

# Mutações no gene MYOC/TIGR em uma população brasileira com glaucoma juvenil e glaucoma primário de ângulo aberto

*Mutations in the MYOC/TIGR gene in a Brazilian population with juvenile glaucoma and primary open angle glaucoma*

José Paulo Cabral de Vasconcellos <sup>(1)</sup>

Mônica B. Melo <sup>(2)</sup>

Fernando Menezes <sup>(3)</sup>

Daniela Miti Lemos Tsukumo <sup>(4)</sup>

Vital Paulino Costa <sup>(5)</sup>

Newton Kara-José <sup>(6)</sup>

Fernando F. Costa <sup>(7)</sup>

## RESUMO

**Objetivo:** Avaliar a frequência e o tipo de mutação no gene “trabecular meshwork-induced glucocorticoid response protein” (MYOC/TIGR) entre pacientes com glaucoma primário de ângulo aberto (GPAA) e glaucoma juvenil de ângulo aberto (GJAA).

**Métodos:** DNA genômico foi extraído a partir de sangue periférico de pacientes com GPAA e GJAA. Posteriormente foram realizados PCR e SSCP para identificar possíveis mutações no gene MYOC/TIGR, os quais foram confirmados por meio de análise por sequenciamento.

**Resultados:** Foram estudados dezenove pacientes com GJAA. Oito pacientes (42%) apresentaram uma mutação de ponto no codon 433 (exon 3), ocasionando a substituição de uma cisteína (TGT) por uma arginina (CGT). Entre os pacientes com GPAA (n = 52), foram encontrados dois (3,8%) com mutação no gene MYOC/TIGR. Um deles mostrou uma mutação de ponto no aminoácido 368, substituindo uma glutamina por um codon de terminação e o outro paciente apresentou a mesma mutação observada nos pacientes com GJAA.

**Conclusão:** Identificou-se uma nova mutação no gene MYOC/TIGR em pacientes brasileiros com GPAA e GJAA. A ocorrência de mutações no gene MYOC/TIGR em 42% dos pacientes com GJAA assim como em 3,8% dos pacientes com GPAA poderia ser maior, uma vez que o gene não foi estudado em sua totalidade (apenas 400 pb do exon 3).

**Palavras-chave:** Glaucoma juvenil; Glaucoma primário de ângulo aberto; Gene MYOC; Gene TIGR.

<sup>(1)</sup> Aluno de Pós-Graduação no Setor de Oftalmologia da UNICAMP

<sup>(2)</sup> Doutora pelo Departamento de Genética e Evolução do Instituto de Biologia da UNICAMP

<sup>(3)</sup> Aluno terceiro ano de residência oftalmologia UNICAMP.

<sup>(4)</sup> Aluna de Iniciação Científica - FCM – UNICAMP (bolsista – CNPq)

<sup>(5)</sup> Chefe do Setor de Glaucoma da UNICAMP, Médico Assistente do Hospital das Clínicas da FMUSP e Doutor em Medicina pela Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de São Paulo.

<sup>(6)</sup> Professor Titular de Oftalmologia, Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP e Professor Associado, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

<sup>(7)</sup> Professor Titular do Departamento de Clínica Médica-Disciplina de Hematologia da UNICAMP.

**Endereço para Correspondência:** José Paulo C. de Vasconcellos. Av. Anchieta, 636. Ap 151 - Centro - Campinas (SP) CEP 13015-101.

## INTRODUÇÃO

O glaucoma juvenil de ângulo aberto (GJAA) é um subtipo de glaucoma de ângulo aberto caracterizado pelo início precoce (10 a 35 anos de idade), não apresentando outras alterações oculares, exceto pelo aumento da pressão intraocular (PIO) e dano glaucomatoso do nervo óptico <sup>1</sup>. GJAA mostra um padrão de transmissão autossômica dominante com alta penetrância <sup>2</sup>, o que permitiu a vários autores investigarem famílias acometidas com GJAA na tentativa de identificar o gene ou genes associados com esta condição <sup>3-9</sup>. Vários autores estudando famílias com GJAA através de análise genética por “linkage” identificaram uma região ou locus (GLC1A) no cromossomo 1q21-q31 <sup>3-6, 8, 9</sup>.

