R. Mutation spectrum of *CYP1B1* in North Indian congenital glaucoma patients. *Mol Vis.* 2009 13;15:1200-9.
 37. Panicker SG, Reddy ABM, Mandal AK, Ahmed N, Nagarajaram HA, Hasnain SE, et al. Identification of novel mutations causing familial primary congenital glaucoma in Indian pedigrees. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43(5):1358-66.
 38. Stoilov IR, Costa VP, Vasconcellos JPC, Melo MB, Betinjane AJ, Carani JCE, et al. Molecular genetics of primary congenital glaucoma in Brazil. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43(6):1820-7.
 39. Panicker SG, Mandal AK, Reddy ABM, Gothwal VK, Hasnain SE. Correlations of genotype with phenotype in Indian patients with primary congenital glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45(4):1149–56.
 40. Colomb E, Kaplan J, Garchon H-J. Novel cytochrome P450 1B1 (*CYP1B1*) mutations in patients with primary congenital glaucoma in France. *Hum Mutat.* 2003;22(6):496.
 41. Mashima Y, Suzuki Y, Sergeev Y, Ohtake Y, Tanino T, Kimura I, et al. Novel cytochrome P4501B1 (*CYP1B1*) gene mutations in Japanese patients with

- primary congenital glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42(10):2211-6.
42. Plásilová M, Stoilov I, Sarfarazi M, Kádasi L, Feráková E, Ferák V. Identification of a single ancestral *CYP1B1* mutation in Slovak Gypsies (Roms) affected with primary congenital glaucoma. *J Med Genet.* 1999;36(4):290-4.
 43. Bejjani BA, Lewis RA, Tomey KF, Anderson KL, Dueker DK, Jabak M, et al. Mutations in *CYP1B1*, the gene for cytochrome P4501B1, are the predominant cause of primary congenital glaucoma in Saudi Arabia. *Am J Hum Genet.* 1998;62(2):325-33.
 44. Bejjani BA, Stockton DW, Lewis RA, Tomey KF, Dueker DK, Jabak M, et al. Multiple *CYP1B1* mutations and incomplete penetrance in an inbred population segregating primary congenital glaucoma suggest frequent de novo events and a dominant modifier locus. *Hum Mol Genet.* 2000 Feb 12;9(3):367-74.
 45. Stenson PD, Mort M, Ball EV, Shaw K, Phillips AD, Cooper DN. The Human Gene Mutation Database: building a comprehensive mutation repository for clinical and molecular genetics, diagnostic testing and personalized genomic medicine. *Hum Genet.* 2014;133(1):1-9.
 46. Stenson PD, Mort M, Ball E V., Evans K, Hayden M, Heywood S, et al. The Human Gene Mutation Database: towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies. *Hum Genet.* 2017;136(6):665–77.
 47. deLuise VP, Anderson DR. Primary infantile glaucoma (congenital glaucoma). *Survey of Ophthalmology.* 1983;28(1):1-19.
 48. Brito PR, Veitzman S. Causas de cegueira e baixa visão em crianças. *Arq Bras Oftalmol.* 2000;63(1):49-54.
 49. Yan J, Chan Y, Yan J, Chan Y, Choy BNK, Ng ALK, et al. Review on the Management of Primary Congenital Glaucoma. *J Curr Glaucoma Pract.* 2015;9(3):92-9.
 50. Allingham RR, Sharon FD, Sayoko EF, Douglas JM, Shields RMB, editors. *Shields Textbook of Glaucoma.* 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams Wilkins; 2012. p. 280.
 51. Ohtake Y, Tanino T, Suzuki Y, Miyata H, Taomoto M, Azuma N, et al. Phenotype of cytochrome P4501B1 gene (*CYP1B1*) mutations in Japanese patients with primary congenital glaucoma. *Br J Ophthalmol.* 2003;87(3):302-4.
 52. Weisschuh N, Wolf C, Wissinger B, Gramer E. A Clinical and molecular genetic

- study of german patients with primary congenital glaucoma. *Am J Ophthalmol.* 2009;147(4):744-53.
53. Tanwar M, Dada T, Sihota R, Dada R. Identification of four novel cytochrome P4501B1 mutations (p.I94X, p.H279D, p.Q340H, and p.K433K) in primary congenital glaucoma patients. *Mol Vis.* 2009;15(11):2926-37.
 54. Della Paolera M, de Vasconcellos JPC, Umbelino CC, Kasahara N, Rocha MN, Richeti F, et al. *CYP1B1* gene analysis in primary congenital glaucoma Brazilian patients: novel mutations and association with poor prognosis. *J Glaucoma.* 2010;19(3):176-82.
 55. Abu-Amero KK, Osman E a, Mousa A, Wheeler J, Whigham B, Allingham RR, et al. Screening of *CYP1B1* and *LTBP2* genes in Saudi families with primary congenital glaucoma: genotype-phenotype correlation. *Mol Vis.* 2011;17(11):2911-9.
 56. Fantes FE, Hanna KD, Waring GO, Pouliquen Y, Thompson KP, Savoldelli M. Wound healing after excimer laser keratomileusis (photorefractive keratectomy) in monkeys. *Arch Ophthalmol.* 1990;108(5):665-75.
 57. Suh W, Kee C. A clinical and molecular genetics study of primary congenital glaucoma in South Korea. *Br J Ophthalmol.* 2012;96(11):1372-7.
 58. Chen X, Chen Y, Wang L, Jiang D, Wang W, Xia M, et al. *CYP1B1* genotype influences the phenotype in primary congenital glaucoma and surgical treatment. *Br J Ophthalmol [Internet].* 2014;98(2):246-51.
 59. Al-haddad C, Abdulaal M, Badra R, Barikian A, Nouredine B, Farra C. Genotype / phenotype correlation in primary congenital glaucoma patients in the lebanese population: A pilot study. 2016;37(1):31-6.
 60. Geyer O, Wolf A, Levinger E, Harari-Shacham A, Walton DS, Shochat C, et al. Genotype/phenotype correlation in primary congenital glaucoma patients from different ethnic groups of the israeli population. *Am J Ophthalmol.* 2011;151(2): 263-71.
 61. Berraho A, Serrou A, Fritez N, El Annas A, Bencherifa F, Gaboun F, et al. Genotype-phenotype correlation in moroccan patients with primary congenital glaucoma. *J Glaucoma.* 2015;24(4):297-305.
 62. Cardoso MS, Anjos R, Vieira L, Ferreira C, Xavier A, Brito C. *CYP1B1* gene analysis and phenotypic correlation in Portuguese children with primary congenital glaucoma. *Eur J Ophthalmol.* 2015;25(6):474-7.