GLC1A é o nome dado ao primeiro locus relacionado com o glaucoma de ângulo aberto. Posteriormente, outros autores identificaram novas regiões associadas com o glaucoma de ângulo aberto sendo então denominadas GLC1B<sup>10</sup> e GLC1C<sup>11</sup>.

Stone e cols<sup>9</sup> conseguiram identificar o gene “trabecular meshwork-induced glucocorticoid response protein” (TIGR) como um dos genes responsáveis pelo GJAA, e ainda observaram a incidência de 3,94 % de mutações no gene TIGR entre pacientes com glaucoma primário de ângulo aberto (GPAA). Os autores descreveram três tipos diferentes de mutação que não foram encontradas em voluntários normais.

Recentemente, constatou-se que o gene TIGR tinha a mesma sequência do gene Myocilin (MYOC) encontrado em células fotoreceptoras<sup>12</sup>. Por isso, a partir deste momento chamaremos o gene associado ao locus GLC1A de gene MYOC/TIGR.

Este estudo visou investigar a ocorrência de mutações no gene MYOC/TIGR em pacientes com GJAA ou GPAA.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### ***Pacientes***

Pacientes com GJAA ou GPAA acompanhados no Serviço de Glaucoma da UNICAMP foram incluídos no estudo. Todos os pacientes foram submetidos a avaliação oftalmológica incluindo gonioscopia, exame biomicroscópico do segmento anterior, tonometria de aplanção, avaliação do nervo óptico sob visão binocular e perimetria computadorizada (Humphrey 630 programa 30-2) para confirmação diagnóstica. Considerou-se como portador de GJAA paciente com PIO maior do que 22 mmHg e lesão glaucomatosa característica do nervo óptico e perda correspondente do campo visual na presença de ângulo aberto em indivíduos com idade inferior a 35 anos. GPAA foi definido com os mesmos critérios usados para GJAA com exceção da idade mínima ao diagnóstico ser igual a 40 anos.

### ***Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)***

Foram coletados 5 ml de sangue periférico de cada paciente. Posteriormente DNA genômico foi extraído usando o reagente “DNAzol” segundo as instruções do fabricante (GIBCO/BRL, Gaithersburg, MD). Dois pares de iniciadores foram designados para amplificar os exons A e B do gene MYOC/TIGR (exon A e exon B do gene MYOC/TIGR com 190 e 195 pares de base (pb) respectivamente, segundo Stone e cols<sup>9</sup>). Os exons A e B, na verdade, correspondem a parte do exon 3 do gene MYOC/TIGR (exon A - aminoácido 412 a 476, exon B aminoácido - 317 a 379 número de acesso no “Gene Bank” HSU85257). A amplificação foi realizada através da reação em cadeia da polimerase (PCR) pelo método modificado de Saiki e cols<sup>13</sup>. A reação de PCR continha 50 (lendo 100 ng de DNA, 20 pmol de cada iniciador, 10 mM de Tris (pH 8,6), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 50 mM de KCl, 0,01% de

gelatina, 0,2 mM de nucleotídeos misturados, 5% de formamida, e 0,25 unidades de Taq DNA polimerase (GIBCO/BRL, Gaithersburg, MD). A PCR foi realizado com 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 64°C e 1 minuto a 72°C. Finalmente, foi realizada eletroforese em gel de agarose 1,5% e os fragmentos amplificados de DNA observados sob luz ultra-violeta (UV).