63. Yazdani S, Miraftebi A, Pakravan M, Ghahari E, Tousi BK, Sedigh M, et al. Phenotype and genotype correlation in Iranian primary congenital glaucoma patients. *J Glaucoma*. 2016;25(1):33-8.
64. Lim SH, Yanovitch TL, Freedman SF, Klemm T, Call W, Powell C, et al. *CYP1B1*, *MYOC*, and *LTBP2* Mutations in Primary Congenital Glaucoma Patients in the United States. *Am J Ophthalmol*. 2012;155(3):508-517.
65. Haddad MAO, Lobato FJC, Sampaio MW, Kara-José N. Pediatric and adolescent population with visual impairment: study of 385 cases. *Clinics*. 2006;61(3):239-46.
66. Moore DB, Tomkins O, Ben-Zion I. A review of primary congenital glaucoma in the developing world. *Surv Ophthalmol*. 2013;58(3):278-85.
67. International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems. 10th Revision (ICD-10) WHO. 2016. Available from: <<http://www.who.int/classifications/icd/en/>> Access in: 1 Aug 2017.
68. Papadopoulos M, Cable N, Rahi J, Khaw PT, Willshaw H, Ainsworth J, et al. The British Infantile and Childhood Glaucoma (BIG) Eye Study. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48(9):4100-6.
69. Rushood AA, Zahrani MH, Khamis A, Rushood AAA. Central corneal thickness in full-term Saudi newborns. *Acta Ophthalmol*. 2012;90(5):355-8.
70. Henriques MJ, Vessani RM, Reis FA, de Almeida G V, Betinjane AJ, Susanna Jr. R. Corneal thickness in congenital glaucoma. *J Glaucoma*. 2004;13(3):185-8.
71. Mendes MH, Sakata L, Betinjane AJ. Espessura corneana central e suas correlações com outros dados biométricos oculares em pacientes portadores de glaucoma congênito. *Arq Bras Oftalmol*. 2011;74(2):85-7.
72. Zenteno JC, Hernandez-Merino E, Mejia-Lopez H, Matías-Florentino M, Michel N, Elizondo-Olascoaga C, et al. Contribution of *CYP1B1* mutations and founder effect to primary congenital glaucoma in Mexico. *J Glaucoma*. 2008;17(3):189-92.
73. Belmouden A, Melki R, Hamdani M, Zaghoul K, Amraoui A, Nadifi S, et al. A novel frameshift founder mutation in the cytochrome P450 1B1 (*CYP1B1*) gene is associated with primary congenital glaucoma in Morocco. *Clin Gen*. 2002;62(4): 334-9.
74. Chitsazian F, Tusi BK, Elahi E, Saroei HA, Sanati MH, Yazdani S, et al. *CYP1B1*

- mutation profile of Iranian primary congenital glaucoma patients and associated haplotypes. *J Mol Diagnostics*. 2007;9(3):382-93.
75. Jansson I, Stoilov I, Sarfarazi M, Schenkman JB. Effect of two mutations of human *CYP1B1*, G61e and R469W, on stability and endogenous steroid substrate metabolism. *Pharmacogenetics*. 2001;11(9):793–801.
76. Medina-Trillo C, Ferre-Fernández J-J, Aroca-Aguilar J-D, Bonet-Fernández J-M, Escribano J. Functional characterization of eight rare missense *CYP1B1* variants involved in congenital glaucoma and their association with null genotypes. *Acta Ophthalmol*. 2016;94(7):e555-60.
77. Martin SN, Sutherland J, Levin A V, Klose R, Priston M, Héon E. Molecular characterisation of congenital glaucoma in a consanguineous Canadian community: a step towards preventing glaucoma related blindness. *J Med Genet*. 2000;37(6):422-7.



APÊNDICES

APÊNDICE A – Versão do manuscrito: Revista Plos One

***CYP1B1* gene and phenotypic correlation in patients from Northeastern of Brazil with primary congenital glaucoma**

Rodrigo E. A. Coelho^{1,2}, Dayse R. Sena^{1,3}, Bárbara C. F. S. Moura², Cristal C. Han², Flaviano N. Andrade⁴, Rodrigo P. C. Lira¹

1 Clinical Hospital, Federal University of Pernambuco (HC - UFPE), Recife, Pernambuco – Brazil, 2 Altino Ventura Foundation (FAV), Recife, Pernambuco – Brazil, 3 Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Recife, Pernambuco – Brazil, 4 Medical Course of Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco – Brazil

Financial support: Apoio Financeiro MEC / MCTI / CAPES / CNPQ / FAPS - # 735.884; Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA).

Conflicts of interest: The authors have no conflicts of interest to declare.

Keywords: *CYP1B1* gene, Genotype, Mutation, Phenotype, Primary congenital glaucoma

Correspondence: Rodrigo E. A. Coelho – Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE, 50670-901 – e-mail:reacoelho@hotmail.com

ABSTRACT

To explore *CYP1B1* mutations in patients from Northeastern of Brazil with primary congenital glaucoma (PCG) and their possible correlations with the clinical features of the disease. DNA sequencing analysis of the *CYP1B1* gene was used to screen 17 patients with PCG followed on Altino Ventura Foundation and Recife, Pernambuco, Brazil. The effect of mutations on the phenotype of the patients was also assessed. Presence and type of mutations in *CYP1B1* gene, age at evaluation, age at diagnosis, sex, laterality, kinship between parents, intraocular pressure, corneal diameter thickness, final visual acuity, cup/disc ratio, number of surgical interventions, and number of antiglaucoma medications required, and information from the medical record were noted. Mutations in the *CYP1B1* gene in 4 patients (23.5%) were detected, compound one homozygote and the others heterozygotes. Five types of mutations were identified: c.55C>T, c.182G>A, c241T>A, c.1209_1210insTCATGCCACC, and c.1310C>T. All patients with these mutations developed bilateral PCG, whereas in the group without mutations 13 (84.61%) showed bilateral disease. In all the variables (age at diagnosis, age at evaluation, IOP at evaluation, horizontal corneal diameter, bilaterality, corneal thickness, number of surgical interventions, number of antiglaucoma medications required, corneal haze, Haab'stries, buphthalmia, cup/disco ratio, sex blindness, besides consanguinity), no significant differences between the groups were detected ($p > 0.05$ for all comparisons). This study is the first to report the variety of mutations and SNPs in the *CYP1B1* gene in a group of patients from Northeastern of Brazil with PCG. Besides, it was not yet possible to establish a genotype-phenotype correlation.

Introduction

Primary congenital glaucoma (PCG) (PCG; OMIM 231300) [1] is a rare and severe genetic disease typically diagnosed during the first year of life as an important cause of childhood blindness worldwide [2]. The disease is hallmarked by an increase of intraocular pressure (IOP) secondary to obstruction of the drainage of the aqueous humor due to the defect of trabecular issue (anterior segment of the eye trabecular dysgenesis), which leads to the and optic nerve damage [3–5]. This type of glaucoma is not related to other ocular or systemic diseases. Other PCG clinical features include corneal edema, enlargement of the globe (buphthalmia), corneal enlargement and rupture of Descemet's membrane (Haab's Striae), besides photophobia, epiphora, and blepharospasm [6–8].

PCG is the most common type of glaucoma in childhood with an overall incidence rate of 1:10.000 births, which may range widely [9]. PCG exhibits a high prevalence in inbreed populations where consanguinity is common, such as in Saudi Arabia (1:2500) [6], among a Southern Indian population (1:3.300) [10] and among Slovakian gypsies (1:1.250) [11]. Previous studies have suggested that individual carriers of *CYP1B1* mutation that causes autosomal recessive congenital glaucoma may be higher than expected in the United States population [12]. Although most cases are sporadic, it is possible to recognize a genetic inheritance pattern in about 10 to 40% of them [13]. In the first previous study involving Brazilian patients, mutations related to *CYP1B1* gene were found in 50% of the individuals [14], however other study showed different rate (30%) [15].

Five chromosomal loci have been associated with the disease. The most important was the first, mapped on chromosome 2p21 (GLC3A); the second, on chromosome 1p36.2-p36.1 (GLC3B); the third, on chromosome 14q24.3 (GLC3C);

the fourth, on chromosome 14q24.2-q24.3 (GLC3D). The latter two are adjacent but do not overlap [16]; and the fifth, on chromosome 9p21.2 (GLC3E). However, only three genes were identified as causing primary congenital glaucoma: *CYP1B1* (cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1) in the GLC3A locus, *LTBP2* (latent protein binding factor of beta 2 growth) at the GLC3D and *TEK* (tyrosine kinase receptor) locus at the GLC3E locus. It is still attempted to clarify the role of the proteins encoded by these genes in the etiology of the disease [16–18].

Actually, more than 140 mutations related to *CYP1B1* gene coding sequence and PCG-linked have been reported [19, 20]. The incidence of *CYP1B1* gene mutations varies across geographic locations and different populations, being higher in inbred populations [11, 14, 21–26]. According to our literature search, there are few studies in Brazilian population with PCG, besides none has focused on the Northeastern of the country in the last ten years.

This study aims to determine the frequency and type of mutations in the *CYP1B1* gene of patients from Northeastern of Brazil with the diagnosis of PCG and try to establish a correlation between the changes found in pathogenic sequence of *CYP1B1* gene and clinical aspects of the disease.

Due to PCG can exhibit variable phenotype, we believe that in ethnically diverse populations such as the Northeastern of Brazil may have an important benefit on PCG care by earlier identification and treatment lowering unnecessary blindness.

Materials and Methods

Ethics Statement

This study followed the tenets of the Declaration of Helsinki and all participants or their legal persons signed the free and informed consent term. The study was

approved by the research ethical committee (proposal number # 1.783.121) of Health Sciences Center at Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

Homing patients

This was a cross-sectional observational study of patients with PCG followed on Altino Ventura Foundation (Recife, Pernambuco, Brazil). The sample included 17 Brazilian patients with PCG evaluated in the period from December 2016 to February 2017.

Seventeen nonrelated patients with PCG diagnosis in medical records underwent eye examination by means of slit lamp examination, fundoscopy, assessment of intraocular pressure with Goldmann or Perkins tonometer, measurement of cornea diameter and thickness as possible or under general anaesthesia if needed. Best corrected visual acuity was measure using the Snellen chart at twenty feet distance for those examined at the physician's office and not measure for whoever examined under general anaesthesia. The ultrasonic pachymetry was performed by means of the DGH4000B Pachymeter (DGH Technology, Inc., Exton, PA, USA). Ten consecutive measurements were performed in each eye (the mean was determined) after instillation of a drop of anesthetic eye drops. The corneal diameter measurement was performed with the aid of an ophthalmic compass. The patients were comfortably accommodated in the examination chair and the horizontal corneal diameter was determined. An interview asking about gender, parental consanguinity, age at disease onset, number of glaucoma medications and number of ocular surgeries was performed. Patients with ocular or nonocular findings compatible with secondary (or developmental) glaucoma and/or any other ocular or systemic disease that could lead to optic disc

abnormalities mimicking glaucomatous lesions would have been excluded from the study if had been mistakenly selected.

Analysis of *CYP1B1* gene

Genomic DNA was isolated from peripheral blood samples of all patients, according to standardized protocols. The genomic DNA was amplified by polymerase chain reaction (PCR) with GoTaq Green Master Mix reagent 2X (Promega, Madison, WI) according to vendor specifications using 3 pairs of specific primers corresponding to coding sequence and intronic flanking region of exons of the *CYP1B1* gene. After confirming the success of the 1% agarose gel amplification, the regions of interest of each patient were mixed in a single tube (performing a pool) and quantified in the Qubit 2.0 equipment. Each pool of different patients was prepared for second generation sequencing using Nextera XT DNA Library Prep Kit (Illumina) that works from the PCR product by tagging and adding adapters, according to the protocol provided by the manufacturer. The second-generation sequencing, also known as Next Generation Sequencing (NGS), in the Illumina MiSeq equipment (Illumina, San Diego, USA), uses the technology of sequencing each amplicon by synthesis in a MiSeq Reagent Kit V2 kit (composed of enzyme, dNTPs, fluorescently labeled ddNTPs and buffers) according to protocol and programs recommended by the manufacturer. After the result is acquired by the equipment, the raw data is processed by specific bioinformatics tools generating individual files per patient pool. The use of internal and external quality controls ensures that all steps, from sample preparation to release analysis, have yielded reliable results. The sequences produced were processed by a bioinformatics team and transformed into analyzable data.

Statistical analysis

The data were loaded into the Statistical Program for the Social Sciences (version 13.0; SPSS, Chicago, IL, USA). Mann-Whitney *U* test was done to compare means of the 2 independent samples and Fisher's exact test was done to compare categorical variables. A *p* value <0.05 was used for evidence of statistical significance.

Results

A total of 17 Brazilian patients with the diagnosis of PCG were analyzed, 8 (47.06%) of whom were female and 9 (52.94%) of whom were male. Among these 17 patients, 15 (88.24%) showed bilateral involvement. The age at diagnosis ranged between 0 and 9 years (mean 0.53 ± 2.18 years). In the clinical evaluation performed, horizontal corneal diameter ranged from 12 to 16 mm (mean 14.05 ± 1.42 mm) and mean IOP values were 17.31 ± 9.84 mm Hg. It was performed at least 2 surgical procedure in 18 eyes (52.9%) was required.

Analysis of *CYP1B1* gene

Mutations in the *CYP1B1* gene with pathologic significance were identified in 4 patients (23.5%). Most of these were missense mutations: c.182G>A, c.241T>A, and c.1310C>T. One nonsense (c.55C>T) and 1 frameshift (c.1209_1210insTCATGCCACC) were also detected. We find 1 case of homozygoty (Table 1).

Table 1 - *CYP1B1* gene mutations identified in patients from Northeastern of Brazil with the diagnosis of PCG

Patients	Nucleotide defect	Protein change	Exon	Cod on	Zigosity	Type of mutation
RC09	c.55C>T	p.Gln19stop	2 nd exon	19	Heterozygote	Nonsense
	c.241T>A	p.Tyr81Asn	2 nd exon	81	Heterozygote	Missense
RC15	c.1310C>T	p.Pro437Leu	3 rd exon	437	Heterozygote	Missense
	c.1209_1210insTCATGCCACC	p.Thr404fs	3 rd exon	404	Heterozygote	Frameshift
RC16	c.1310C>T	p.Pro437Leu	3 rd exon	437	Homozygote	Missense
RC17	c.1209_1210insTCATGCCACC	p.Ala404fs	3 rd exon	404	Heterozygote	Frameshift
	c.182G>A	p.Gly61Glu	2 nd exon	61	Heterozygote	Missense

PCG = primary congenital glaucoma.

All of the 5 mutations identified had previously been described in patients with PCG of different populations (c.55C>T, c.182G>A, c.241T>A, c.1209_1210insTCATGCCACC, and c.1310C>T) [17].

Nine alterations were reported as single nucleotide polymorphisms: c.-1-12C>T (intron 1–rs2617266); c.-1-14C>T (intron 1– rs4987134); c.1044-141_1044-140insT (intron 2– rs34468862); c.142C>G (R48G-exon 2–rs10012); c.355G>T (A119S–exon 2–rs1056827); c.729G>C (V243V–exon 2– rs9341249); c.1294C>G (V432L–exon 3–rs1056836); c.1347T>C (D449D– exon 3–rs1056837) and c.1358A>G (N453S–exon 3–rs1800440) (dbSNP-<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>).

Genotype-phenotype correlation

In order to study the relationship between genotype and phenotype, a comparison was made between the clinical findings of patients with mutation of the *CYP1B1* gene and the findings of patients without an identified mutation. To this end, several clinical parameters were assessed, such as age at diagnosis, age at evaluation, IOP at evaluation, horizontal corneal diameter, bilaterality, corneal thickness, number of surgical interventions, number of antiglaucoma

medications required, corneal haze, Haab'stries, buphthalmia, cup/disco ratio, sex, blindness, besides consanguinity.

While all patients (100%) in the group with mutation developed bilateral GCP, 11 (84.6%) showed bilateral disease in the group without mutation ($P = 1.000$). In all the variables, the differences did not reach statistical significance ($P > 0.05$ in all comparisons) (Table 2).