### ***Polimorfismo de Conformação de Fita Simples de DNA (SSCP)***

A análise pelo SSCP de acordo com modificação do método de Orita e cols<sup>14</sup> foi realizado no aparelho “PhastSystem” (Pharmacia, Uppsala, Sweden). O produto da PCR foi diluído 1:1 com tampão de corrida (formamida 95%, EDTA 10 mmol/L pH 8,0, azul de bromofenol 0,1%), desnaturado por 3 minutos e mantido em gelo até a eletroforese em gel homogêneo de agarose 20% com tiras de agarose usadas como tampão. As condições de eletroforese para ambos os exons foram: pré-corrida: 400 V, 5,0 mAmp, 1,0 W, 15°C, 10Vh; aplicação das amostras: 2,5 V, 5,0 mAmp, 1,0 W, 15°C, 2 Vh; corrida: 400V, 5,0 mAmp, 1,0 W, 15°C, 350 Vh. As bandas de DNA foram visualizadas através de coloração pela prata envolvendo lavagens consecutivas em ácido tricloroacético 20% (5 minutos - 20°C), glutaraldeído 5% (5 minutos - 50°C), água (2 lavagens de 30 segundos cada - 30°C), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2,5% - 0,013% formaldeído (4 minutos - 30°C), ácido acético 5% (2 minutos - 50°C) e glicerol 13% (3 minutos - 50°C).

### ***Análise por Sequenciamento***

Amostras com padrão de mobilidade eletroforética anormal detectada pelo SSCP foram sequenciadas. A análise por sequenciamento foi realizada usando o Kit “Thermo Sequenase Cycle Sequencing” com  $\gamma$ -<sup>32</sup>P ATP (Amersham Life Science, Inc., Cleveland, Ohio), segundo instruções do fabricante. As posições das mutações foram baseadas na sequência completa do gene MYOC/TIGR (número de acesso ao “Gene Bank” HSU85257).

## **RESULTADOS**

Dezenove pacientes com GJAA foram estudados. A idade média foi de 26,7 ± 6,65 anos. Nove pacientes (47,3%) eram do sexo masculino, e 10 pacientes (52,6%) do sexo feminino; 10 (52,6%) eram brancos, 8 (42,1%) eram negros, e 1 (5,3%) era de origem asiática. A PIO média foi de 31,25 ± 13,7 mmHg obtida no primeiro exame. Oito (42%) pacientes apresentaram uma mutação de ponto no exon 3 (aminoácido 433), uma transição de timina (T) para citosina (C) em heterozigose, substituindo uma cisteína (TGT) por uma arginina (CGT) [figuras 1 e 2]. Nove pacientes (47,4%) apresentaram história familiar positiva para glaucoma, sendo que seis pacientes com mutação tinham história familiar positiva. Quatro pacientes portadores da mutação vinham de 2 famílias diferentes, portanto se forem considerados apenas pacientes provenientes de famílias diferentes, teríamos 35,3% (6/17) de incidência da



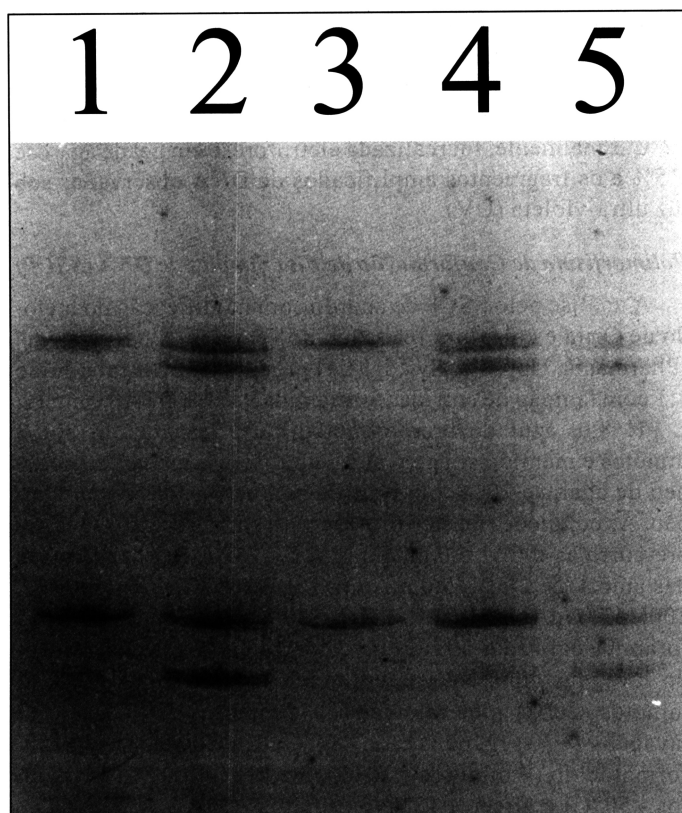


Fig. 1 - Gel de SSCP corado com prata mostrando o produto da PCR com 195 pb compreendendo os aminoácidos de 412 a 476 do gene MYOC/TIGR. Linha 1: controle. Linhas 2-5: amostras de pacientes com GJAA. Amostras 2, 4 e 5 mostram padrão de mobilidade diferente do controle.

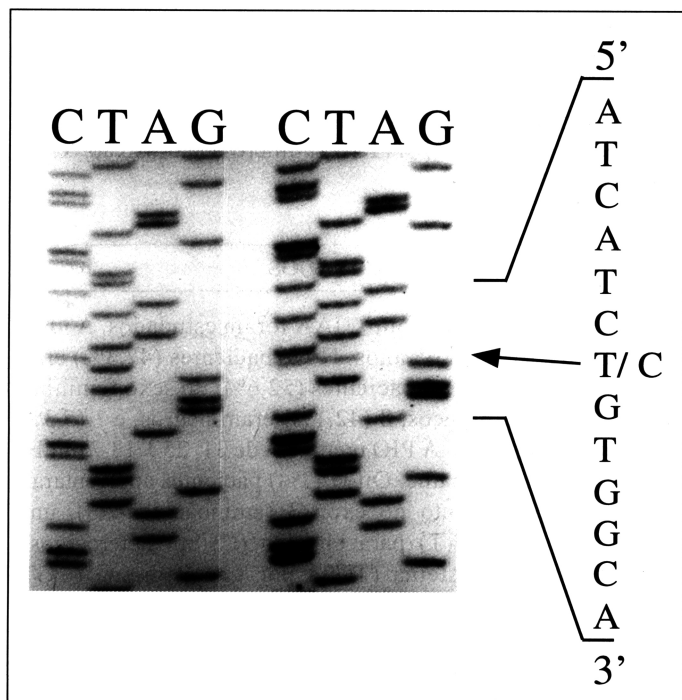


Fig. 2 - Sequenciamento do produto da PCR mostrando a substituição de T para C no codon 433 do gene MYOC/TIGR que troca o aminoácido Cys (TGT) por Arg (CGT). A flecha indica o exato local da mutação.

mutação. A mutação estava presente em 6 (75%) pacientes brancos e 2 (25%) pacientes negros. Não houve associação significativa entre raça ( $p = 0,18$ ), história familiar positiva para glaucoma ( $p = 0,11$ ) e ocorrência de mutação.

Cinquenta e dois pacientes com GPAA foram incluídos neste estudo (idade média de  $67,3 \pm 11,1$  anos). Vinte e nove pacientes (55,8%) eram do sexo masculino e 23 (44,2%) do sexo feminino. Trinta e cinco (67%) eram brancos e 17 (32,7%) eram negros. A PIO média no momento da colheita do sangue era de  $20,53 \pm 7,37$  mmHg e 24 pacientes (46,2%) haviam sido submetidos a procedimento cirúrgico para controle pressórico. Entre os pacientes com GPAA, um apresentou a mutação glutamina para codon de terminação no aminoácido 368 e o outro paciente era positivo para a mesma mutação descrita acima (cisteína para arginina no aminoácido 433). Portanto, dois pacientes (3,8%) com GPAA foram positivos para mutação no gene MYOC/TIGR. Ambos os pacientes eram brancos e tinham história familiar positiva.