Table 2 - Clinical parameters and demographic profile of patients from Northeastern of Brazil with PCG and mutation of the *CYP1B1* gene and patients without identified *CYP1B1* gene mutations

Clinical parameters	Patients with mutation (n = 4)	Patients without mutation (n = 13)	p-Value
Sex, n (%)			
Female	3 (37.5)	5 (62.5)	0.294**
Male	1 (11.1)	8 (88.9)	
Consanguinity, n (%)	2 (40.0)	3 (60.0)	0.538**
Age at diagnosis, y	2.3 ± 4.5	0.00 ± 0.00	-----*
Age at evaluation, y	25.2 ± 15.6	28.5 ± 10.5	0.071*
Number of antiglaucoma medications required	3.5 ± 1.0	2.5 ± 1.3	0.111*
IOP at evaluation, mm Hg (RE/LE)	15.0 ± 2.4 / 12.5 ± 3.5	19.3 ± 9.7 / 16.6 ± 12.6	0.569 / 0.746*
Blindness in at least one eye	21.4	78.6	0.450**
Horizontal corneal diameter, mm (RE/LE)	13.6 ± 1.3 / 13.5 ± 2.1	14.0 ± 1.4 / 14.3 ± 1.6	0.605 / 0.478*
Corneal thickness, mm (RE/LE)	524.3 ± 20.6 / 523.0 ± 17.0	598.4 ± 111.0 / 557.6 ± 117.9	0.1117/ 0.814*
Number of surgical interventions (RE/LE), n (%)			
0-1	1 (14.3) / 3 (33.3)	6 (85.7) / 6 (66.7)	0.603 / 0.576**
≥ 2	3 (30.0) / 1 (12.5)	7 (70.0) / 7 (87.5)	
Corneal haze (RE/LE), n (%)	1 (16.7) / 0 (0,0)	5 (83.3) / 4 (100.0)	1.000 / 0.519**
Haab' strie (RE/LE), n (%)	0 (0.0) / 0 (0.0)	3 (100.0) / 6 (100.0)	0.541 / 0.237**
Buphthalmia (RE/LE), n (%)	1 (20.0) / 0 (0.0)	4 (80.0) / 4 (100.0)	1.000 / 0.519**
Cup/disc ratio (RE/LE)	0.5 ± 0.4 / 0. ± 0.4	0.8 ± 0.2 / 0.9 ± 0.3	0.404 / 0.073*

IOP = intraocular pressure; PCG = primary congenital glaucoma; Values are mean ± SD; (*) Mann-Whitney Test; (**) Fisher's Exact Test

Discussion

The *CYP1B1* gene is the gene most known to be associated with PCG in different populations. A large number of gene mutations causing PCG have been reported, with an incidence that varies among different ethnic groups and geographical location. However, the role of this gene in patients from Northeastern of Brazil with PCG has not been described, and there are few studies that have investigated its role in Brazilian populations [14, 15, 27, 28].

This study included 17 Brazilian patients diagnosed with PCG who were subjected to DNA sequence analysis of *CYP1B1* gene to determine the incidence and type of mutations in this gene. Possible correlations between the presence of mutations and the clinical aspects of the disease were also covered.

CYP1B1 gene mutations were identified in 4 (23.53%) of the 17 patients, in only one case it was homozygote. Five types of mutations were detected, all of them had already been identified in other populations [29–33], but c.182G>A and c.241T>A have never been cited in Brazilian patients. Besides according to our knowledge, the mutation c.55C>T was only reported in Brazil [14, 15].

The prevalence of mutations associated with the disease is variable in different populations and ethnicities. The rate of patients with the *CYP1B1* gene mutation found in our study (23.53%) is comparable to rates observed in other populations, such as in Mexico (10%), Japan (20%) and Portugal (28.57%) [34–36]. However, this rate is lower compared to that observed in populations with higher rates of consanguinity, such as in Morocco (40%), Iran (70%), Kuwait (70.6%) and Saudi Arabia and Slovakian gypsies (80-100%) [6, 11, 37–39]. In Brazil, different results were found by the authors: 50% by Stoilov et al. [3] and 30% by Della-Paolera et al. [15]; however, differently as made in this study, those Brazilian researches did not

included patients from Northeastern of Brazil, where live almost 57 million of people.

The six SNPs identified in exons in this study do not alter the disease phenotype and were previously described in affected individuals and healthy controls. Likewise, three SNPs were found in introns; of them, two (rs4987134 and rs34468862) had no citation found in the literature, but one (rs2617266) was described by Tanwar et al. [22].

Almost all of *CYP1B1* gene mutations identified were heterozygotes, showing that allelic heterogeneity presents in patients from Northeastern of Brazil with PCG, which is in agreement with the low rate of consanguinity existing in this region. Martin et al. [40] speculated that individuals with heterozygous *CYP1B1* gene mutations may exhibit less disease severity than those with homozygous changes. However, Lim et al. [41] observed in their cohort that both heterozygous cases and compound homozygotes had indiscriminately clinical courses of disease. This divergence of results is not well explained and possibly could be a consequence of regional differences, percentage of consanguine marriages, variety of surgical techniques, immediate access to the health service, postoperative follow-up time, composition of population samples studied and others factors not yet established.

Concerning the genotype-phenotype correlation in patients with PCG, it has shown great variability in relation to the *CYP1B1* gene and the primary congenital glaucoma. Weisschuh et al. [42] compared a group of patients with PCG with mutations in the *CYP1B1* gene with a non-mutating group e they did not observe significant differences between them in relation to the age of onset, the severity of the clinical features and the response to treatment, and they concluded that visual

outcome was poor regardless of the presence or absence of mutation. Campos-Mollo et al. [32] did not show statistically significant differences between carriers and non-mutation carriers in relation to ocular involvement, age of diagnosis, gender and number of surgical interventions. The present study also did not point to a statistically significant difference in phenotype among the population with PCG with and without mutation in the *CYP1B1* gene, although limiting the costs of the research and, consequently, the limited number of participants may have contributed to this conclusion. Other studies have reported similar results [6, 28].

However, other studies have reported that patients with PCG and mutations in the *CYP1B1* gene tended to have a more severe phenotype with an earlier onset age [8, 14, 16, 18, 35, 43], bilateral involvement [14,16, 44] and worse prognosis with more than one surgical intervention to reach the target IOP [15, 18, 43, 44]. Abu-Amero et al. [39] concluded that individuals with pathogenic variants of *CYP1B1* had higher rates of postoperative visits in terms of postoperative corneal opacity and the need for antiglaucomatous drugs than individuals without pathogenic variants.

In this study, the visual outcome was poor regardless of the presence or absence of mutation for most of the patients studied and there were no significant differences between the clinical findings of the cases with and without mutation. In addition, knowledge about PCG genetics is still far from complete and remains a challenge for further research. Thus, early identification of signs and symptoms of PCG and also of families bearing disease-related mutations can have a significant impact on the prediction of disease severity and may help predict surgical outcome. More efforts are needed to provide effectiveness, timely screening of children, and allocation of adequate resources to enable health professionals to reduce the rate of avoidable blindness in Brazil.

The major limitation of this study was the small sample size due to the high cost of genetic testing. However, it is statistically valid and showed important results. Two mutations that had not been previously related to PCG in Brazil (c.182G>A, c.241T>A) were identified.

This is the first study to report the variety of mutations in the *CYP1B1* gene in a group of patients from Northeastern of Brazil with PCG. Although limited in sample size, our analyses show that *CYP1B1* gene mutations did not were correlated to any clinical parameters.