## DISCUSSÃO

O glaucoma é uma das principais causas de cegueira irreversível no mundo. É uma doença de evolução lenta, diagnosticada somente após lesão típica do nervo óptico. Entre os glaucomas de ângulo aberto, o GJAA é uma forma rara com início mais precoce e pior prognóstico em relação ao GPAA<sup>1</sup>.

O locus GLC1A no cromossomo 1q21-q31 foi identificado primeiramente por Sheffield e cols<sup>3</sup>, que investigaram uma família com 30 membros acometidos. Posteriormente outros autores confirmaram o mesmo locus para pacientes com GJAA. Richards e cols<sup>4</sup> identificaram este locus em uma família caucasiana, enquanto Wiggs e cols<sup>6</sup> demonstraram-no em 5 famílias de descendência britânica, irlandesa, alemã e do pacífico sul. Mais recentemente, Mourissette e cols<sup>7</sup>, confirmaram este locus (cromossomo 1q) estudando uma população francesa com GJAA e GPAA. Em 1997, Stone e cols<sup>9</sup> identificaram o gene MYOC/TIGR como um dos genes relacionados com o glaucoma de ângulo aberto. Mutações de ponto no gene MYOC/TIGR (glicina para valina, glutamina para codon de terminação e tirosina para histidina) foram identificadas não apenas em pacientes com GJAA, como também em 4,4% dos pacientes com GPAA com história familiar positiva e em 2,9% dos pacientes com GPAA sem história de glaucoma na família.

Neste estudo, a população de pacientes com GJAA e GPAA foi avaliada para a presença de mutações no exon 3 do gene MYOC/TIGR, incluindo cerca de 400 pb. Entre os pacientes com GJAA, a frequência de mutações foi de 35,3% (6/17) considerando pacientes provenientes de diferentes famílias. A mutação por nós identificada está localizada no aminoácido 433 (exon 3) do gene MYOC/TIGR, e inclui a substituição de cisteína por arginina. Trata-se de uma mutação descrita pela primeira vez na literatura mundial. Dois (3,8%)

pacientes com GPAA também exibiram mutações no gene MYOC/TIGR: um deles era portador da mutação de ponto substituindo uma glutamina por um codon de terminação no aminoácido 368, a mutação mais comum identificada por Stone e cols.<sup>9</sup>. O outro paciente era portador da mesma mutação descrita acima (cisteína para arginina).

Atualmente, sabe-se que o gene MYOC/TIGR é composto por 3 exons de 604, 126 e 785 pb respectivamente (número de acesso no "Gene Bank" Z97171, Z97174). Respeitando a sequência completa, nossos iniciadores eram capazes de avaliar 400 pb do exon 3. A nova mutação foi encontrada no aminoácido 433 do exon 3. Apesar da maioria das mutações descritas serem localizadas no exon 3<sup>15</sup>, a frequência de mutações na população estudada poderia ser até maior, uma vez que o gene inteiro não foi avaliado e os métodos não tem sensibilidade absoluta (100%).

A presença de uma nova mutação em pacientes brasileiros pode ser parcialmente justificada por se tratar de uma população com características raciais distintas das demais estudadas, e portanto com um "background" genético diferente.

A baixa frequência de mutações encontradas no gene MYOC/TIGR entre pacientes com GPAA é semelhante à encontrada por Stone e cols.<sup>9</sup>. Outros autores não foram capazes de identificar o mesmo locus 1q21-q31 para famílias com GPAA<sup>16,17</sup>. Stoilova e cols.<sup>10</sup> localizaram um outro locus (GLC1B) para GPAA no cromossomo 2cen-q13, enquanto Wirtz e cols.<sup>11</sup>, mapeando uma família de 48 membros, identificaram no cromossomo 3q a região provável para o gene associado com GPAA. Estes achados sugerem que o GPAA seja uma condição geneticamente heterogênea, o que explicaria a baixa frequência de mutações no gene MYOC/TIGR encontrada em nossa população de pacientes com GPAA. Na verdade, é possível que vários loci estejam envolvidos na etiologia desta moléstia<sup>15</sup>.