References

1. Amberger JSS, Bocchini CAA, Schiettecatte F, Scott AFF, Hamosh A. OMIM.org: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®), an Online catalog of human genes and genetic disorders. *Nucleic Acids Res.* 2015; 43: D789–98.
2. Lewis CJ, Hedberg-Buenz A, DeLuca AP, Stone EM, Alward WLM, Fingert JH. Primary congenital and developmental glaucomas. *Hum Mol Genet.* 2017; R1: R28-R36. doi: [10.1093/hmg/ddx205](https://doi.org/10.1093/hmg/ddx205) PMID: [28549150](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28549150/)
3. Sarfarazi M, Stoilov I. Molecular genetics of primary congenital glaucoma. *Eye.* 2000; 14: 422–428. doi: [10.1038/eye.2000.126](https://doi.org/10.1038/eye.2000.126) PMID: 11026969
4. Bakunowicz-Lazarczyk A, Sulkowska M, Sulkowski S, Urban B. Ultrastructural changes in the trabecular meshwork of congenital glaucoma. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 2001; 33: 17–22. PMID: [11686399](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11686399/)
5. deLuise VP, Anderson DR. Primary infantile glaucoma (congenital glaucoma). *Survey of Ophthalmology*; 1983. p. 1–19.
6. Bejjani BA, Stockton DW, Lewis RA, Tomey KF, Dueker DK, Jabak M, et al. Multiple *CYP1B1* mutations and incomplete penetrance i an inbred population

- segregating primary congenital glaucoma suggest frequent de novo events and a dominant modifier locus. *Hum Mol Genet.* 2000; 9: 367–374. PMID: [10655546](#)
7. Kaur K, Mandal AK, Chakrabarti S. Primary congenital glaucoma and the involvement of *CYP1B1*. *Middle East Afr J Ophthalmol.* 2011; 18: 7–16. doi: [10.4103/0974-9233.75878](#) PMID: [21572728](#)
 8. Geyer O, Wolf A, Levinger E, Harari-Shacham A, Walton DS, Shochat C, et al. Genotype/phenotype correlation in primary congenital glaucoma patients from different ethnic groups of the israeli population. *Am J Ophthalmol.* 2011; 151: 263–271. doi:[10.1016/j.ajo.2010.08.038](#) PMID: [21168818](#)
 9. Sarfarazi M, Stoilov I, Schenkman JB. Genetics and biochemistry of primary congenital glaucoma. *Ophthalmol Clin North Am.* 2003; 16: 543–554. PMID: [14740995](#)
 10. Dandona L, Williams JD, Williams BC, Rao GN. Population-based assessment of childhood blindness in southern India. *Arch Ophthalmol.* 1998; 116: 545–546. PMID: [9565065](#)
 11. Plásilová M, Stoilov I, Sarfarazi M, Kádasi L, Feráková E, Ferák V. Identification of a single ancestral *CYP1B1* mutation in Slovak Gypsies (Roms) affected with primary congenital glaucoma. *J Med Genet.* 1999; 36: 290–294. PMID: [1734351](#)
 12. Wiggs JL, Langgurth AM, Allen KF. Carrier frequency of *CYP1B1* mutations in the United States (an American Ophthalmological Society thesis). *Trans Am Ophthalmol Soc.* 2014; 112: 94–102. PMID: [PMC4311669](#)
 13. Ho C, Walton D. Primary congenital glaucoma: 2004 update. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus.* 2004; 41: 271–288. PMID: [15478740](#)

14. Stoilov IR, Costa VP, Vasconcellos JPC, Melo MB, Betinjane AJ, Carani JCE, et al. Molecular genetics of primary congenital glaucoma in Brazil. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002; 43:1820–1827. PMID: [12036985](#)
15. Della Paolera M, de Vasconcellos JPC, Umbelino CC, Kasahara N, Rocha MN, Richeti F, et al. *CYP1B1* gene analysis in primary congenital glaucoma Brazilian patients: novel mutations and association with poor prognosis. *J Glaucoma.* 2010; 19: 176–182. doi: [10.1097/IJB.0b013e3181a98bae](#) PMID: [19528825](#)
16. Chen Y, Jiang D, Yu L, Katz B, Zhang K, Wan B, et al. *CYP1B1* and MYOC mutations in 116 Chinese patients with primary congenital glaucoma. *Arch Ophthalmol.* 2008; 126: 1443–1447. doi: [10.1001/archopht.126.10.1443](#) PMID: [18852424](#)
17. Stoilov I, Akarsu AN, Alozie I, Child A, Barsoum-Homsy M, Turacli ME, et al. Sequence analysis and homology modeling suggest that primary congenital glaucoma on 2p21 results from mutations disrupting either the hinge region or the conserved core structures of cytochrome P4501B1. *Am J Hum Genet.* 1998; 62: 573–584. doi: [10.1086/301764](#) PMCID: [PMC1376958](#)
18. López-Garrido MP, Medina-Trillo C, Morales-Fernandez L, Garcia-Feijoo J, Martínez-de-la-Casa JM, García-Antón M, et al. Null *CYP1B1* genotypes in primary congenital and nondominant juvenile glaucoma. *Ophthalmology.* 2013; 120: 716–723. doi: [10.1016/j.ophtha.2012.09.016](#) PMID: [23218183](#)
19. Stenson PD, Mort M, Ball EV, Evans K, Hayden M, Heywood S, et al. The Human Gene Mutation Database: towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies. *Hum Genet.* 2017; 136: 665–677. doi:

[10.1007/s00439-017-1779-6](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10.1007/s00439-017-1779-6/) PMCID: [PMC5429360](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC5429360/)

20. The Human Gene Mutation Database (HGMD®) [Internet]. [cited 2017 Sep 9]. Available from: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>
21. Stoilov I, Akarsu AN, Sarfarazi M. Identification of three different truncating mutations in cytochrome P4501B1 (*CYP1B1*) as the principal cause of primary congenital glaucoma (Buphthalmos) in families linked to the GLC3A locus on chromosome 2p21. *Hum Mol Genet.* 1997; 6: 641–647. PMID: [9097971](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9097971/)
22. Tanwar M, Dada T, Sihota R, Das TK, Yadav U, Dada R. Mutation spectrum of *CYP1B1* in North Indian congenital glaucoma patients. *Mol Vis.* 2009;15:1200–1209. PMID: [PMC2697458](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC2697458/)
23. Panicker SG, Mandal AK, Reddy ABM, Gothwal VK, Hasnain SE. Correlations of genotype with phenotype in Indian patients with primary congenital glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004; 45: 1149–1156. PMID: [15037581](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15037581/)
24. Colomb E, Kaplan J, Garchon H-J. Novel cytochrome P450 1B1 (*CYP1B1*) mutations in patients with primary congenital glaucoma in France. *Hum Mutat.* 2003; 22: 496. doi: [10.1002/humu.9197](https://doi.org/10.1002/humu.9197) PMID: [14635112](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14635112/)
25. Mashima Y, Suzuki Y, Sergeev Y, Ohtake Y, Tanino T, Kimura I, et al. Novel cytochrome P4501B1 (*CYP1B1*) gene mutations in Japanese patients with primary congenital glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001; 42: 2211–2216. PMID: [11527932](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11527932/)
26. Bejjani BA, Lewis RA, Tomey KF, Anderson KL, Dueker DK, Jabak M, et al. Mutations in *CYP1B1*, the gene for cytochrome P4501B1, are the predominant cause of primary congenital glaucoma in Saudi Arabia. *Am J Hum Genet* [Internet]. 1998; 62: 325–333. doi:[10.1086/301725](https://doi.org/10.1086/301725) PMCID: [PMC1376900](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC1376900/)
27. Sena D, Finzi S, Rodgers K, Del Bono E, Haines JL, Wiggs JL. Founder

- mutations of *CYP1B1* gene in patients with congenital glaucoma from the United States and Brazil. J Med. 2004;41: e6. PMID: [PMC1757259](#)
28. de Melo MBMBMB, Mandal AK, Tavares IM, Ali MH, Kabra M, De Vasconcellos JPCJPC, et al. Genotype-phenotype correlations in *CYP1B1*-associated primary congenital glaucoma patients representing two large cohorts from India and Brazil. PLoS One. 2015; 10: e0127147. doi: [10.1371/journal.pone.0127147](#) PMID: [PMC4433271](#)
29. Suh W, Kee C. A clinical and molecular genetics study of primary congenital glaucoma in South Korea. Br J Ophthalmol. 2012; 96: 1372–1377. doi: [10.1136/bjophthalmol-2012-301517](#) PMID: [22942166](#)
30. Chavarria-Soley G, Michels-Rautenstrauss K, Pasutto F, Flikier D, Flikier P, Cirak S, et al. Primary congenital glaucoma and Rieger's anomaly: extended haplotypes reveal founder effects for eight distinct *CYP1B1* mutations. Mol Vis. 2006; 12: 523–31. PMID: [16735994](#)
31. Reddy ABM, Kaur K, Mandal AK, Panicker SG, Thomas R, Hasnain SE, et al. Mutation spectrum of the *CYP1B1* gene in Indian primary congenital glaucoma patients. Mol Vis. 2004; 10: 696–702. PMID: [15475877](#)
32. Campos-Mollo E, Blanco-Marchite C, Garcia-Feijoo J, Peralta J, Belmonte-Martínez J, Ayuso C, et al. *CYP1B1* mutations in Spanish patients with primary congenital glaucoma : phenotypic and functional variability. 2009; 15: 417–31. PMID: [PMC2645906](#)
33. Hollander DA, Sarfarazi M, Stoilov I, Wood IS, Fredrick DR, Alvarado JA. Genotype and phenotype correlations in congenital glaucoma. Trans Am Ophthalmol Soc. 2006; 104: 183–195. PMID: [PMC1809895](#)
34. Ohtake Y, Tanino T, Suzuki Y, Miyata H, Taomoto M, Azuma N, et al.

- Phenotype of cytochrome P4501B1 gene (*CYP1B1*) mutations in Japanese patients with primary congenital glaucoma. *Br J Ophthalmol*. 2003; 87: 302–304. PMID: [PMC1771574](#)
35. Cardoso MS, Anjos R, Vieira L, Ferreira C, Xavier A, Brito C. *CYP1B1* gene analysis and phenotypic correlation in Portuguese children with primary congenital glaucoma. *Eur J Ophthalmol*. 2015; 25: 474–477. doi:[10.5301/ejo.5000618](#) PMID: [25952714](#)
36. Zenteno JC, Hernandez-Merino E, Mejia-Lopez H, Matías-Florentino M, Michel N, Elizondo-Olascoaga C, et al. Contribution of *CYP1B1* mutations and founder effect to primary congenital glaucoma in Mexico. *J Glaucoma*. 2008; 17: 189–192. doi: [10.1097/IJG.0b013e31815678c3](#) PMID: 18414103
37. Belmouden A, Melki R, Hamdani M, Zaghloul K, Amraoui A, Nadifi S, et al. A novel frameshift founder mutation in the cytochrome P450 1B1 (*CYP1B1*) gene is associated with primary congenital glaucoma in Morocco. *Clinical Genetics*. 2002; 62: 334–339. PMID: 12372064
38. Chitsazian F, Tusi BK, Elahi E, Saroei HA, Sanati MH, Yazdani S, et al. *CYP1B1* mutation profile of Iranian primary congenital glaucoma patients and associated haplotypes. *J Mol Diagnostics*. 2007; 9: 382–393. doi: [10.2353/jmoldx.2007.060157](#) PMID: [PMC1899412](#)
39. Abu-Amero KK, Osman E a, Mousa A, Wheeler J, Whigham B, Allingham RR, et al. Screening of *CYP1B1* and *LTBP2* genes in Saudi families with primary congenital glaucoma: genotype-phenotype correlation. *Mol Vis*. 2011; 17: 2911–2919. PMID: [PMC3224840](#)
40. Martin SN, Sutherland J, Levin A V, Klose R, Priston M, Héon E. Molecular characterisation of congenital glaucoma in a consanguineous Canadian

- community: a step towards preventing glaucoma related blindness. *J Med Genet.* 2000; 37: 422–427. PMID: [PMC1734606](#)
41. Lim SH, Yanovitch TL, Freedman SF, Klemm T, Call W, Powell C, et al. *CYP1B1*, *MYOC*, and *LTBP2* mutations in primary congenital glaucoma patients in the United States. *Am J Ophthalmol.* 2012; 155: 508–517. doi: [10.1016/j.ajo.2012.09.012](#) PMID: [PMC3736560](#)
42. Weisschuh N, Wolf C, Wissinger B, Gramer E. A clinical and molecular genetic study of German patients with primary congenital glaucoma. *Am J Ophthalmol.* 2009; 147: 744–753. doi: [10.1016/j.ajo.2008.11.008](#) PMID: [19195637](#)
43. Yazdani S, Miraftebi A, Pakravan M, Ghahari E, Tousi BK, Sedigh M, et al. Phenotype and genotype correlation in Iranian primary congenital glaucoma patients. *J Glaucoma.* 2016; 25: 33–38. doi: [10.1097/IJG.0000000000000206](#) PMID: [25580891](#)
44. Berraho A, Serrou A, Fritez N, El Annas A, Bencherifa F, Gaboun F, et al. Genotype-phenotype correlation in Moroccan patients with primary congenital glaucoma. *J Glaucoma.* 2015; 24: 297–305. doi:[10.1097/IJG.0b013e31829f99b7](#) PMID: [25826643](#)

APÊNDICE B – PROTOCOLO DA PESQUISA

QUESTIONÁRIO

ESTUDO DA PRESENÇA DAS MUTAÇÕES DO GENE *CYP1B1* EM PACIENTES COM GLAUCOMA CONGÊNITO PRIMÁRIO E CONTROLE NO NORDESTE DO BRASIL

1. Nome: _____
2. Registro/número do prontuário no HC – PE: _____ FAV: _____
3. Endereço: _____
4. Telefone de contato: _____
5. Data de nascimento: _____
6. Idade do início da doença: _____
7. Sexo: () M () F
8. História de consanguinidade entre os pais: Sim () Não ()
Qual parentesco: _____
9. Qual olho tem a doença: () direito () esquerdo () ambos
10. Foi operado Sim () Não ()
Qual cirurgia? _____
11. Usa colírio: Sim () Não ()
Qual: _____
12. Pressão intraocular em mmHg: olho direito: _____ olho esquerdo: _____
horário de aferição: _____ exame no ambulatório () sob sedação no bloco cirúrgico ()
13. Diâmetro corneano horizontal x vertical em mm: olho direito: ____ x ____
olho esquerdo ____ x ____
14. Biomicroscopia: olho direito: _____
olho esquerdo: _____

APÊNDICE C - Termo de Consentimento Livre Esclarecido



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO - UFPE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS - Resolução 466/12)

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa **ESTUDO DA PRESENÇA DAS MUTAÇÕES DO GENE CYP1B1 EM PACIENTES COM GLAUCOMA CONGÊNITO PRIMÁRIO E CONTROLE NO NORDESTE DO BRASIL**, que está sob a responsabilidade do (a) pesquisador (a) (Rodrigo Evaldo de Azevêdo Coelho, Avenida Moraes Rego, s/n, Hospital das Clínicas – Bloco A –térreo – Cidade Universitária – CEP. 50.670-420 – Recife - PE –Telefone: (81) 2126.8519 - E-mail para contato do pesquisador responsável : reacoelho@hotmail.com

Também participam desta pesquisa os pesquisadores: Dayse Ribeiro de Sena Telefones para contato: (81) 2126.8519, e-mail sena.dayse@gmail.com e está sob a orientação de Rodrigo Pessoa Cavalcanti Lira Telefone: (81) 2126.8519, e-mail rodrigopclira@hotmail.com

Caso este Termo de Consentimento contenha informações que não lhe sejam compreensíveis, as dúvidas podem ser tiradas com a pessoa que está lhe entrevistando e apenas ao final, quando todos os esclarecimentos forem dados, caso concorde com a realização do estudo pedimos que rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias, uma via lhe será entregue e a outra ficará com o pesquisador responsável. Caso não concorde, não haverá penalização, bem como será possível retirar o consentimento a qualquer momento, também sem nenhuma penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

O **objetivo principal** desta pesquisa é o de identificar mutações do gene *CYP1B1* em pacientes portadores de glaucoma congênito e etnicamente controles do Nordeste do Brasil e possíveis correlações com fenótipos bem caracterizados, além de qualquer mutação genética que, à primeira vista, não tenha uma relação óbvia com a doença oftalmológica em questão. A coleta de uma amostra de sangue será por punção de veia do braço de 5ml dos pacientes menores de 2 anos e 10 ml para os demais grupos etários e exame sob sedação no bloco cirúrgico para aqueles pacientes em que não for possível o exame oftalmológico ambulatorial. Após a coleta da amostra, o material será levado e armazenado em um banco de amostras do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA - UFPE). Posteriormente, será analisado no laboratório de sequenciamento genético Genomika.