Apesar dos mecanismos envolvidos na associação do GJAA e GPAA com o gene MYOC/TIGR não estarem completamente esclarecidos<sup>12,18</sup>, não é impossível pensar que, uma vez esclarecida sua fisiopatologia, novas e melhores maneiras para tratar o glaucoma sejam desenvolvidas. No futuro, a avaliação do gene MYOC/TIGR poderá ser usada como teste de "screening" indentificando indivíduos susceptíveis na população. Finalmente, a modificação da estrutura do gene através da terapêutica genética poderá impedir as alterações induzidas pela mutação, e com isto evitar o desenvolvimento do glaucoma, muito antes do aparecimento de dano glaucomatoso ou defeito de campo visual.

## SUMMARY

**Purpose:** To evaluate the frequency and type of mutation in the trabecular meshwork-induced glucocorticoid response protein (MYOC/TIGR) gene among Brazilian patients with juvenile open angle glaucoma (JOAG) and primary open angle glaucoma (POAG).

**Methods:** The genomic DNA of consecutive patients with POAG and JOAG was extracted from peripheral blood. Subsequently, PCR and SSCP were performed to identify possible mutations in the MYOC/TIGR gene, which were confirmed by sequencing analysis.

**Results:** Nineteen patients with JOAG were studied. Eight patients (42%) showed a single mutation in exon 3 at amino acid 433, which codifies an arginine (CGT) instead of a cysteine (TGT). Among patients with POAG (n = 52), we found two (3.8%) with a mutation in the MYOC/TIGR gene. One of them showed a point mutation at amino acid 368, codifying a stop codon instead of a glutamine. The other patient had the same mutation as those observed in JOAG patients.

**Conclusion:** A new mutation in the MYOC/TIGR gene in Brazilian patients with JOAG and POAG was reported. The occurrence of mutations in the MYOC/TIGR gene in 42% of Brazilian patients with JOAG as well as in 3.8% of those with POAG could be even higher, since the full gene was not evaluated (only 400 bp of exon 3).

**Keywords:** Juvenile glaucoma; Primary open angle glaucoma; MYOC gene; TIGR gene.

## REFERENCIAS

1. Dickens CJ, Hoskins HD. Epidemiology and pathophysiology of congenital glaucoma. Kathryn H. Falk, ed. The Glaucomas (Clinical Science). St. Louis, Mosby-Year Book, 1996:729-38.
2. Johnson AT, Drack AV, Kwitek AE et al. Clinical features and linkage analysis of a family with autosomal dominant juvenile glaucoma. *Ophthalmology* 1993;100:525-9.
3. Sheffield VC, Stone EM, Alward WLM et al. Genetic linkage of familial open angle glaucoma to chromosome 1q21-q31. *Nat Genet* 1993;4:47-50.
4. Richards JE, Lichter PR, Boehnke M et al. Mapping of a gene for autosomal dominant juvenile-onset open-angle glaucoma to chromosome 1q. *Am J Hum Genet* 1994;54:62-70.
5. Wiggs JL, Haines JL, Pagliniuan C et al. Genetic linkage of autosomal dominant juvenile glaucoma to 1q21-q31 in three affected pedigrees. *Genomics* 1994;21:299-303.
6. Wiggs JL, Del Bono EA, Schuman JS et al. Clinical features of five pedigrees genetically linked to the juvenile glaucoma locus on chromosome 1q21-q31. *Ophthalmology* 1995;102:1782-9.
7. Morissette J, Côté G, Ancil JL et al. A common gene for juvenile and adult-onset primary open-angle glaucomas confined on chromosome 1q. *Am J Hum Genet* 1995;56:1431-42.
8. Johnson AT, Richards JE, Boehnke M et al. Clinical phenotype of juvenile-onset primary open-angle glaucoma linked to chromosome 1q. *Ophthalmology* 1996;103:808-14.
9. Stone EM, Fingert JH, Alward WLM et al. Identification of a gene that causes primary open angle glaucoma. *Science* 1997;275:668-70.
10. Stoilova D, Child A, Trifan OC et al. Localization of a locus (GLC1B) for adult-onset primary open angle glaucoma to the 2cen-q13 region. *Genomics* 1996;36:142-50.
11. Wirtz MK, Samples JR, Kramer PL et al. Mapping a gene for adult-onset primary open angle glaucoma to chromosome 3q. *Am J Hum Genet* 1997;60:296-304.
12. Polansky JR, Fauss DJ, Chen P et al. Cellular pharmacology and molecular biology of the trabecular meshwork inducible glucocorticoid response gene product. *Ophthalmologica* 1997;211:126-39.
13. Saiki SK, Gelfand DH, Stoffel S et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988;239:487-91.
14. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H et al. Detection of polymorphisms of human

DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. Proc Natl Acad Sci USA 1989;86:2766-70.

15. Sarfarazi M. Recent advances in molecular genetics of glaucomas. Hum Mol Genet 1997;6:1667-77.
16. Richards JE, Lichter PR, Herman S et al. Probable exclusion of GLC1A as a candidate glaucoma gene in a family with middle age-onset primary open angle glaucoma. Ophthalmology 1996;103:1035-40.
17. Avramopoulos D, Kitsos G, Economou-Petersen E et al. Exclusion of one pedigree

affected by adult onset primary open angle glaucoma from linkage to the juvenile glaucoma locus on chromosome 1q21-q31. J Mol Genet 1996;33:1043-4.

18. Adam MF, Belmouden A, Binisti P et al. Recurrent mutations in a single exon encoding the evolutionary conserved olfactomedin-homology domain of MYOC/TIGR in familial open-angle glaucoma. Hum Mol Genet 1997;6:2091-7.
19. Polansky JR, Fauss DJ, Chen P et al. Cellular pharmacology and molecular biology of the trabecular meshwork inducible glucocorticoid response gene product. Ophthalmologica 1997;211:126-39.



**XXX  
Congresso  
Brasileiro de  
Oftalmologia**

## **XXX CONGRESSO BRASILEIRO DE OFTALMOLOGIA**

**4 a 7 de setembro de 1999**

**Centro de Convenções de Pernambuco – Recife – PE**

**Tema Oficial:**

**Retina Clínica e Cirúrgica**

### **Comissão Executiva**

**Presidente:**

**Marcelo Ventura**

**Presidente de Honra:**

**Geraldo Vicente de Almeida**

**Vice-Presidentes:**

**Afonso Medeiros  
Francisco Cordeiro  
Ronald Cavalcanti**

**Secretários Gerais:**

**Ely Almeida Santos  
Saulo Gorenstein  
Vasco Bravo**

**Secretários Executivos:**

**Fernando Cunha  
Luis Aramando Gondim  
Pedro Gondim**

**Tesoureiros:**

**Fernando Ventura  
Flávia Emery  
Theóphilo de Freitas**

### **Convidados Internacionais Confirmados:**

**Scheffer Tseng, EUA  
William Driebe, EUA  
Kirk Paco, EUA  
Donald Damico, EUA**

**William de La Peña, EUA  
Stanley Chang, EUA  
Eduardo Alfonso, EUA  
Ilda Capo, EUA**

## **Recife, aqui é o lugar!**

### **INFORMAÇÕES: CBO Eventos**

**Al. Santos, 1343 - Cj. 1.110 - Cep: 01419-001 – São Paulo – SP  
Tel: 011 284 9020 - Fax: 011 285 4509 - Email: eventos@cbo.com.br**