Os **benefícios diretos** para os sujeitos abrangem a possibilidade de determinar a causa genética da doença relacionada ao gene *CYP1B1*, medidas preventivas e pode representar auxílio para outros indivíduos afetados na família. Os pacientes voluntários nesta pesquisa manterão seu acompanhamento na Fundação Altino Ventura e no setor de Oftalmologia do Hospital das Clínicas, ainda que desistam de participar em qualquer momento. Serão incluídos na pesquisa no grupo 1 os pacientes com glaucoma congênito e no grupo 2 os pacientes sem história de glaucoma. Serão excluídos da pesquisa os indivíduos com outras doenças oftalmológicas que não sejam glaucoma congênito.

Riscos: A retirada de sangue implica inserir uma agulha em uma veia do braço e isso é levemente incômodo, mas não é perigoso. Pode causar uma mancha roxa, mas ela desaparece. Às vezes, alguns pacientes têm que ser puncionados mais de uma vez em uma única sessão de retirada de sangue. Ocasionalmente, os pacientes podem sentir tonturas ou desmaiar durante ou imediatamente após a retirada de sangue. Isso, normalmente, é causado por ansiedade e desaparecerá após um período curto de tempo. Seus médicos sempre lhe informarão sobre a quantidade de sangue que será retirada de cada vez. Você tem toda liberdade para recusar-se a doar sangue para pesquisa. É importante informar seu médico (ou do menor sob sua responsabilidade) sobre qualquer quantidade de sangue que foi retirada em outros centros médicos para que o total de sangue retirado em um período de seis semanas possa ser mantido em limites seguros. Em casos raros, gotejamento lento de sangue no local da retirada ou infecção podem ocorrer. Para minimizar esse risco, o local da retirada do sangue será limpo antes com um antisséptico e será aplicada pressão após a retirada do sangue.

Período da pesquisa: início em Março de 2016 e se encerrará em Fevereiro de 2017, sendo feitos o exame oftalmológico e a coleta do material nos 6 primeiros meses em uma única visita à Fundação Altino Ventura ou ao Hospital das Clínicas – HC-UFPE e a análise do material, análise dos dados, discussão dos resultados, divulgação dos resultados finais e

conclusão do projeto, além da informação aos participantes e/ou responsáveis sobre as conclusões nos 6 meses seguintes.

ATENÇÃO:

Todas as informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa mediante entrevista ficarão armazenados em pastas de arquivo e computador pessoal, sob a responsabilidade do pesquisador e orientadores, no endereço acima informado pelo período de mínimo 5 anos.

Nada lhe será pago e nem será cobrado para participar desta pesquisa, pois a aceitação é voluntária, mas fica também garantida a indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação).

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: **(Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).**

(assinatura do pesquisador)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do **ESTUDO DA PRESENÇA DAS MUTAÇÕES DO GENE CYP1B1 EM PACIENTES COM GLAUCOMA CONGÊNITO PRIMÁRIO E CONTROLE NO NORDESTE DO BRASIL**, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo (a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento).

Impressão digital

(opcional)

Recife, _____

Assinatura do participante: _____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário e/ou responsável em participar.

(02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores)

Nome:

Assinatura:

Nome:

Assinatura:



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO - UFPE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(PARA RESPONSÁVEL LEGAL PELO MENOR DE 18 ANOS - Resolução 466/12)

Solicitamos a sua autorização para convidar o (a) seu/sua filho (a) _____ {ou menor que está sob sua responsabilidade} para participar como voluntário (a) da pesquisa **ESTUDO DA PRESENÇA DAS MUTAÇÕES DO GENE CYP1B1 EM PACIENTES COM GLAUCOMA CONGÊNITO PRIMÁRIO E CONTROLE NO NORDESTE DO BRASIL**, que está sob a responsabilidade do (a) pesquisador (a) (Rodrigo Evaldo de Azevêdo Coelho, Avenida Moraes Rego, s/n, Hospital das Clínicas – Bloco A –térreo – Cidade Universitária – CEP. 50.670-420 – Recife - PE –Telefone: (81) 2126.8519 - E-mail para contato do pesquisador responsável : reacoelho@hotmail.com

Também participam desta pesquisa os pesquisadores: Dayse Ribeiro de Sena Telefones para contato: (81) 2126.8519, e-mail sena.dayse@gmail.com e está sob a orientação de Rodrigo Pessoa Cavalcanti Lira Telefone: (81) 2126.8519, e-mail rodrigopclira@hotmail.com

Caso este Termo de Consentimento contenha informações que não lhe sejam compreensíveis, as dúvidas podem ser tiradas com a pessoa que está lhe entrevistando e apenas ao final, quando todos os esclarecimentos forem dados, caso concorde que o (a) menor faça parte do estudo pedimos que rubricue as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias, uma via lhe será entregue e a outra ficará com o pesquisador responsável.

Caso não concorde, não haverá penalização nem para o (a) Sr.(a) nem para o/a voluntário/a que está sob sua responsabilidade, bem como será possível ao/a Sr. (a) retirar o consentimento a qualquer momento, também sem nenhuma penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

O **objetivo principal** desta pesquisa é o de identificar mutações do gene *CYP1B1* em pacientes portadores de glaucoma congênito e etnicamente controles do Nordeste do Brasil e possíveis correlações com fenótipos bem caracterizados, além de qualquer mutação genética que, à primeira vista, não tenha uma relação óbvia com a doença oftalmológica em questão. A coleta de uma amostra de sangue será por punção de veia do braço de 5 ml dos pacientes menores de 2 anos e 10 ml para os demais grupos etários e exame sob sedação no bloco cirúrgico para aqueles pacientes em que não for possível o exame oftalmológico ambulatorial. Após a coleta da amostra, o material será levado e armazenado em um banco de amostras do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA - UFPE). Posteriormente, será analisado no laboratório de sequenciamento genético Genomika.

Os **benefícios diretos** para os sujeitos abrangem a possibilidade de determinar a causa genética da doença relacionada ao gene *CYP1B1*, medidas preventivas e pode representar auxílio para outros indivíduos afetados na família. Os pacientes voluntários nesta pesquisa manterão seu acompanhamento na Fundação Altino Ventura e no setor de Oftalmologia do Hospital das Clínicas, ainda que desistam de participar em qualquer momento. Serão incluídos na pesquisa no grupo 1 os pacientes com glaucoma congênito e no grupo 2 os pacientes sem história de glaucoma. Serão excluídos da pesquisa os indivíduos com outras doenças oftalmológicas que não sejam glaucoma congênito.

Riscos: A retirada de sangue implica inserir uma agulha em uma veia do braço e isso é levemente incômodo, mas não é perigoso. Pode causar uma mancha roxa, mas ela desaparece. Às vezes, alguns pacientes têm que ser puncionados mais de uma vez em uma única sessão de retirada de sangue. Ocasionalmente, os pacientes podem sentir tonturas ou desmaiar durante ou imediatamente após a retirada de sangue. Isso, normalmente, é causado por ansiedade e desaparecerá após um período curto de tempo. Seus médicos sempre lhe informarão sobre a quantidade de sangue que será retirada de cada vez. Você tem toda liberdade para recusar-se a doar sangue para pesquisa. É importante informar seu médico (ou do menor sob sua responsabilidade) sobre qualquer quantidade de sangue que foi retirada em outros centros médicos para que o total de sangue retirado em um período de seis semanas possa ser mantido em limites seguros. Em casos raros, gotejamento lento de sangue no local da retirada ou infecção podem ocorrer. Para minimizar esse risco, o local da retirada do sangue será limpo antes com um antisséptico e será aplicada pressão após a retirada do sangue.

Período da pesquisa: início em Março de 2016 e se encerrará em Fevereiro de 2017, sendo feitos o exame oftalmológico e a coleta do material nos 6 primeiros meses em uma única visita à Fundação Altino Ventura ou ao Hospital das Clínicas – HC-UFPE e a análise do material, análise dos dados, discussão dos resultados, divulgação dos resultados finais e

conclusão do projeto, além da informação aos participantes e/ou responsáveis sobre as conclusões nos 6 meses seguintes.

ATENÇÃO:

Todas as informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa mediante entrevista ficarão armazenados em pastas de arquivo e computador pessoal, sob a responsabilidade do pesquisador e orientadores, no endereço acima informado pelo período de mínimo 5 anos.

Nada lhe será pago e nem será cobrado para participar desta pesquisa, pois a aceitação é voluntária, mas fica também garantida a indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação).

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: **(Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).**

Assinatura do pesquisador (a)

CONSENTIMENTO DO RESPONSÁVEL PARA A PARTICIPAÇÃO DO/A VOLUNTÁRIO

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, responsável por _____, autorizo a sua participação no estudo **ESTUDO DA PRESENÇA DAS MUTAÇÕES DO GENE CYP1B1 EM PACIENTES COM GLAUCOMA CONGÊNITO PRIMÁRIO E CONTROLE NO NORDESTE DO BRASIL**, como voluntário(a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo (a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes da participação dele (a). Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de seu acompanhamento/ assistência/tratamento) para mim ou para o (a) menor em questão.

Impressão digital

(opcional)

Recife, _____

Assinatura do(a) responsável: _____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário e/ou responsável em participar.

(02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores)

Nome:

Assinatura:

Nome:

Assinatura:



ANEXOS

ANEXO A – Manuscrito enviado para publicação na Revista PLOS ONE:

De: "PLOS ONE" <em@editorialmanager.com>

Data: 30 de janeiro de 2018 09:58:12 BRT

Para: Rodrigo Coelho <reacoelho@hotmail.com>

Assunto: PLOS ONE Author Notice: Passed Tech Check - [EMID:596cc91e55bdaaab]

Responder A: PLOS ONE <plosone@plos.org>

CYP1B1 gene and phenotypic correlation in patients from Northeastern of Brazil with primary congenital glaucoma

Dear Mr Coelho,

Thank you for submitting your work to PLOS ONE. We are writing to let you know that your manuscript is progressing to assessment by an in-house editor for checks related to our editorial policies. Once complete it will proceed to review with an Academic Editor. This is part of our standard process for submissions and no action is required from you at this time.

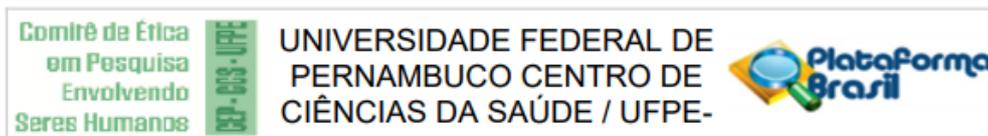
For your reference, our submission guidelines can be found on this page of our website: <http://journals.plos.org/plosone/s/submission-guidelines>.

Thank you for submitting your work to PLOS ONE.

Kind regards,

Thomas Brown
PLOS ONE

ANEXO B – Aprovação do projeto de pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO DA PRESENÇA DAS MUTAÇÕES DO GENE CYP1B1 EM PACIENTES COM GLAUCOMA CONGÊNITO PRIMÁRIO E CONTROLE NO NORDESTE DO

Pesquisador: Rodrigo Evaldo de Azevêdo Coelho

Área Temática: Projetos de pesquisa que envolvam organismos geneticamente modificados (OGM), células-tronco embrionárias e organismos que representem alto risco coletivo, incluindo organismos relacionados a eles, nos âmbitos de: experimentação, construção, cultivo, manipulação, transporte, transferência, importação, exportação, armazenamento, liberação no meio ambiente e descarte;

Versão: 2

CAAE: 58397416.2.0000.5208

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.783.121

Apresentação do Projeto:

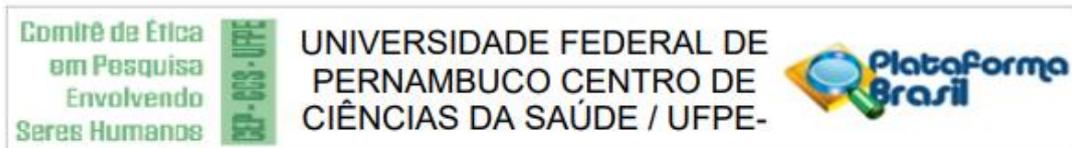
Trata-se de um projeto de mestrado do Programa de Cirurgia do departamento de pós graduação em Cirurgia da Universidade Federal de Pernambuco sob a responsabilidade do Oftalmologista Rodrigo Evaldo de Azevedo Coelho e sob a orientação do professor Doutor Rodrigo Pessoa Cavalcanti Lira e da Coorientação da Professora Dra. Dayse Figueiredo Ribeiro de Sena.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO GERAL

O objetivo principal deste projeto piloto será o de identificar mutações do gene CYP1B1 em pacientes portadores de glaucoma congênito e etnicamente controles do Nordeste do Brasil e possíveis correlações com fenótipos bem caracterizados.

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepocs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 1.783.121

/ Brochura Investigador	projetodetalhado2corrigido4do8.doc	13:33:10	Azevêdo Coêlho	Aceito
Outros	dayse.pdf	29/07/2016 11:26:41	Rodrigo Evaldo de Azevêdo Coêlho	Aceito
Folha de Rosto	digitalizar0004.pdf	28/07/2016 09:24:41	Rodrigo Evaldo de Azevêdo Coêlho	Aceito
Outros	cartadeanuenciadoservicohc.pdf	07/07/2016 08:07:44	Rodrigo Evaldo de Azevêdo Coêlho	Aceito
Outros	termodecompromissoeconfiabilidade.pdf	25/05/2016 10:18:31	Rodrigo Evaldo de Azevêdo Coêlho	Aceito
Outros	lattesrodrigocoelho.pdf	25/05/2016 10:04:20	Rodrigo Evaldo de Azevêdo Coêlho	Aceito
Outros	lattesrodrigolira.pdf	25/05/2016 09:28:23	Rodrigo Evaldo de Azevêdo Coêlho	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Sim

RECIFE, 20 de Outubro de 2016

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
(Coordenador)

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br

ANEXO C – Trabalho apresentado no VIII International Symposium on Diagnostics and Therapeutics (SINATER), III International Symposium on Rare Diseases (RDis) and LIKA Scientific Journey - 2017

CERTIFICATE



SINATER

19 - 21 September 2017

We certify that the work, titled **PHENOTYPE ASSOCIATED WITH PRIMARY CONGENITAL GLAUCOMA FROM NORTHEASTERN OF BRAZIL**, authored by **Coêlho, Rodrigo Evaldo de Azevêdo, Lira, Rodrigo Pessoa Cavalcanti, Moura, Bárbara de Carvalho Freire Santos, Han, Cristal Carvalho, Peres, Flaviano, Alves, JGB, Sena, Dayse**, was presented in the POSTER category during the event “VIII International Symposium on Diagnostics and Therapeutics (SINATER), III International Symposium on Rare Diseases (RDis) and XI LIKA Scientific Journey” (SigProj No. 270372.1384.121666.02052017), promoted by Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, Brazil, on 19th – 21th September 2017 (20 hours).



José Luiz de Lima Filho
Director of LIKA - UFPE
Coordinator of SINATER, RDis and
LIKA Scientific Journey - Recife, Brazil



James Owen
Professor of University College London
Coordinator of SINATER, RDis and
LIKA Scientific Journey - London, England

Organization:



Support:

