

**Hévilá Tamar Rolim Lima**

**AVALIAÇÃO DO GENE *CYP1B1* E DA  
ANCESTRALIDADE GENÔMICA NO  
GLAUCOMA CONGÊNITO PRIMÁRIO**

Orientador: Prof. Sebastião Cronemberger

Coorientador: Prof. Luiz Armando De Marco

Faculdade de Medicina

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2013

**Hévila Tamar Rolim Lima**

**AVALIAÇÃO DO GENE *CYP1B1* E DA  
ANCESTRALIDADE GENÔMICA NO  
GLAUCOMA CONGÊNITO PRIMÁRIO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Medicina.

Área de concentração: Oftalmologia

Orientador: Prof. Sebastião Cronemberger

Coorientador: Prof. Luiz Armando De Marco

Faculdade de Medicina  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Belo Horizonte

2013

L732a Lima, Hévila Tamar Rolim.  
Avaliação do gene CYP1B1 e da ancestralidade genômica no glaucoma congênito primário [manuscrito]. / Hévila Tamar Rolim Lima. - - Belo Horizonte: 2013.  
115f.: il.  
Orientador: Sebastião Cronemberger.  
Co-Orientador: Luiz Armando de Marco.  
Área de concentração: Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia.  
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Glaucoma. 2. Genética. 3. Hereditariedade. 4. Mutação INDEL. 5. Dissertações Acadêmicas. I. Cronemberg, Sebastião. II. Marco, Luiz Armando de. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título

NLM: WW 290

# **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

## **Magnífico Reitor**

Prof. Clélio Campolina Diniz

## **Vice-Reitora**

Profa. Rocksane de Carvalho Norton

## **Pró-Reitor de Pós-Graduação**

Prof. Ricardo Santiago Gomez

## **Pró-Reitor de Pesquisa**

Prof. Renato de Lima dos Santos

## **Diretor da Faculdade de Medicina**

Prof. Francisco José Penna

## **Vice-Diretor da Faculdade de Medicina**

Prof. Tarcizo Afonso Nunes

## **Coordenador do Centro de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina**

Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha

## **Subcoordenadora do Centro de Pós-Graduação**

Profa. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

## **Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia**

Prof. Marcelo Dias Sanches

**Subcoordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia**

Profa. Ivana Duval de Araújo

**Chefe do Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia**

Profa. Ana Rosa Pimentel de Figueiredo

**Chefe do Departamento de Cirurgia**

Prof. Marcelo Eller Miranda

**Membros do Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia**

Prof. Alcino Lázaro da Silva

Profa. Ivana Duval de Araújo

Prof. Marcelo Dias Sanches

Prof. Márcio Bittar Nehemy

Prof. Renato Santiago Gomes

Prof. Tarcizo Afonso Nunes

**Representante Discente Titular:** Sumara Marques Barral

*A Deus, pelas estrelas em minha vida...*

*À minha mãe, estrela maior, exemplo de força e fé, por tudo que foi, é e será  
em minha vida: meu porto seguro...*

*Ao meu pai que de longe tudo observa e por meu sucesso torce... Sei que está  
orgulhoso aí de Cima...*

*Ao meu tio Dingo, pelo carinho e torcida pela minha felicidade até nossa  
despedida...*

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

A minha Vida, por resgatar nosso passado e fazer dele o nosso presente e o nosso futuro, pela amizade, parceria e pelo apoio nos momentos doces e nos difíceis.

Aos meus pequenos pacientes e seus familiares, pela confiança e por serem exemplos de amor, luta e vitória.

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Wagner Duarte Batista, pelo aprendizado, apoio incondicional, suporte e confiança ao longo desses anos nas Gerais.

À Gilminha, pelo carinho, companhia e cuidados com a minha mãe na minha saída de casa.

Ao Prof. Luiz Armando De Marco, que foi mais que coorientador, foi conselheiro, pela sabedoria, pelo apoio, confiança, disponibilidade ímpar e pela inspiração sobre o caminho acadêmico que desejo trilhar.

Ao Prof. Sebastião Cronemberger, pela orientação, paciência e fé durante todo o transcorrer da tese.

À Profa. Luciana Bastos Rodrigues, pelos ensinamentos, sabedoria, paciência, colaboração e pelo apoio no laboratório.

Ao Dr. Nikias Alves da Silva, pelo apoio, pela amizade desde a minha chegada a Belo Horizonte, pelos ensinamentos teórico-práticos e cuja tese serviu de modelo para a estruturação desta.

À minha família, pelas orações, pelos pensamentos positivos e torcidas pela minha vitória.

Aos meus amigos Daiane, Rodrigo, Hayana, Eriquinha e Cléber, que me ajudaram sem demandas ao longo dessa árdua caminhada.

Aos meus amigos presentes e os perto de coração (ainda que distantes), pela força e pelo incentivo.

À família Galvão, Dr. Roberto e D. Dinara, Roberto Filho, Nara e Paulinho (*in memorian*), por plantar a semente da oftalmologia no meu coração, pela oportunidade de me apaixonar pelo glaucoma e por ser peça fundamental na minha formação até hoje.



Aos meus professores e preceptores, em especial ao Prof. Joel Boteon, Dr. Afonso Medeiros, Dr. Elisabeto Ribeiro Gonçalves, Dr. Felício A. Silva, Profa. Ivana D. de Araújo, Prof. João Agostini Netto, Dr. Cristiano Scholtze, Dr. Edward Nascimento, Dra Luciana Barbosa e Dr. Galton Vasconcelos, pelo aprendizado, incentivo e pelas oportunidades.

À família do Cope, pela oportunidade de entrar no mundo da oftalmopediatria, pela confiança constante na minha capacidade e pelas portas sempre abertas ao longo do doutorado para viabilizar minhas idas a Recife para rever a família e os amigos.

À minha psicóloga Nilma, pelas horas de treinamento sobre como alçar voos mais altos e seguros.

Aos médicos, anestesistas, *fellows* e funcionários do Centro de Referência de Glaucoma e Catarata e da Clínica de Olhos da Santa Casa de Belo Horizonte, em especial a Mari, Dr. Paiva, Virleide, Araci, Arminda, Claudina, Raquel, Pri, Glaucio (*in memoriam*), Marcos, João Marcos e Gabi, pelo suporte, dedicação e ajuda incondicional.

Às colegas do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Medicina Molecular da UFMG e aos alunos de iniciação científica, pela contribuição para a elaboração desta tese, em especial a Herbert.

Aos funcionários e professores do Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia da Faculdade de Medicina da UFMG e do Hospital São Geraldo, representados pela Srta. Rosemary Rodrigues Silva e pelo Prof. Nassim Calixto.

Aos funcionários do Centro de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da UFMG, representados pela Srta. Mari Rocha.

A todos os meus companheiros de estrada, que, embora não mencionados aqui, contribuíram de alguma maneira na execução desta tese.

Às pedras do meu caminho, por me fazerem fortaleza.

Ao universo, que conspirou a meu favor com a sorte acoplada à minha fé...

“Quando uma criatura humana desperta para um grande sonho e sobre ele lança toda a força de sua alma, todo o universo conspira a seu favor.”

Johann Wolfgang Von Goethe

(1749-1832)

## LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenosina
AgNO <sub>3</sub>	Nitrato de prata
Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asn	Ácido aspártico
C	Citosina
<i>CYP1B1</i>	Citocromo <i>P450</i> , família 1, subfamília B, polipeptídeo 1
DAX	Diâmetro axial
DCH	Diâmetro corneano horizontal
del	Deleção
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxinucleotídeo trifosfato, termo genérico que define os quatro desoxinucleotídeos (dATP, dGTP, dTTP, dCTP)
DP	Desvio-padrão
ECC	Espessura central corneana
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
<i>et al.</i>	E outros
G	Guanina
GCP	Glaucoma congênito primário
GLC3	Código para locus associado ao glaucoma congênito

Gln	Glutamina
Gly	Glicina
H <sub>2</sub> O	Água
HCl	Ácido clorídrico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
<i>Indels</i>	Polimorfismos de inserção/deleção
ins	Inserção
KCl	Cloreto de potássio
Leu	Leucina
<i>LTBP2</i>	Complexo latente de ligação à proteína do fator de transformação de crescimento beta 2
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
NaCl	Cloreto de sódio
OMIM	<i>On Line Mendelian Inheritance in Man</i>
<i>p</i>	Nível de significância estatística
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia de polimerase
Po	Pressão intraocular
Pro	Prolina
<i>r</i>	Coefficiente de Pearson
SDS	Sódio dodecil sulfato a 10%
SE	Erro-padrão

Ser	Serina
SNPs	Polimorfismos de um único nucleotídeo
T	Timina
TE	Tampão de eluição (Tris-HCl EDTA)
TKM1	Solução tampão para a extração de DNA
TKM2	Solução tampão para a extração de DNA
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
Trp	Triptofano
Val	Valina
X	Código de parada

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
μl	Microlitro
μm	Micrômetro
g	Aceleração da gravidade
M	Molar
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
mmHg	Milímetro de mercúrio
ng	Nanograma
pmol	Picomol
s	Segundo
U	Unidade

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
<b>1</b>	Iniciadores ( <i>primers</i> ) usados (senso/antisense) para amplificar por reação em cadeia da polimerase o gene <i>CYP1B1</i> do DNA genômico.	32
<b>2</b>	Perfil epidemiológico dos pacientes com glaucoma congênito primário.	36
<b>3</b>	Número de procedimentos cirúrgicos realizados em 48 olhos com glaucoma congênito primário.	38
<b>4</b>	Correlação de Pearson ( <i>r</i> ) entre os parâmetros clínicos inicial e final em 48 olhos com glaucoma congênito primário submetidos à cirurgia antiglaucomatosa.	38
<b>5</b>	Mutações no gene <i>CYP1B1</i> em pacientes brasileiros com glaucoma congênito primário.	40
<b>6</b>	SNPs identificados no gene <i>CYP1B1</i> .	41
<b>7</b>	Características dos pacientes com glaucoma congênito primário e do grupo com mutações no gene do <i>CYP1B1</i> .	42
<b>8</b>	Associação entre as proporções da ancestralidade genômica e a presença de mutações no <i>CYP1B1</i> em pacientes com glaucoma congênito primário.	43
<b>9</b>	Associação entre as proporções da ancestralidade genômica e dados clínicos em pacientes com glaucoma congênito primário.	44

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Legenda	Página
1	Principais achados biomicroscópicos na consulta diagnóstica dos pacientes com glaucoma congênito primário (n = 48 olhos).	37
2	Análise de sequenciamento do gene <i>CYP1B1</i> : novas mutações. As diferentes cores dos morros do eletroferograma indicam um nucleotídeo específico (vermelho para timina – T; azul para citosina – C; preto para guanina – G; e verde para adenosina – A). A leitura do eletroferograma é feita da esquerda para a direita. Na figura 2.a, a seta mostra a mutação em heterozigose p.Gln109→X no códon 109 do exon 2. Na figura 2.b, a seta mostra a mutação em heterozigose p.Ser476→Pro no códon 476 do exon 3. Na figura 2.c, a seta mostra a mutação em heterozigose fs.1416delC no códon 472 do exon 3.	39
3	Escala filogenética de evolução ao longo das espécies da sequência de aminoácidos do gene <i>CYP1B1</i> . A serina altamente conservada entre as espécies (no códon 476 em humanos) está evidenciada pela marcação em cinza.	41
4	Correlação de Pearson ( <i>r</i> ) positiva com força de associação moderada entre o componente ancestral africano e os diâmetros axial inicial (no diagnóstico) e final (no momento da coleta de sangue).	45
5	Correlação de Pearson ( <i>r</i> ) negativa com força de associação moderada entre o componente ancestral	45



européu e os diâmetros axial inicial (no diagnóstico) e final (no momento da coleta de sangue).

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** O glaucoma congênito primário é uma trabeculodisgenesia isolada que resulta na obstrução do escoamento do humor aquoso e no consequente aumento da pressão intraocular, sendo uma importante causa de cegueira pediátrica. É a forma mais comum de glaucoma na infância e tem sido associada a alterações no gene *CYP1B1*. Em escala bem menor, o gene *LTBP2* também tem sido relatado como causa da doença.

**OBJETIVOS:** Investigar a contribuição de mutações no gene *CYP1B1* e avaliar a ancestralidade genômica em crianças portadoras de glaucoma congênito primário.

**MÉTODO:** Trinta crianças com glaucoma congênito primário com um seguimento mínimo de seis meses após a última cirurgia e 60 controles foram submetidos a coleta de sangue e exame oftalmológico. Dados clínicos e cirúrgicos foram coletados, o DNA, extraído, e o gene *CYP1B1*, sequenciado. O estudo da ancestralidade genômica foi realizado utilizando-se 40 marcadores de inserção-deleção (*indels*).

**RESULTADOS:** Foram encontradas 10 mutações no *CYP1B1* em 11 pacientes (36,7%), sendo três delas novas mutações (p.Gln109→Stop, p.Ser476→Pro e fs.1416delC). As crianças com GCP apresentaram proporção ancestral de europeus, africanos e ameríndios de  $0,784 \pm 0,044$  (média  $\pm$  SE),  $0,149 \pm 0,035$  e  $0,067 \pm 0,023$ , respectivamente, e a do grupo-controle foi  $0,730 \pm 0,048$ ,  $0,132 \pm 0,034$  e  $0,138 \pm 0,032$ , respectivamente. As diferenças nas proporções entre probandos e controles não foram significativas ( $p > 0,05$ ). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas dos componentes da ancestralidade entre os probandos com mutações e sem mutações no *CYP1B1*. Um maior índice de ancestralidade africana foi associado a um pior prognóstico da doença.

**CONCLUSÕES:** *CYP1B1* é o principal gene causador do glaucoma congênito primário. Entretanto, ausência de mutações em 63,3% das crianças com glaucoma congênito primário sugere o envolvimento de outro(s) gene(s) ou causas

moleculares ainda desconhecidas na patogênese dessa doença. O componente ancestral africano parece influenciar os algoritmos, agindo talvez como um fator de risco, quando presente em alta proporção. Novas pesquisas são necessárias para revelar o papel da ancestralidade genômica no glaucoma congênito primário em populações miscigenadas como a brasileira.

**PALAVRAS-CHAVE:** Glaucoma congênito primário, gene *CYP1B1*, mutação, ancestralidade, *indels*.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** The primary congenital glaucoma is an isolated trabeculodysgenesis causing obstruction of aqueous humor outflow and subsequent increase in intraocular pressure, being a major cause of blindness in children. It is the most common form of glaucoma in childhood and has been associated with changes in the *CYP1B1* gene. In a much smaller scale, the *LTBP2* gene has also been reported as another cause of the disease.

**PURPOSE:** Thirty children with primary congenital glaucoma and a minimum follow-up of six months after the last surgery and 60 control individuals underwent eye examination and peripheral blood collection. Clinical data were collected, DNA extracted and the *CYP1B1* gene sequenced. The study of genomic ancestry was conducted using 40 insertion-deletion markers (indels).

**RESULTS:** We found 10 mutations in *CYP1B1* in 11 patients (36.7%), three of them new mutations (p.Gln109→Stop, p.Pro476→.Ser476, fs.1416delC). Children with PCG had an ancestry ratio of European, African and Amerindian of  $0.784 \pm 0.044$  (mean  $\pm$  SE),  $0.149 \pm 0.035$  and  $0.067 \pm 0.023$ , respectively, and the control group was  $0.730 \pm 0.048$ ,  $0.132 \pm 0.034$  and  $0.138 \pm 0.032$ , respectively. Differences in these ratios between probandos and controls were not significant ( $p > 0.05$ ). There were no significant differences in the components of ancestry among probands with and without mutations in *CYP1B1*. A higher index of African ancestry was associated with worse prognosis.

**CONCLUSIONS:** *CYP1B1* gene is the main cause of primary congenital glaucoma. However, absence of mutations in 63.3% of children with primary congenital glaucoma suggests the involvement of other gene(s) or molecular causes in the pathogenesis of this disease. The African ancestry component appears to influence the algorithms, perhaps acting as a risk factor, when present in high proportion. In addition, a higher ratio of African ancestry was associated with a worse prognosis. Further studies are needed to establish the role of other genes and of genomic ancestry in primary congenital glaucoma in admixed populations such as that of Brazil.

**KEY WORDS:** Primary congenital glaucoma, *CYP1B1* gene, mutation, ancestry, indels.

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b>	22
<b>OBJETIVOS</b>	26
<b>MÉTODO</b>	28
Participantes	29
Método laboratorial	30
Avaliação computacional das alterações no gene <i>CYP1B1</i>	33
Análise da ancestralidade genômica	33
Análise estatística	33
<b>RESULTADOS</b>	35
Análise de sequenciamento do gene <i>CYP1B1</i>	39
Correlação genótipo-fenótipo	41
Análise da ancestralidade genômica ( <i>indels</i> )	42
<b>DISCUSSÃO</b>	46
<b>CONCLUSÕES</b>	55
<b>REFERÊNCIAS</b>	57
<b>ANEXOS</b>	64
Anexo A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais	65
Anexo B - The role of genomic ancestry in Brazilian	66

patients with primary congenital glaucoma

Anexo C - Primary congenital glaucoma: novel mutations in *CYP1B1* gene and African ancestry in Brazilian patients 84

Anexo D - Cópias da ata da defesa e da declaração de aprovação da tese 114

# **INTRODUÇÃO**



## INTRODUÇÃO

O glaucoma pediátrico é uma doença rara, sendo o glaucoma congênito primário (GCP) o tipo mais comum<sup>1</sup>. O glaucoma congênito primário (*Online Mendelian Inheritance in Man* - OMIM - 231300) é uma trabeculodisgenesia isolada do segmento anterior do olho que resulta na obstrução do escoamento do humor aquoso<sup>1-3</sup>. Essa anormalidade na drenagem leva a um aumento da pressão intraocular (Po), resultando em mudanças nos parâmetros morfológicos do olho, tanto no segmento anterior como no posterior<sup>1</sup>.

A doença, que geralmente se manifesta antes dos três anos de idade, é bilateral em 60% a 80% dos casos, sendo o acometimento geralmente assimétrico<sup>4</sup>. O gênero masculino é mais afetado<sup>5,6</sup>. O quadro clínico varia com a idade do aparecimento e a gravidade da doença. O diagnóstico é feito em aproximadamente 80% dos casos no primeiro ano de vida, sendo que em 40% dos pacientes esse diagnóstico é feito nos primeiros três meses de vida e em 57% nos primeiros seis meses<sup>7</sup>. Os principais sintomas e sinais são fotofobia, lacrimejamento, blefarospasmo (tríade clássica), aumento da pressão intraocular e do globo ocular (búftalmia), edema de córnea, aumento da relação escavação/disco óptico e perda da camada de fibras nervosas da retina<sup>1,3,5,8-10</sup>.

O principal objetivo no tratamento do glaucoma congênito primário é a normalização da Po, através da remoção cirúrgica do tecido anômalo responsável pela resistência à drenagem do humor aquoso<sup>5,11</sup>. Às vezes, é necessário mais de um procedimento cirúrgico para atingir adequado controle pressórico. O uso de hipotensores oculares tem papel adjuvante na terapêutica, sendo utilizado quando há controle parcial após a cirurgia<sup>10,12,13</sup>. A avaliação da Po, do diâmetro corneano horizontal (DCH), da espessura central corneana (ECC), do diâmetro axial (DAX) e da relação escavação/disco óptico são fundamentais para o diagnóstico e o acompanhamento do glaucoma congênito primário<sup>14</sup>. Em alguns pacientes, apesar de várias cirurgias, pode ocorrer déficit visual e amaurose<sup>12,15</sup>.

O glaucoma congênito primário é uma importante causa de cegueira no mundo e a principal causa na Arábia Saudita<sup>6</sup>. A incidência é geográfica e

eticamente variável, com uma média de 1:10.000 nascidos vivos<sup>16</sup>. A maioria dos casos é esporádica, mas 10% a 40% são de origem familiar. Entretanto, em populações com alta taxa de casamentos consanguíneos, a incidência é mais elevada, como na Arábia Saudita (1:3.030)<sup>1</sup>, no estado de Andhra Pradesh na Índia (1:3.300)<sup>17</sup> e entre os ciganos eslavos (1:1.250)<sup>18</sup>, sugerindo uma herança mendeliana. A transmissão autossômica recessiva com penetrância variável é o modo mais comum de herança<sup>6</sup>.

Quatro *loci* estão associados com a doença. O primeiro e mais importante foi mapeado no cromossomo 2p21 (GLC3A), o segundo no cromossomo 1p36.2-p36.1 (GLC3B), o terceiro no cromossomo 14q24.3 (GLC3C) e o quarto no cromossomo 14q24.2-q24.3 (GLC3D). Esses dois últimos são adjacentes, mas não se sobrepõem<sup>19</sup>. Entretanto, apenas dois genes foram identificados como causadores de glaucoma congênito primário: *CYP1B1* (citocromo *P450*, família 1, subfamília B, polipeptídeo 1) no locus GLC3A e *LTBP2* (complexo latente de ligação à proteína do fator de transformação de crescimento beta 2) no locus GLC3D<sup>19-21</sup>. O papel das proteínas codificadas por esses genes na etiologia da doença ainda não está totalmente esclarecido.

O gene *CYP1B1* é membro da superfamília dos citocromos *P450* e codifica uma proteína de 543 aminoácidos. Essa monooxigenase localizada no retículo endoplasmático está envolvida na fase 1 do metabolismo de vários substratos, como os esteroides, procarcinógenos, retinoides e medicamentos<sup>3,21-23</sup>. Mutações nesse gene em pacientes com glaucoma congênito primário foram identificadas em frequência variável com alta taxa de prevalência em populações etnicamente homogêneas<sup>16-19,24</sup>. Mutações no *CYP1B1* também foram descritas no glaucoma juvenil de ângulo aberto, na síndrome de Sturge-Weber, na anomalia de Peters e na síndrome de Axenfeld-Rieger<sup>22,23</sup>.

A população brasileira é considerada tri-híbrida, sendo formada por uma intensa fusão de genes procedentes dos nativos ameríndios, dos europeus colonizadores e dos escravos africanos. Um conjunto de 40 marcadores humanos bialélicos, os polimorfismos de inserção/deleção (*indels*), é suficiente para a caracterização da estrutura populacional humana<sup>25</sup>. Amostras de brasileiros testadas

com os *indels* evidenciaram que características fenotípicas podem mascarar a ancestralidade genômica<sup>26</sup>. Então, a classificação da etnia baseada na raça autodenominada como um fator de impacto sobre as doenças não é adequada para uma população miscigenada como a brasileira, em que a cor da pele é um pobre preditor de ancestralidade africana<sup>26</sup>. Exemplificando, a prevalência de Alzheimer é maior em afro-americanos do que em caucasianos<sup>27,28</sup>. Entretanto, Schlesinger *et al.* (2013)<sup>29</sup>, usando os *indels* para o estudo da ancestralidade em uma população brasileira, demonstraram que a ancestralidade africana pode ser protetora no Alzheimer, pois estava associada à redução no número de placas neuríticas. Isso evidencia que, para a análise da etnia, é necessário o estudo da ancestralidade genômica usando marcadores moleculares em populações etnicamente heterogêneas.

O estudo do perfil genético e ancestral dos pacientes com glaucoma congênito primário pode ampliar o conhecimento sobre o gene *CYP1B1* e sua relação genótipo-fenótipo ainda controversa nesta doença e a ancestralidade genômica pode abrir perspectivas para auxílio nos algoritmos da doença em uma população miscigenada como a brasileira e talvez auxilie, no futuro, no aconselhamento genético. É possível que exista associação entre as bases genéticas e o prognóstico do glaucoma congênito.

# **OBJETIVOS**

## OBJETIVOS

Investigar a contribuição de mutações no gene *CYP1B1* em pacientes portadores de glaucoma congênito primário.

Avaliar a ancestralidade genômica de pacientes portadores de glaucoma congênito primário.

Avaliar a associação entre genótipo e fenótipo nos probandos sem mutações no gene *CYP1B1* em comparação com os probandos com mutações e com mutações causativas (em homozigose ou em heterozigose composta).

Correlacionar ancestralidade genômica com parâmetros clínicos (idade do diagnóstico, Po, ECC, DCH e DAX).

Avaliar a associação entre ancestralidade genômica e mutação no gene *CYP1B1*, mutação causativa (homozigose ou heterozigose composta) no gene *CYP1B1*, acometimento ocular, presença de buftalmia ao diagnóstico em pelo menos um olho e número de procedimentos cirúrgicos (uma cirurgia ou mais de uma por olho, se acometimento bilateral).

# MÉTODO

## MÉTODO

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais, de acordo com o parecer CAAE 035.0.203.000-11 (anexo A). Crianças até os seis anos de idade tiveram o termo de consentimento livre e esclarecido assinado por seu responsável legal. Entre sete e 12 anos, paciente e responsável assinaram conjuntamente o termo. Nos outros casos, os participantes foram informados verbalmente e por escrito sobre a natureza e a finalidade do estudo.

### Participantes

O presente estudo envolveu 30 indivíduos não consanguíneos com glaucoma congênito primário e 60 controles não portadores de glaucoma, selecionados no período de 2011 a 2012. Todos os sujeitos foram submetidos a exame oftalmológico completo. Foram incluídos no grupo-controle apenas pacientes com mais de 60 anos sem glaucoma, doença metabólica ou genética e que não apresentavam antecedente familiar de glaucoma ou cegueira. Pacientes com  $Po \geq 14$ mmHg ou disco óptico suspeito de glaucoma (nervo óptico com escavação maior do que 0,4 ou com assimetria maior do que 0,2) foram excluídos desse grupo-controle. Quando encontrada alguma mutação no gene *CYP1B1* dos probandos, o sangue dos pais foi coletado, o DNA, extraído, e a análise do gene, realizada.

Os pacientes com glaucoma congênito primário incluídos neste estudo apresentavam, quando do diagnóstico, idade até três anos e haviam sido submetidos a tratamento cirúrgico para controle da  $Po$  por dois cirurgiões especialistas em glaucoma pediátrico. Todos os pacientes foram submetidos à trabeculotomia como primeira cirurgia, sendo esta técnica também realizada no segundo procedimento, quando necessário. Quando ainda era imprescindível uma terceira intervenção, a trabeculectomia com mitomicina C foi a opção utilizada para controle pressórico. Em casos refratários, nova trabeculectomia ou procedimentos ciclodestrutivos foram realizados. Os pacientes com glaucoma congênito primário foram submetidos a exame oftalmológico no momento da inclusão no estudo por dois examinadores e o diagnóstico foi revisado por outros dois investigadores. O

critério de inclusão no estudo foi um seguimento de seis meses após o último procedimento cirúrgico. Pacientes com glaucoma congênito secundário e outras anomalias sistêmicas ou oculares associadas foram excluídos.

A avaliação oftalmológica incluiu um exame biomicroscópico e as medidas da Po em mmHg com o tonômetro portátil de Perkins (Haag-Streit, Koniz, Switzerland), do DCH em mm com o compasso de Jameson, do DAX em mm e da ECC em  $\mu\text{m}$  com o ecobiômetro e paquímetro DGH5100e (DGH Technology, Inc., Exton, PA, USA). Quando a criança não colaborava, o exame oftalmológico foi realizado sob sedação, sendo aferida a Po nos primeiros dez minutos após a indução anestésica para minimizar a possível influência do agente anestésico.

Dados demográficos (idade, gênero, consanguinidade, antecedente familiar de glaucoma), clínicos e cirúrgicos pregressos foram coletados. Critério de sucesso cirúrgico foi definido como  $Po \leq 14\text{mmHg}$  sem uso de medicação e sucesso cirúrgico qualificado como  $Po \leq 14\text{mmHg}$  com o uso de medicação hipotensora associada. Criança com  $Po \leq 14\text{mmHg}$  apenas com uma trabeculotomia (por olho, se apresentando acometimento bilateral) foi considerada como portadora de glaucoma congênito com bom prognóstico. A etnia foi determinada por autotaxonomia segundo os critérios do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE).

### **Método laboratorial**

Amostras de sangue (5mL) foram obtidas por punção venosa periférica de todos os pacientes após a obtenção do consentimento por escrito. O material foi imediatamente armazenado em tubos de vácuo estéril, contendo ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) e mantido em temperatura ambiente.

O DNA genômico dos pacientes e dos controles foi isolado das amostras de sangue total utilizando-se o método de Lahiri e Nurnberger (1991)<sup>30</sup> com algumas modificações. As amostras de sangue foram transferidas para tubos de 50mL ao qual a solução TKM1 (TrisHCl 10mM; KCl 10mM;  $\text{MgCl}_2$  10mM; EDTA 4mM) foi adicionada. Em seguida, 500 $\mu\text{L}$  de Triton X-100 foram acrescentados à solução com a finalidade de promover a hemólise. Após agitação vigorosa da mistura contida no tubo de 50mL, a mesma foi centrifugada a 1.255 x g por 15min a 4°C. Após



centrifugação, o sobrenadante contendo restos de hemácias foi removido e o precipitado de leucócitos foi lavado com a solução TKM1. Nesse passo, uma centrifugação a 475 x g por 10min a 4°C foi realizada. Novamente o sobrenadante foi descartado e o precipitado contendo leucócitos foi mantido no tubo. Nessa etapa, 1600µL de TKM2 (TrisHCl 10mM; KCl 10mM; MgCl<sub>2</sub> 10mM; EDTA 4mM; NaCl 400mM) foram adicionados ao precipitado juntamente com 100µL SDS 10%, este utilizado para promover a lise de leucócitos. Em seguida, o tubo foi mantido a 55°C em banho-maria por 20 minutos. Após o período de incubação, 900µL de NaCl (6M) foram adicionados com a função de promover a precipitação de proteínas. Uma última centrifugação de 15min a 21.800 x g a 4°C foi realizada. Dessa vez, o sobrenadante, contendo DNA, foi transferido para novo tubo com 5mL de álcool a 100%. Nesse momento houve a visibilização do DNA e o mesmo foi lavado em álcool 70%, secado e transferido para tubo contendo o tampão de eluição TE (Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM, pH 7 a 8). As amostras permaneceram armazenadas a 80°C negativos durante todo o período da pesquisa.

Um conjunto de iniciadores específicos (*primers*) para a amplificação dos três exons de *CYP1B1* foi desenhado utilizando o programa *Primer3*, versão 4.0, disponível em <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>. As sequências de bases dos iniciadores estão listadas na tabela 1.

O DNA foi quantificado através de espectrofotometria e as reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas com 30ng/µL de DNA. A reação-padrão de PCR seguiu os parâmetros: 2µL de DNA, 2,5µL de Tampão IIB 10x (NaCl 40mM; Tris-HCl 10mM, pH 8,4; Triton X-100 0.1%; MgCl<sub>2</sub> 1,5mM), 2,5µL de dNTPs (0,2mM), 0,5µL de cada par de iniciadores (10pmol/mL) e 0,25µL de Taq DNA polimerase (0.625U). Os produtos foram amplificados em um termociclador (Eppendorf Mastercycler, Hamburg, Germany), utilizando as seguintes etapas: desnaturação a 94°C por 3min, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30s, anelamento a 55°C por 30s e extensão a 72°C por 30s. Ao término dos ciclos, as reações passaram por uma extensão final a 72°C por 5min.

Os produtos de PCR foram purificados com o *kit* de purificação *Illustra GFX PCR DNA e Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare, São Paulo, Brasil), seguindo as instruções contidas no manual. A visibilização das bandas foi realizada em um gel de poliacrilamida a 6,5%. O protocolo de coloração envolveu uma etapa de fixação em ácido acético glacial 10%, lavagem em água destilada por 3min, impregnação em solução de nitrato de prata (10,5 gramas AgNO<sub>3</sub>, q.s.p 100mL H<sub>2</sub>O, formaldeído 37%, q.s.p 50mL H<sub>2</sub>O), lavagem em água destilada por 15s e a etapa de revelação em uma solução de carbonato de sódio (3 gramas de NaCO<sub>3</sub>, q.s.p 100mL H<sub>2</sub>O, 75mL de formaldeído 100% e 20mL de tiosulfato de sódio 10mg/mL).

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando *BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit*, de acordo com as instruções do fabricante (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA). As sequências foram obtidas em sequenciador *ABI 3130 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City, CA), analisadas e comparadas com a sequência RefSeq (ENSG00000138061), utilizando-se o programa *Sequencher*, versão 5.0 (Gene Codes Corp., Ann Harbor, Michigan).

**Tabela 1. Iniciadores (*primers*) usados (senso e antisenso) para amplificar por reação em cadeia da polimerase o gene *CYP1B1* do DNA genômico**

<i>Primer</i> <sup>a</sup>	Exon	Sequência (5'→ 3')	Tamanho do produto (pb) <sup>b</sup>
CYP1F	1	CCCTCCTTCTACCCAGTCCT	441
CYP1R	1	CCTCGGCAGACAGACTGAC	
CYP2AF	2	GTGTCACGCCTTCTCCTCTC	330
CYP2AR	2	CGCCATTCAGCACCCTAT	
CYP2BF	2	CTACGGCGACGTTTTCCAG	267
CYP2BR	2	GTGGCCCTCGAGGACTTG	
CYP2CF	2	CATGATGCGCAACTTCTTCA	387
CYP2CR	2	TGCCTCAAGAACTTGTCCAG	
CYP2DF	2	AACCGCAACTTCAGCAACTTC	298
CYP2DR	2	TTTTTCAGAGGAGAAAAGACCTG	
CYP3AF	3	GCTCACTTGCTTTTCTCTCTCC	381
CYP3AR	3	TCATCACTCTGCTGGTCAGG	
CYP3BF	3	AACCCGGAGAACTTTGATCC	352
CYP3BR	3	AAAATTTTCAGCTTGCCTCTTG	

*Primer*<sup>a</sup>: F = senso (*forward*), R= antisenso (*reverse*); <sup>b</sup>pb = pares de bases.

### **Avaliação computacional das alterações no gene *CYP1B1***

O programa PolyPhen-2 (*Polymorphism Phenotyping v2*), disponível em <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>, foi utilizado para avaliar o impacto estrutural de trocas identificadas na sequência de DNA do gene *CYP1B1* do tipo *missense*. A alteração foi classificada como possivelmente danosa quando o valor probabilístico foi maior que 0,15 e provavelmente danosa quando maior que 0,85, sendo todas as outras benignas<sup>31</sup>. Nas mutações identificadas pela primeira vez neste estudo, o programa PROVEAN (*Protein Variation Effect Analyzer*), disponível em <http://provean.jcvi.org/>, foi a ferramenta usada para prever o impacto da alteração de um aminoácido na estrutura funcional da proteína do *CYP1B1*, sendo um valor menor que -2,5 considerado deletério<sup>32</sup>.

### **Análise da ancestralidade genômica**

Todas as amostras foram submetidas a uma análise de ancestralidade genômica biogeográfica. Cada amostra foi genotipada de modo independente através de 40 *indels* bialélicos, já descritos anteriormente<sup>25,26</sup>. Os *amplicons* foram analisados em *ABI 3130 DNA Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City, CA) usando o programa *GeneMapper*, versão 4.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Para estimar a proporção de ancestralidade europeia, africana e ameríndia de cada indivíduo foi utilizado o programa *Structure*, versão 2.3, disponível em <http://pritch.bsd.uchicago.edu/structure.html>.

### **Análise estatística**

As informações coletadas foram digitadas no Excel®. Os resultados descritivos foram obtidos utilizando frequências e porcentagens para as características das diversas variáveis categóricas. Para as variáveis quantitativas, foram obtidas medidas de tendência central (média e mediana) e medidas de dispersão (desvio-padrão). Empregou-se o teste *t* pareado para comparar os valores da Po, ECC, DAX e DCH inicial (antes do primeiro procedimento cirúrgico) e final (no momento da coleta do sangue).

Para avaliar a associação entre genótipo e fenótipo, o grupo de pacientes sem mutações no gene *CYP1B1* foi comparado com o grupo com mutações e com o grupo com mutações causativas (em homozigose ou em heterozigose composta) em relação aos seguintes parâmetros: gênero, raça, acometimento ocular (bilateral ou unilateral), idade de diagnóstico, presença de buftalmia ao diagnóstico em pelo menos um olho e número de procedimentos cirúrgicos (uma cirurgia ou mais de uma por olho, se acometimento bilateral). O teste exato de Fisher foi usado para as variáveis categóricas e o teste de Mann-Whitney, para as variáveis contínuas.

O teste de Mann-Whitney foi usado para avaliar a relação entre a ancestralidade genômica e os seguintes parâmetros: presença de mutação no gene *CYP1B1*, presença de mutação causativa no gene *CYP1B1*, acometimento ocular, presença de buftalmia ao diagnóstico em pelo menos um olho e número de procedimentos cirúrgicos (uma cirurgia ou mais de uma por olho, se acometimento bilateral). O coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ) foi utilizado para calcular a correlação entre a ancestralidade genômica e os parâmetros clínicos (idade do diagnóstico, Po, ECC, DCH e DAX). Para essa análise, só foram consideradas correlações fortes ( $r = 0,700$  a  $0,890$ ) e moderadas ( $r = 0,400$  a  $0,690$ ). Também foi realizada uma análise de regressão logística multivariada para identificar fatores associados ao bom prognóstico da doença (controle pressórico com um procedimento cirúrgico): presença de mutação no gene *CYP1B1*, envolvimento ocular, buftalmia presente ao diagnóstico em pelo menos um olho, índice de ancestralidade africana e idade do paciente ao diagnóstico da doença.

As análises entre os componentes ancestrais de pacientes e controles foram realizadas através do programa *GraphPad Prism 5*. Todas as outras análises foram feitas com o programa estatístico *Statistical Package for the Social Sciences*, versão 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Valores de  $p$  menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

# **RESULTADOS**

## RESULTADOS

Trinta crianças com glaucoma congênito primário foram selecionadas, 18 (60%) com acometimento ocular bilateral e 12 (40%) com unilateral. As características da população estudada estão demonstradas na tabela 2.

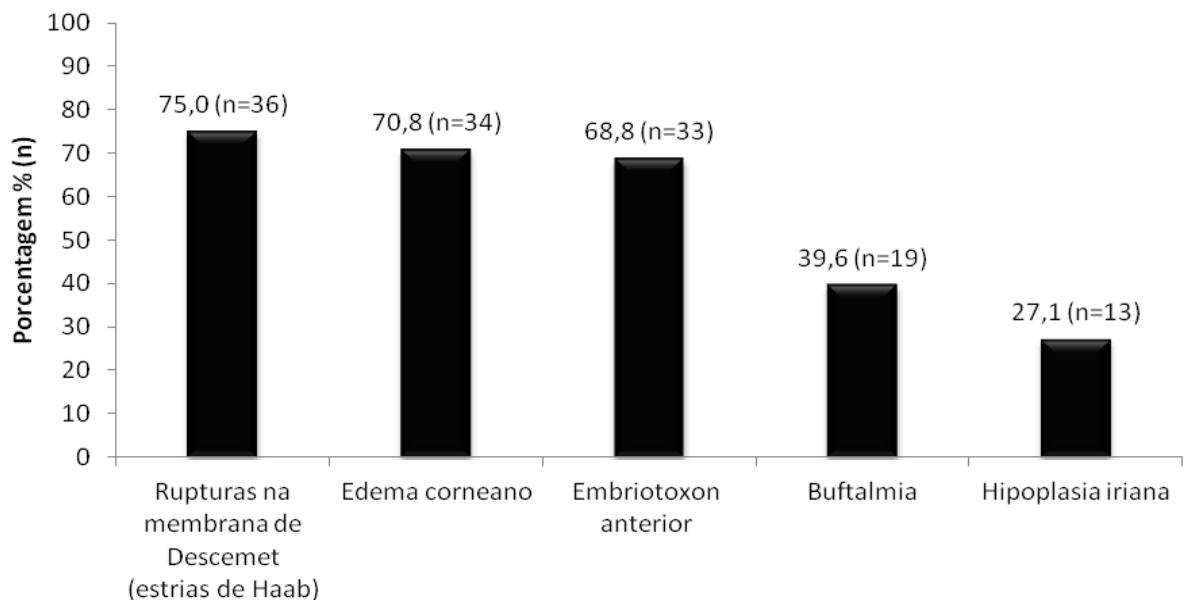
**Tabela 2.**

**Perfil epidemiológico dos pacientes com glaucoma congênito primário**

<b>Gênero</b>	<b>N*</b>	<b>%</b>	<b>Meses</b>
Masculino	16	53,3	
Feminino	14	46,7	
<b>Naturalidade (Minas Gerais)</b>			
Belo Horizonte e região metropolitana	13	43,3	
Outras cidades do estado	17	56,7	
<b>Etnia autoclassificada</b>			
Branca	13	43,3	
Parda	12	40,0	
Negra	5	16,7	
<b>Consanguinidade</b>	1	3,3	
<b>Antecedente familiar</b>			
Glaucoma congênito primário	5	16,7	
Glaucoma	6	20,0	
Hipertensão arterial sistêmica	5	16,7	
Diabetes <i>mellitus</i>	5	16,7	
<b>Idade - diagnóstico</b>			
Média			9,2
Mediana			3,5
Amplitude			0 - 31
<b>Idade - 1ª trabeculotomia</b>			
Média			6,3
Mediana			6,5
Amplitude			0,1 - 34
<b>Seguimento pós-cirúrgico</b>			
Média			28,1
Mediana			23,5
Amplitude			8 - 85

N\* = número de probandos

A suspeita de glaucoma congênito primário foi feita pelos pais ou por responsável legal em 17 (56,7%) crianças, pelo pediatra em 12 (40%) crianças e em uma criança (3,3%) pela colaboração de ambos. Não houve correlação entre a idade do diagnóstico e o responsável pela hipótese diagnóstica ( $p=0,198$ ). Os motivos da investigação da doença foram assimetria ocular em 46,7% dos pacientes, aumento do diâmetro corneano em 40%, alteração na coloração ocular em 36,7% e a tríade de lacrimejamento, fotofobia e blefarospasmo em 3,3%. A figura 1 mostra os principais achados biomicroscópicos no exame oftalmológico inicial dos 48 olhos das 30 crianças com glaucoma congênito primário.



**Figura 1.** Principais achados biomicroscópicos na consulta diagnóstica dos pacientes com glaucoma congênito primário (n = 48 olhos).

Foram realizados 87 procedimentos cirúrgicos em 48 olhos de 30 crianças com glaucoma congênito primário, 63 (72,4%) deles trabeculotomias. No momento da coleta de sangue (exame oftalmológico completo final), 28 (93,3%) pacientes (16 com acometimento bilateral e 12 com unilateral) apresentavam Po controlada. Dezoito olhos (37,5%) apresentavam sucesso cirúrgico e 26 olhos (54,2%), sucesso qualificado. Dezesesseis (53,3%) crianças (n=23 olhos, 47,9%) tiveram controle pressórico com apenas uma trabeculotomia (por olho em caso de envolvimento bilateral). A tabela 3 mostra o número de procedimentos cirúrgicos por olho

realizados nos 30 pacientes com glaucoma congênito primário. Medicação hipotensora ocular tópica estava sendo utilizada em 30 (62,5%) olhos, sendo em regime de monoterapia em 12 (25%) olhos. O maleato de timolol a 0,5% foi o colírio de escolha em monoterapia ou em associação, sendo aplicado em 86,7% (n=26) dos olhos tratados com terapia adjuvante. A associação fixa antiglaucomatosa mais utilizada foi betabloqueador com inibidor da anidrase carbônica, em dez olhos.

**Tabela 3. Número de procedimentos cirúrgicos realizados em 48 olhos com glaucoma congênito primário**

Número de cirurgias	N*	%
1	27	56,3
2	10	20,8
3	6	12,5
≥ 4	5	10,4

N\* = número de olhos

Antes da realização do primeiro procedimento cirúrgico, a Po (mmHg), a ECC ( $\mu\text{m}$ ), o DCH (mm) e DAX (mm) eram, respectivamente,  $19,94 \pm 6,32$  (média  $\pm$  desvio-padrão - DP),  $659,36 \pm 106,79$  (média  $\pm$  DP),  $12,92 \pm 1,28$  (média  $\pm$  DP) e  $22,72 \pm 2,50$  (média  $\pm$  DP). No momento da coleta de sangue, a Po, a ECC, o DCH e DAX eram  $11,31 \pm 5,30$  (média  $\pm$  DP),  $558,68 \pm 47,51$  (média  $\pm$  DP),  $13,72 \pm 1,17$  (média  $\pm$  DP) e  $25,12 \pm 3,14$  (média  $\pm$  DP), respectivamente. A tabela 4 mostra as correlações estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) existentes entre os parâmetros nesses dois momentos.

**Tabela 4. Correlação de Pearson (*r*) entre os parâmetros clínicos inicial e final em 48 olhos com glaucoma congênito primário submetidos à cirurgia antiglaucomatosa**

Parâmetros*	R	Valor p	Força da associação
Poi – Pof	0,40	0,005	Moderada
ECCi – ECCf	0,53	<0,001	Moderada
DCHi – DCHf	0,76	0,001	Forte
DAXi – DAXf	0,67	<0,001	Moderada
DCHi – DAXi	0,52	<0,001	Moderada
DCHf – DAXf	0,49	<0,001	Moderada
DCHf – DAXi	0,42	0,002	Moderada

Parâmetros\* i = antes da 1ª cirurgia; f = no momento da coleta de sangue; Po = pressão intraocular; ECC = espessura corneana central; DCH = diâmetro corneano horizontal; DAX = diâmetro axial



## Análise de sequenciamento do gene *CYP1B1*

No sequenciamento do gene *CYP1B1*, identificaram-se dez mutações, sendo três delas novas (figura 2) e sete já descritas como causadoras de glaucoma congênito primário (tabela 5). Elas estavam presentes em 11 (36,7%) probandos. Nove (30%) deles apresentavam uma mutação única e dois pacientes (6,7%) possuíam duas mutações distintas (mutação composta) no gene. Não foi observada nenhuma mutação no gene *CYP1B1* em 19 (63,3%) crianças com glaucoma congênito primário e em 120 cromossomos dos pacientes do grupo-controle.

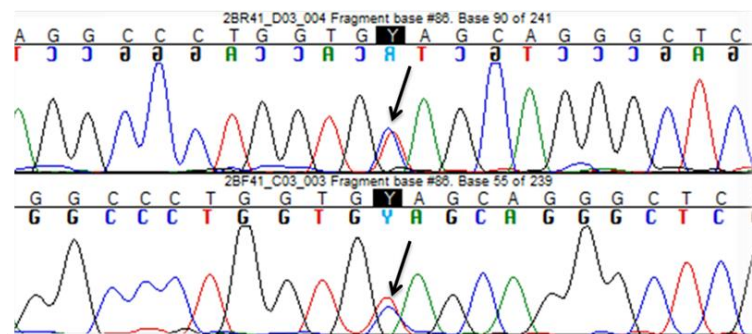


Figura 2.a

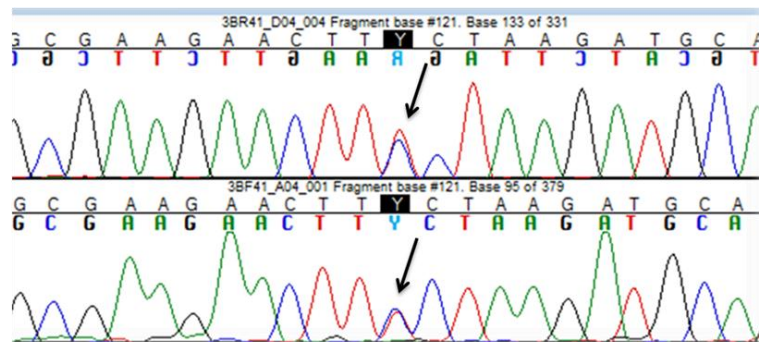


Figura 2.b

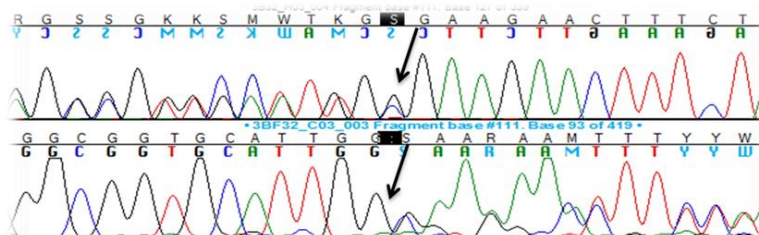


Figura 2.c

**Figura 2.** Análise de sequenciamento do gene *CYP1B1*: novas mutações. As diferentes cores dos morros do eletroferograma indicam um nucleotídeo específico (vermelho para timina – T; azul para citosina – C; preto para guanina – G; e verde para adenosina – A). A leitura do eletroferograma é feita da esquerda para a direita.

Na figura 2.a, a seta mostra a mutação em heterozigose p.Gln109→X no códon 109 do exon 2. Na figura 2.b, a seta mostra a mutação em heterozigose p.Ser476→Pro no códon 476 do exon 3. Na figura 2.c, a seta mostra a mutação em heterozigose fs.1416delC no códon 472 do exon 3.

**Tabela 5. Mutações no gene *CYP1B1* em pacientes brasileiros com glaucoma congênito primário**

Exon	Posição no DNA genômico	Códon	Troca de nucleotídeo	Efeito da substituição	Mutação <sup>a</sup>	N <sup>b</sup>	Referências
2	3976G>A	57	171G→A	Trp57→X	Hom	2	21,33
2	4130C>T	109	325C→T	Gln109→X	Het	1	<b>Mutação nova</b>
2	4339/4340delG	179	535delG	Frameshift	Hom	1	24,33
3	7901_7913del13	355	1064_1076del13	Frameshift	Het	1	24,31,33,43
3	8037-8046ins10	403	1200_1209ins10	Frameshift	Het	1	21,33,43
3	8165C>G	443	1328C→G	Ala443→Gly	Het	2	31,33
3	8167C>T	444	1330C→T	Arg444→X	Het	1	20
3	8168G>A	444	1331G→A	Arg444→Gln	Hom	2	48
3	8253delC	472	1416delC	Frameshift	Het	1	<b>Mutação nova</b>
3	8263T>C	476	1426T→C	Ser476→Pro	Het	1	<b>Mutação nova</b>

Mutação<sup>a</sup>: Hom = em homozigose, Het = em heterozigose; N<sup>b</sup> = número de casos

Foram detectadas três mutações do tipo *missense*: p.Ala443→Gly (valor de PolyPhen-2 = 0), p.Arg444→Gln (valor de PolyPhen-2 = 1) e p.Ser476→Pro (valor de PolyPhen-2 = 0,998). Os valores do PROVEAN nas duas mutações novas identificadas foram -2,798 (p.Gln109→X) e -3,213 (p.Ser476→Pro) e, na escala filogenética de evolução, a serina no códon 476 é altamente conservada (figura 3).

Cinco (16,7%) probandos eram heterozigotos para mutações no gene *CYP1B1*. Uma criança com glaucoma congênito primário apresentava heterozigose composta para duas mutações novas (p.Gln109→X e p.Ser476→Pro) e outra tinha uma deleção (g.4339/4340delG) no exon 2 em homozigose e uma inserção (g.8037-8046ins10) no exon 3 em heterozigose. Esse último probando herdou o alelo da inserção do pai heterozigoto, o alelo da deleção da mãe heterozigota, mas o pai só possuía alelos selvagens para a deleção. Os pais não eram portadores de glaucoma congênito primário, glaucoma juvenil ou glaucoma primário de ângulo aberto. Foi realizada a genotipagem dos *indels* em células paternas para excluir qualquer



**Tabela 7. Características dos pacientes com glaucoma congênito primário e do grupo com mutações no gene do *CYP1B1***

<b>Dados</b>	<b>Grupo com GCP</b>	<b>Probandos com mutação</b>
Indivíduo, n	30	11
Masculino/feminino, n (%)	16 (53,3) / 14 (46,7)	4 (36,4) / 7 (63,6)
Acometimento unilateral / bilateral, n (%)	12 (40) / 18 (60)	3 (27,3) / 8 (72,7)
História familiar de GCP, n (%)	5 (16,7)	2 (18,2)
Branco, n (%)	13 (43,3)	6 (54,5)
Negro, n (%)	5 (16,7)	0 (0)
Pardo, n (%)	12 (40)	5 (45,5)
Sucesso cirúrgico, n (%)	11 (36,7)	3 (27,3)
Sucesso cirúrgico qualificado, n (%)	17 (56,7)	8 (72,7)
Buftalmia em pelo menos um olho, n (%)	12 (40)	5 (45,5)
Po controlada com uma cirurgia (se bilateral, por olho), n (%)	16 (53,3)	7 (63,6)
Mais de um procedimento cirúrgico, n (%)	14 (46,7)	4 (36,4)
Média da idade ao diagnóstico (amplitude), meses	9,2 (0-31)	4,3 (0-19)

Há uma associação marginal entre a idade do diagnóstico e a presença de mutações no gene *CYP1B1*, sendo o diagnóstico mais precoce no grupo com mutações do que nos sem mutações (média da idade 4,3 meses vs. 7,4 meses), mas esta diferença não foi estatisticamente significativa ( $p=0,055$ ). A frequência de doença bilateral no grupo com mutações causativas foi maior (100%) do que no grupo sem mutações (50%), mas esta relação não foi estatisticamente significativa ( $p=0,057$ ). Houve variabilidade em relação à presença de mutações e os seguintes parâmetros: gênero, raça autodenominada, presença de buftalmia ao diagnóstico em pelo menos um olho e número de procedimentos cirúrgicos ( $p>0,05$ ). Nenhuma correlação significativa foi identificada entre a presença de mutações e Po, ECC, DCH ou DAX.

#### **Análise da ancestralidade genômica (*indels*)**

No grupo de crianças com glaucoma congênito primário, a proporção da ancestralidade genômica de europeus, africanos e ameríndios foi  $0,784 \pm 0,044$  (média  $\pm$  SE),  $0,149 \pm 0,035$  (média  $\pm$  SE),  $0,067 \pm 0,023$  (média  $\pm$  SE), respectivamente, enquanto, no grupo-controle, os resultados foram  $0,730 \pm 0,048$

(média  $\pm$  SE),  $0,132 \pm 0,034$  (média  $\pm$  SE),  $0,138 \pm 0,032$  (média  $\pm$  SE), respectivamente.

As diferenças nas proporções entre os dois grupos não foram significativas ( $p > 0,05$ ). Portanto, pacientes com glaucoma congênito primário apresentaram um componente ancestral semelhante ao da população do grupo-controle. Os componentes da ancestralidade genômica também não discriminaram o grupo de crianças com mutação do de sem mutação no gene *CYP1B1* (tabela 8).

**Tabela 8.**  
**Associação entre as proporções da ancestralidade genômica e a presença de mutações no *CYP1B1* em pacientes com glaucoma congênito primário**

<i>Indel</i>	Mutação	N*	Média	Mediana	Valor <i>p</i>
Ameríndio	Presente	19	0,044	0,023	0,747
	Ausente	11	0,107	0,025	
Africano	Presente	19	0,170	0,035	0,897
	Ausente	11	0,113	0,070	
Europeu	Presente	19	0,787	0,921	0,451
	Ausente	11	0,780	0,888	

N\* = número de pacientes. Valor  $p < 0,05$  = estatisticamente significativo

Quando comparadas as proporções na ancestralidade genômica com o envolvimento ocular, presença de buftalmia ao diagnóstico em pelo menos um olho e o número de procedimentos cirúrgicos (considerado neste estudo como a forma de analisar o prognóstico da doença), foi observada, na análise univariada, uma associação significativa ( $p=0,036$ ) entre o componente africano e o prognóstico (tabela 9). Crianças com controle pressórico com apenas um procedimento cirúrgico (bom prognóstico) tinham um menor componente ancestral africano. Presença de buftalmia ao diagnóstico em pelo menos um olho associou-se a uma maior proporção de componente africano, mas esse achado não foi significativo ( $p=0,069$ ). Identificou-se uma pequena associação não significativa ( $p=0,062$ ) entre o componente ancestral ameríndio e o acometimento ocular, tendo o grupo com acometimento bilateral maior componente ameríndio (tabela 9).

**Tabela 9. Associação entre as proporções da ancestralidade genômica e dados clínicos em pacientes com glaucoma congênito primário**

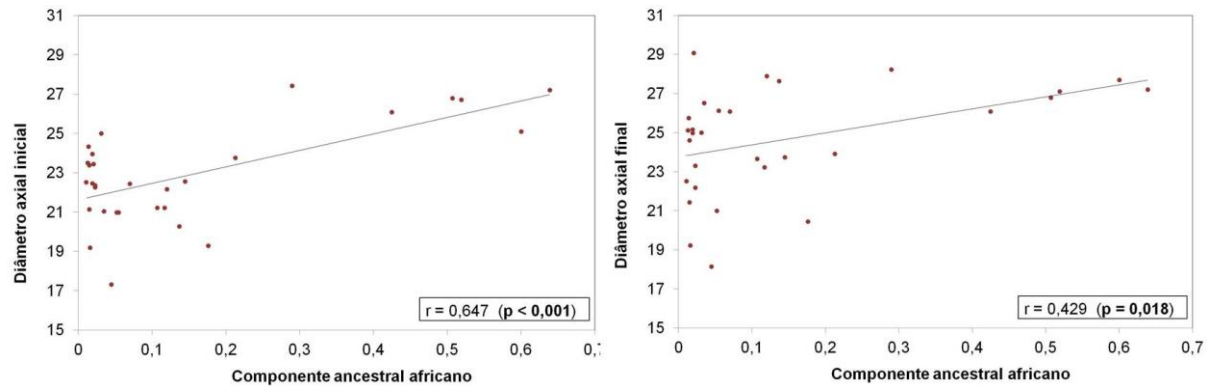
<i>Indel</i>	Parâmetro <sup>a</sup>	N <sup>b</sup>	Média	Mediana	Valor <i>p</i>
<b>Europeu</b>	Acometimento unilateral	12	0,792	0,945	0,385
	Acometimento bilateral	18	0,779	0,873	
<b>Africano</b>	Acometimento unilateral	12	0,175	0,038	0,849
	Acometimento bilateral	18	0,132	0,062	
<b>Ameríndio</b>	Acometimento unilateral	12	0,033	0,017	0,062
	Acometimento bilateral	18	0,089	0,038	
<b>Europeu</b>	Buftalmia presente ao diagnóstico	12	0,677	0,835	0,099
	Ausência de buftalmia	18	0,856	0,931	
<b>Africano</b>	Buftalmia presente ao diagnóstico	12	0,211	0,122	0,069
	Ausência de buftalmia	18	0,108	0,027	
<b>Ameríndio</b>	Buftalmia presente ao diagnóstico	12	0,112	0,035	0,244
	Ausência de buftalmia	18	0,037	0,018	
<b>Europeu</b>	Bom prognóstico	16	0,863	0,938	0,134
	Mais de um procedimento cirúrgico	14	0,694	0,845	
<b>Africano</b>	Bom prognóstico	16	0,089	0,033	<b>0,036*</b>
	Mais de um procedimento cirúrgico	14	0,219	0,119	
<b>Ameríndio</b>	Bom prognóstico	16	0,048	0,023	0,868
	Mais de um procedimento cirúrgico	14	0,089	0,024	

Parâmetro<sup>a</sup>: Bom prognóstico = 1 procedimento cirúrgico (por olho, se acometimento bilateral);  
N<sup>b</sup>= número de pacientes. Valor *p* < 0,05 = estatisticamente significativo

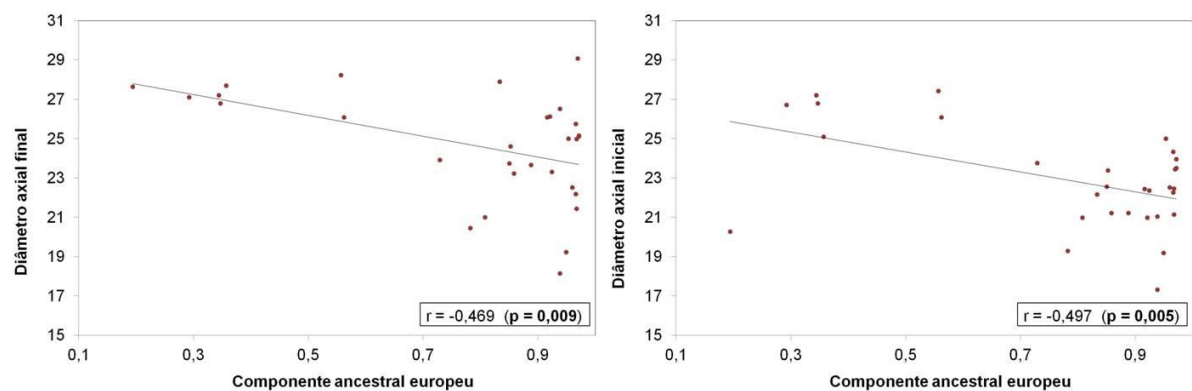
Aplicando-se uma análise multivariada para avaliar fatores associados ao sucesso do tratamento, ou seja, um bom prognóstico, obteve-se um resultado significativo em relação ao componente ancestral africano ( $\chi^2$  de Wald=3,865, *p*=0,049).

Os componentes africano e europeu apresentaram correlação moderada com o DAX inicial (ao diagnóstico) e final (no momento da coleta de sangue). À medida que aumenta o DAX, eleva-se a proporção de ancestralidade africana (figura 2). Em contrapartida, há uma correlação negativa do DAX com a proporção da

ancestralidade europeia (figura 3). Nenhuma correlação foi observada entre as proporções de *indels* e idade do diagnóstico, Po, ECC e DCH ( $p > 0,05$ ).



**Figura 4.** Correlação de Pearson ( $r$ ) positiva com força de associação moderada entre o componente ancestral africano e os diâmetros axial inicial (no diagnóstico) e final (no momento da coleta de sangue).



**Figura 5.** Correlação de Pearson ( $r$ ) negativa com força de associação moderada entre o componente ancestral europeu e os diâmetros axial inicial (no diagnóstico) e final (no momento da coleta de sangue).

# **DISCUSSÃO**



## DISCUSSÃO

O glaucoma congênito primário é uma doença grave e desafiadora, responsável por 2% a 15% dos indivíduos atendidos em instituições para deficientes visuais<sup>5</sup>. O tratamento cirúrgico, tão logo estabelecido o diagnóstico, é fundamental para prevenir sua progressão e amenizar seu impacto na visão do paciente<sup>10</sup>. O atraso entre o diagnóstico e a realização do primeiro procedimento cirúrgico contribui para o aumento da prevalência de deficiência visual na doença. Em um estudo brasileiro que avaliou 3.210 crianças portadoras de deficiência visual, o glaucoma congênito foi responsável por 10,8% dos casos<sup>33</sup>.

A maior prevalência do acometimento bilateral e do gênero masculino neste estudo é consistente com estudos prévios<sup>7,12,20,34-36</sup>. Foi observada uma baixa frequência de história familiar de glaucoma congênito (16,7%) e de consanguinidade (3,3%), divergindo dos resultados de um estudo de glaucoma congênito primário em pacientes brasileiros que identificou antecedente familiar de glaucoma congênito em 51,9% dos casos e consanguinidade em 26,9%<sup>36</sup>. A razão para essa discrepância não foi esclarecida.

O quadro clínico do glaucoma congênito primário é consequência da Po elevada<sup>1</sup>. Assimetria ocular em 46,7% dos pacientes foi o principal motivo da primeira consulta; entretanto, Papadopoulos *et al.* (2007) relataram córnea opacificada como o primeiro sinal observado pelos pais ou médicos<sup>7</sup>. Nesse estudo britânico<sup>7</sup>, os pais foram responsáveis pela suspeita diagnóstica em 73% dos casos, enquanto no presente estudo eles foram os responsáveis em 56,7%. Essa diferença pode ser devida à opacificação corneana que é mais facilmente percebida pelos pais do que a assimetria ocular. Em concordância com Hilal *et al.* (2010)<sup>24</sup>, os principais achados à biomicroscopia foram estrias de Haab, edema de córnea e aumento do DCH.

O tratamento definitivo do glaucoma congênito primário é cirúrgico, sendo as cirurgias de ângulo, a goniotomia e a trabeculotomia os tipos mais comuns de procedimentos realizados<sup>11,13,37</sup>. O procedimento cirúrgico inicial foi a trabeculotomia devido à elevada prevalência de edema de córnea (70,8%), dificultando a

visibilização do ângulo da câmara anterior e, conseqüentemente, a realização de goniotomia. A maioria dos pacientes (93,3%) apresentava bom controle pressórico ( $Po \leq 14\text{mmHg}$ ) no momento da coleta de sangue (último exame oftalmológico completo). De acordo com Papadopoulos *et al.* (2007)<sup>7</sup>, após a primeira intervenção cirúrgica, 50% dos olhos necessitam de um segundo procedimento; 31%, de um terceiro; e 15%, de um quarto procedimento no primeiro ano, para atingir controle pressórico. O presente estudo mostrou resultado similar com 16 crianças (53,3%) atingindo a  $Po$  alvo após a primeira trabeculotomia.

Estudos mostraram que os betabloqueadores são uma boa opção de medicamento antiglaucomatoso na necessidade de terapia adjuvante<sup>38,39</sup>, com redução média pressórica de 17,7% em esquema de monoterapia na população pediátrica<sup>40</sup>. Inibidores da anidrase carbônica ou análogos das prostaglandinas também apresentaram bom resultado hipotensor na população pediátrica<sup>13</sup>. A nossa escolha primária por uma gota de maleato de timolol a 0,5% a cada 12 horas foi justificada pela baixa frequência de efeitos colaterais, pelo baixo custo e fácil acesso através do sistema público de saúde. Na necessidade de mais de um medicamento antiglaucomatoso, a associação fixa de betabloqueador com inibidor da anidrase carbônica foi a mais prescrita por facilitar a aderência e melhorar a persistência ao tratamento, em concordância com Chang *et al.* (2012)<sup>40</sup>.

O monitoramento dos parâmetros clínicos,  $Po$ , ECC, DCH e DAX, é necessário para um correto diagnóstico e um acompanhamento efetivo pós-cirúrgico<sup>15,37,41</sup>. Observou-se no presente estudo redução da  $Po$  e da ECC, o que não ocorreu em relação ao DAX e o DCH. Quando a buphalmia se desenvolve, o globo ocular não retorna ao tamanho normal após o controle do glaucoma<sup>5</sup>. Houve correlação entre o DCH e o DAX, em concordância com Mendes *et al.* (2011)<sup>14</sup>, reforçando a necessidade de considerar a biometria ocular e a medida do DCH no controle evolutivo da doença. Também em concordância com os resultados desse mesmo estudo brasileiro<sup>14</sup>, a ECC se mostrou uma variável independente, sem correlação com os outros parâmetros clínicos. Apesar da média da ECC final ser semelhante à de outros estudos<sup>14,42</sup>, que não revelaram diferenças significativas entre o grupo com glaucoma congênito e o grupo-controle, é importante essa

mensuração para melhor tentar estimar a Po no seguimento pós-operatório das crianças portadoras de glaucoma congênito.

O gene *CYP1B1*, mapeado na região cromossômica 2p21-22, é conhecido por sua associação causativa com o glaucoma congênito primário<sup>18,34,36</sup>. A prevalência de mutações nesse gene nos indivíduos com glaucoma congênito primário é variável, sendo de 17,2% na China<sup>43</sup>, 33,3% na Indonésia<sup>44</sup>, 47,8% no Marrocos<sup>24</sup>, 70% no Irã<sup>45</sup>, quase de 100% na Arábia Saudita e na população cigana eslava<sup>6,18</sup>. Em estudos com brasileiros portadores de glaucoma congênito primário, Stoilov *et al.* (2002) detectaram a presença de mutações em 50% dos pacientes<sup>36</sup>, mas Della Paolera *et al.* (2010) encontraram uma frequência menor, de 30%<sup>34</sup>. No presente estudo, encontrou-se uma prevalência intermediária de 36,7%. Essas diferenças podem ser devidas a variações geográficas e da composição amostral, em termos de percentual de consanguinidade e número de casos familiares.

O gene *CYP1B1* possui três exons, sendo o exon 1 não codificante, e dois íntrons. O exon 3 codifica o domínio heme ligante na porção C terminal que é essencial à função catalítica da proteína *CYP1B1*<sup>22,46,47</sup>. Essa proteína tem expressão nas estruturas da câmara anterior, como corpo ciliar e íris<sup>46</sup>, e provavelmente participa do metabolismo de uma molécula biologicamente importante que hipoteticamente participa do desenvolvimento e funcionamento do segmento anterior ocular<sup>3</sup>. As mutações do tipo *nonsense* e *frameshift* (70% das mutações identificadas) truncam a proteína e eliminam a região C terminal, envolvida na ligação do grupamento heme e no dobramento da molécula *P450*. Isso resulta em produto proteico inativo ou em dano grave à função enzimática<sup>46,47</sup>.

Herança autossômica recessiva foi observada em 36,7% dos probandos através da identificação de mutações em homozigose ou em heterozigose no gene *CYP1B1*. Cinco crianças com glaucoma congênito primário apresentavam apenas uma mutação em heterozigose, fato já observado em outros estudos<sup>24,43,47</sup>. Esse achado sugere o envolvimento de outros genes ou variações desconhecidas na patogênese da doença.

Stoilov *et al.* (2002)<sup>36</sup> descreveram quatro novas mutações no gene *CYP1B1* e Della Paolera *et al.* (2010)<sup>34</sup>, três outras mutações. O achado de três novas mutações no presente estudo é consistente com esses resultados e com outros estudos em diferentes países e grupos étnicos<sup>21,43,47</sup>, em que novas mutações e um grande número de inserções e deleções são comumente observadas, indicando uma relativa susceptibilidade desse gene a eventos recombinantes<sup>22</sup>.

Com base nesses fatos, aventou-se a hipótese de mutação pós-zigótica no alelo herdado do pai do probando com a deleção 4339/4340delG em homozigose, visto que a mãe não afetada era heterozigota e o pai não afetado, portador de alelos selvagens. A probabilidade da ocorrência de eventos semelhantes é alta em doenças nas quais a presença de novas mutações é frequente<sup>48</sup>. Dois estudos de glaucoma congênito primário no gene *CYP1B1* também observaram casos de mutação *de novo* no alelo herdado do pai<sup>46,49</sup>.

Não identificamos estudos prévios relatando o achado das seguintes mutações: p.Gln109→X, p.Ser476→Pro e fs.1416delC, sendo seus efeitos mutacionais desconhecidos.

A posição afetada pela mutação *nonsense* p.Gln109→X localiza-se no domínio globular citosólico do gene *CYP1B1*<sup>22,47</sup>, e uma citosina (C) é trocada por uma timina (T) na posição do nucleotídeo 325 no exon 2, resultando numa mudança de códon de CAG para TAG. Essa troca por um código de parada produz uma proteína truncada com 108 aminoácidos e sem a região terminal responsável pelo dobramento apropriado da molécula e pela ligação do grupamento heme, essencial para o funcionamento de todas as enzimas *P450*<sup>46</sup>. O valor do programa PROVEAN para essa mutação indicou um efeito funcional deletério à proteína com a troca da glutamina por um código de parada no códon 109.

Na mutação *missense* p.Ser476→Pro, a substituição de uma timina por uma citosina na posição do nucleotídeo 1426 resulta numa troca do códon TCT para CCT e na substituição de uma serina por uma prolina no códon 476 na hélice L do exon 3<sup>50</sup>. O valor atribuído a essa troca no programa PolyPhen-2 indicou um efeito provavelmente danoso à estrutura proteica e o do PROVEAN, um impacto deletério

funcional. A serina no códon 476 é um aminoácido altamente conservado na escala filogenética de evolução, ratificando que essa troca pode alterar a expressão do *CYP1B1* e sua atividade metabólica, levando a alterações no desenvolvimento ocular. Nessa posição, já foi identificada uma deleção (*rs72549374*) associada ao glaucoma congênito primário.

A criança com glaucoma congênito primário portadora das mutações p.Gln109→X e p.Ser476→Pro (heterozigose composta) era do gênero feminino, com um alto componente ancestral ameríndio (0,669) e doença bilateral. Ela apresentou um quadro clínico de aparecimento precoce (RN com menos de 15 dias), com buftalmia bilateral presente ao diagnóstico e foi submetida a mais de uma cirurgia para controle pressórico. Apesar da gravidade do quadro clínico, ela apresentou sucesso qualificado com o uso de dois medicamentos hipotensores oculares.

A mutação do tipo *frameshift* fs.1416delC localizada no códon 472 foi observada em heterozigose em um paciente afetado do gênero masculino e em seu genitor não afetado. A perda de uma citosina na posição nucleotídica 1416, na hélice L do exon 3<sup>50</sup>, leva a uma parada prematura na cadeia polipeptídica no códon 503, interrompendo a tradução proteica em 502 aminoácidos, sendo esse alelo provavelmente não funcional.

A criança com glaucoma congênito primário portadora da mutação fs.1416delC era do gênero masculino, com alto componente ancestral europeu (0,858) e tinha doença bilateral com diagnóstico aos quatro meses de idade e sem buftalmia. Realizou duas intervenções cirúrgicas por olho para adequado controle pressórico. Não foi identificada nenhuma outra mutação no sequenciamento desse probando, sugerindo o papel de mais algum gene causador na fisiopatogenia da doença.

Stoilov *et al.* (2002)<sup>36</sup> e Hilal *et al.* (2010)<sup>24</sup> descreveram as mutações 4340delG e 4339delG como sendo as mais prevalentes em um estudo de glaucoma congênito primário brasileiro (20,2%) e em um estudo marroquino (34,44%), respectivamente. Não é possível determinar qual guanina foi perdida nessa mutação, a da posição 4339 ou a da 4340. Essas deleções truncam a proteína,

devido à introdução de um códon de parada 51/52 aminoácidos a jusante do local da mutação, eliminando assim a região carboxi-terminal, essencial para o desempenho da função enzimática<sup>34,36</sup>. No Brasil, ela foi associada a um fenótipo mais grave, com doença bilateral, de aparecimento precoce, quadro clínico mais agressivo e resposta ruim ao tratamento cirúrgico<sup>36</sup>. Della Paolera *et al.* (2010) também identificaram essa mutação associada a fenótipos graves, mas numa frequência menor (6,7%)<sup>34</sup>. No presente estudo, entretanto, ela só foi observada em homozigose em uma criança com doença bilateral, diagnóstico aos dois meses de vida e sucesso cirúrgico com apenas um procedimento por olho após um seguimento de 41 meses. O motivo para as diferenças na prevalência pode ser a baixa frequência de consanguinidade e de antecedente familiar de glaucoma congênito da nossa amostra, mas a razão da discrepância fenotípica não pode ser estabelecida.

Os sete SNPs descritos neste estudo não cossegregam com o fenótipo da doença e já foram previamente identificados em indivíduos afetados e controles saudáveis<sup>24,36,46</sup>. Quando os polimorfismos p.Arg48Gly e p.Ala119Ser estavam presentes, eles estavam coligados e esta associação, já descrita, não altera a função proteica<sup>44,51</sup>.

Em relação ao gene *CYP1B1* e o glaucoma congênito primário, a correlação genótipo-fenótipo tem mostrado grande variabilidade. Quando Weisschuh *et al.* (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<sup>52</sup>. Um estudo espanhol não mostrou diferenças entre portadores e não portadores de mutações em relação ao acometimento ocular, à idade do diagnóstico, ao gênero e ao número de intervenções cirúrgicas<sup>53</sup>. O presente estudo também não detectou diferença no fenótipo entre a população com glaucoma congênito primário com e sem mutação no gene *CYP1B1*. Outros estudos descreveram resultados similares<sup>6,54,55</sup>. Abu-Amero *et al.* (2011)<sup>20</sup> também não observaram correlação entre as medidas da Po e do DCH no pré-operatório e no pós-operatório, em concordância com nossos resultados.

Nenhuma mutação foi detectada nos dois probandos que não apresentaram controle pressórico apesar dos múltiplos procedimentos cirúrgicos e evoluíram com prognóstico visual ruim. Em contrapartida, outros artigos 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<sup>36,43,47,56</sup>, envolvimento bilateral<sup>36,43</sup>, presença de buftalmia ao diagnóstico em pelo menos um olho<sup>56</sup>, e prognóstico pior, com mais de uma intervenção cirúrgica para atingir a Po alvo<sup>34,47,56</sup>. Esse conflito de resultados não está bem esclarecido e, talvez, seja consequência das diferenças geográficas, taxa de consanguinidade, multiplicidade de técnicas cirúrgicas, tempo de seguimento pós-operatório e composição das amostras.

O censo do IBGE de 2010 mostrou que a população brasileira era formada por 47,73% de brancos, 43,13% de pardos, 7,61% de negros, 1,09% de amarelos e 0,43% de indígenas<sup>57</sup>. No presente estudo, os brancos foram mais prevalentes, seguidos de pardos e negros. A população de negros apresentou uma prevalência maior que a observada no Brasil. Em concordância com Pena *et al.* (2011)<sup>26</sup>, este estudo evidenciou que probandos e controles apresentavam maior componente ancestral europeu.

Em um estudo brasileiro<sup>36</sup>, anterior ao uso dos marcadores moleculares de ancestralidade destinados a estratificar populações miscigenadas, as mutações no gene *CYP1B1* foram mais frequentes na população de descendência europeia do que na africana. No presente estudo, com o uso da técnica de estudo da ancestralidade genômica (*indels*), esse achado não foi observado. Com base nesses resultados, não é possível afirmar que o gene *CYP1B1* tem um papel causativo menor na população com glaucoma congênito primário de descendência africana numa população heterogênea como a brasileira.

O estudo da ancestralidade genômica também demonstrou que o aumento da proporção de *indel* africano era associado a um maior número de procedimentos cirúrgicos e um maior crescimento do globo ocular (aumento do DAX), sugerindo que o componente ancestral possa influenciar o prognóstico da doença. Um alto percentual de componente ancestral africano está associado a um pior prognóstico,

mesmo na presença de mutações no gene *CYP1B1*, sugerindo que talvez funcione como um fator de risco, quando presente em alta proporção.

Dados epidemiológicos e tipos de herança são rotineiramente estudados para avaliar variações em termos de prevenção e tratamento das doenças. O glaucoma congênito primário, embora raro, é uma importante causa de cegueira infantil no mundo, sendo o *CYP1B1* o principal gene causador. Em 63,3% dos indivíduos afetados da nossa amostra o modo de herança não pôde ser determinado, e a patogênese nestes casos pode ser devida a outras causas genéticas ou outras alterações moleculares. O conhecimento da relação entre ancestralidade e parâmetros clínicos pode auxiliar no entendimento da doença, visto seu grande impacto socioeconômico quando tardiamente diagnosticada e tratada. Este é o primeiro estudo de ancestralidade genômica com marcadores autossômicos (*indels*) em pacientes portadores de glaucoma congênito primário e indica que algoritmos que incluem etnia devem ser aplicados com parcimônia numa população heterogênea como a brasileira, podendo, nesses casos, ser considerada a análise da ancestralidade genômica. Estes resultados devem ser expandidos para elucidar as correlações entre ancestralidade genômica e fenótipo no glaucoma congênito primário em populações miscigenadas.



# **CONCLUSÕES**

## CONCLUSÕES

Em suma, no presente trabalho estudamos 30 pacientes com glaucoma congênito primário e 60 controles. Nossos resultados mostraram que:

1. Mutações no gene *CYP1B1* foram detectadas em 36,7% dos pacientes com glaucoma congênito primário.
2. Constatou-se maior proporção do componente ancestral europeu nos probandos e nos controles.
3. Não houve associação entre genótipo e ancestralidade, nem entre fenótipo e genótipo (grupo com mutações e grupo com mutações causativas).
4. Não houve correlação significativa entre ancestralidade genômica e idade do diagnóstico, pressão intraocular, espessura corneana central e diâmetro corneano horizontal.
5. Maior proporção do componente ancestral africano foi associado a um pior prognóstico e a um maior crescimento do globo ocular.
6. O índice de ancestralidade africana parece influenciar os algoritmos do glaucoma congênito primário, podendo ser um fator de risco quando presente em alta proporção.

Dois artigos foram elaborados para submissão a publicação em periódicos estrangeiros e constam nos anexos desta tese:

- *The role of genomic ancestry in Brazilian patients with primary congenital glaucoma* (anexo B).

- *Primary congenital glaucoma: novel mutations in CYP1B1 gene and African ancestry in Brazilian patients* (anexo C).

A formatação das citações e referências bibliográficas cumpre as exigências específicas dos periódicos escolhidos para submissão.

# REFERÊNCIAS

## REFERÊNCIAS

1. Alanazi FF, Song JC, Mousa A, Morales J, Al Shahwan S, Alodhayb S, *et al.* Primary and secondary congenital glaucoma: baseline features from a registry at King Khaled Eye Specialist Hospital, Riyadh, Saudi Arabia. *Am J Ophthalmol.* 2013;155(5):882-9.
2. Ho CL, Walton DS. Primary congenital glaucoma: 2004. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus.* 2004;41(5):271-88.
3. Sena DF, 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 Genet.* 2004;41:e6.
4. Shaffer RN. Genetics and the congenital glaucomas. *Am J Ophthalmol* 1965;60(6):981-94.
5. deLuise VP, Anderson DR. Primary infantile glaucoma (congenital glaucoma). *Surv Ophthalmol.* 1983;28:1-19.
6. 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;9:367-74.
7. Papadopoulos M, Cable N, Rahi J, Khaw PT; BIG Eye Study Investigators. The British Infantile and Childhood Glaucoma (BIG) Eye Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48(9):4100-6.
8. Calixto N. Glaucoma congênito. *An oftalmol.* 1983;2(1):24-30.
9. Aponte EP, Diehl N, Mohny BG. Incidence and clinical characteristics of childhood glaucoma: a population-based study. *Arch Ophthalmol.* 2010; 128(4): 478-82.
10. Ben-Zion I, Tomkins O, Moore DB, Helveston EM. Surgical results in the management of advanced primary congenital glaucoma in a rural pediatric population. *Ophthalmology.* 2011;118:231-5.
11. Essuman VA, Braimah IZ, Ndanu TA, Ntim-Amponsah CT. Combined trabeculotomy and trabeculectomy: outcomes for primary congenital glaucoma in a West African population. *Eye.* 2011;25(1):77-83.

12. de Silva DJ, Khaw PT, Brookes JL. Long-term outcomes of primary congenital glaucoma. *J AAPOS*. 2011;15:148-52.
13. Saltzmann RM, Reinecke S, Lin X, Cavanagh HD, Whitson JT. Long-term outcomes of a pseudo 360-degree trabeculotomy ab externo technique for congenital glaucoma at children's medical center. *Clinical Ophthalmology*. 2012;6:689-98.
14. Mendes MH, Sakata L, Betinjane AJ. Central corneal thickness and its correlation with other ocular biometric data in patients with congenital glaucoma. *Arq Bras Oftalmol*. 2011;74(2):85-7.
15. Zhang X, Du S, Fan Q, Peng S, Yu M, Ge J. Long-term surgical outcomes of primary congenital glaucoma in China. *Clinics*. 2009;64:543-51.
16. Turacli ME, Aktan SG, Sayli BS, Akarsu AN. Therapeutical and genetical aspects of congenital glaucomas. *Int Ophthalmol*. 1992;16(4-5):359-62.
17. Dandona L, Dandona R, Srinivas M, Giridhar P, Vilas K, Prasad MN, et al. Blindness in the Indian State of Andhra Pradesh. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42:908-16.
18. 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.
19. 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.
20. Abu-Amero KK, Osman EA, 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;17:2911-9.
21. Lim SH, Tran-Viet KN, Yanovitch TL, Freedman SF, Klemm T, Call W, et al. *CYP1B1*, *MYOC*, and *LTBP2* mutations in primary congenital glaucoma patients in the United States. *Am J Ophthalmol*. 2013;155(3):508-17.
22. Vasiliou V, Gonzalez FJ. Role of *CYP1B1* in glaucoma. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2008;48:333-58.

23. Millá E, Mañé B, Duch S, Hernan I, Borràs E, Planas E, *et al.* Survey of familial glaucoma shows a high incidence of cytochrome *P450*, family 1, subfamily B, polypeptide 1 (*CYP1B1*) mutations in non-consanguineous congenital forms in a Spanish population. *Mol Vis.* 2013;19:1707-22.
24. Hilal L, Boutayeb S, Serrou A, Refass-Buret L, Shisseh H, Bencherifa F, *et al.* Screening of *CYP1B1* and *MYOC* in Moroccan families with primary congenital glaucoma: three novel mutations in *CYP1B1*. *Mol Vis.* 2010;16:1215-26.
25. Bastos-Rodrigues L, Pimenta JR, Pena SD. The genetic structure of human populations studied through short insertion-deletion polymorphisms. *Ann Hum Genet.* 2006;70(Pt 5):658-65.
26. Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy Fde S, *et al.* The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS ONE.* 2011; 6(2): e17063.
27. Tang MX, Cross P, Andrews H, Jacobs DM, Small S, Bell K, *et al.* Incidence of AD in African-Americans, Caribbean Hispanics, and Caucasians in northern Manhattan. *Neurology.* 2001;56(1):49-56.
28. Demirovic J, Prineas R, Loewenstein D, Bean J, Duara R, Sevush S, *et al.* Prevalence of dementia in three ethnic groups: the South Florida program on aging and health. *Ann Epidemiol.* 2003;13(6):472-8.
29. Schlesinger D, Grinberg LT, Alba JG, Naslavsky MS, Licinio L, Farfel JM, *et al.* African ancestry protects against Alzheimer's disease-related neuropathology. *Mol Psychiatry.* 2013;18(1):79-85.
30. Lahiri DK, Nurnberger Jr JI. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res.* 1991;11:5444.
31. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, *et al.* A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods.* 2010;7(4):248-9.
32. Choi Y, Sims GE, Murphy S, Miller Jr, Chan AP. Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. *PLoS ONE.* 2012;7(10):e46688.

33. Haddad MA, Sei M, Sampaio MW, Kara-José N. Causes of visual impairment in children: a study 3,210 cases. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*. 2007;44(4):232-40.
34. Della Paolera M, de Vasconcellos JP, 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;19:176-82
35. Chang TC, Cavuoto KM. Surgical management in primary congenital glaucoma: four debates. *J Ophthalmol*. 2013;2013:612708.
36. Stoilov IR, Costa VP, Vasconcellos JP, Melo MB, Betinjane AJ, Carani JC, et al. Molecular genetics of primary congenital glaucoma in Brazil. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002;43(6):1820-7.
37. Kiefer G, Schwenn O, Grehn F. Correlation of postoperative axial length growth and intraocular pressure in congenital glaucoma - a retrospective study in trabeculotomy and goniotomy. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2001;239(12):893-9.
38. Coppens G, Stalmans I, Zeyen T, Casteels I. The safety and efficacy of glaucoma medication in the pediatric population. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*. 2009;46:12-8.
39. Aponte EP, Diehl N, Mohny BG. Medical and surgical outcomes in childhood glaucoma: a population-based study. *J AAPOS*. 2011;15(3):263-7.
40. Chang L, Ong EL, Bunce C, Brookes J, Papadopoulos M, Khaw PT. A review of the medical treatment of pediatric glaucomas at Moorfields Eye Hospital. *J Glaucoma*. 2012. Epub ahead of print. Doi:10.1097/IJG.0b013e31824d12f.
41. Meyer G, Schwenn O, Pfeiffer N, Grehn F. Trabeculotomy in congenital glaucoma. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2000;238:207-13.
42. Borges MJH. Determinação da espessura central da córnea, com paquímetro ultrassônico, e sua relação com os diâmetros axial e corneano em olhos de crianças portadoras de glaucoma congênito [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2002.

43. Chen Y, Jiang D, Yu L, Katz B, Zhang K, Wan B, Sun X. *CYP1B1* and *MYOC* mutations in 116 Chinese patients with primary congenital glaucoma. *Arch Ophthalmol*. 2008;126(10):1443-7.
44. Sitorus R, Ardjo SM, Lorenz B, Preising M. *CYP1B1* gene analysis in primary congenital glaucoma in Indonesian and European patients. *J Med Genet*. 2003;40:e9.
45. 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 Diagn*. 2007;9:382-93.
46. 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;62:573-84.
47. 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.
48. Zlotogora J. Parents of children with autosomal recessive diseases are not always carriers of the respective mutant alleles. *Hum Genet*. 2004;114:521-6.
49. Panicker SG, Mandal AK, Reddy AB, Gothwa VK, Hasnain SE. Correlations of genotype with phenotype in Indian patients with primary congenital glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45:1149–56.
50. Mammen JS, Pittman GS, Li Y, Abou-Zahr F, Beijani BA, Bell DA, *et al*. Single amino acid mutations, but not common polymorphisms, decrease the activity of *CYP1B1* against (-)benzo[a]pyrene-7R-trans-7,8-dihydrodiol. *Carcinogenesis*. 2003;24(7):1247-55.
51. 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.



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. Campos-Mollo E, López-Garrido MP, Blanco-Marchite C, Garcia-Feijoo J, Peralta J, Belmonte-Martínez J, *et al.* *CYP1B1* mutations in Spanish patients with primary congenital glaucoma: phenotypic and functional variability. *Mol Vis.* 2009;15:417-31.
54. Curry SM, Daou AG, Hermanns P, Molinari A, Lewis RA, Bejjani BA. Cytochrome *P4501B1* mutations cause only part of primary congenital glaucoma in Ecuador. *Ophthalmic Genet.* 2004;25(1):3-9.
55. Alfadhli S, Behbehani A, Elshafey A, Abdelmoaty S, Al-Awadi S. Molecular and clinical evaluation of primary congenital glaucoma in Kuwait. *Am J Ophthalmol.* 2006;141(3):512-6.
56. 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.
57. Censo demográfico 2010. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. [www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010) (acessado em 18 de julho de 2013).

# **ANEXOS**

**ANEXO A**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP**


**Projeto: CAAE – 0305.0.203.000-11**

**Interessado(a): Prof. Sebastião Cronemberger Sobrinho  
Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia  
Faculdade de Medicina - UFMG**

**DECISÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 06 de setembro de 2011, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**Avaliação genética em pacientes com glaucoma congênito primário**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

  
**Profa. Maria Teresa Marques Amaral  
Coordenadora do COEP-UFMG**

**ANEXO B**

***The role of genomic ancestry in Brazilian patients with primary  
congenital glaucoma***

**O papel da ancestralidade genômica em pacientes brasileiros  
com glaucoma congênito primário**

## **The role of genomic ancestry in Brazilian patients with primary congenital glaucoma**

Hévila Rolim<sup>1,2</sup>, Sebastião Cronemberger<sup>1</sup>, Hayana Rangel<sup>1,2</sup>, Wagner Duarte Batista<sup>2</sup>, Nassim Calixto<sup>1</sup>, Herbert Oliveira<sup>3</sup>, Luciana Bastos-Rodrigues<sup>3,4</sup>, Luiz De Marco<sup>3,5</sup>

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, Glaucoma Service, Hospital São Geraldo, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

<sup>2</sup>Glaucoma and Cataract Reference Center, Santa Casa de Belo Horizonte, Belo Horizonte, Brazil

<sup>3</sup>Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Medicina Molecular (INCT/MM), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

<sup>4</sup>Basic Department, Health Area, Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Governador Valadares, Governador Valadares, Brazil

<sup>5</sup>Department of Surgery, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

**Competing interests:** None

**Address all correspondence to:** Hévila Rolim

Av. Alfredo Balena 190, room 325. Belo Horizonte 30130-100, Brazil

**Phone/Fax:** +55(31)3409-9134 **Email:** hevinha@hotmail.com

**Key words:** primary congenital glaucoma, genomic ancestry, prognosis, indels

## **ABSTRACT**

**Background/aims:** To study genomic ancestry and evaluate the relationship between clinical and genomic ancestry data in Brazilians patients with primary congenital glaucoma (PCG).

**Methods:** Thirty patients with PCG and 60 unrelated controls were recruited and underwent an ophthalmological examination. The PCG inclusion criterion was prior surgery with a minimum follow-up of six months after last surgical procedure. Clinical data was recorded and DNA from each individual was independently genotyped for a panel of 40 validated ancestry-informative insertion-deletion DNA polymorphisms (indels).

**Results:** Eighteen (60%) children had bilateral disease and 16 (53.3%) were male. The mean age of diagnosis was 6.3 months and surgical follow-up varied from 8 to 85 months. For the PCG group, the proportion of Europeans, Africans and Amerindians was  $0.784 \pm 0.044$  (mean  $\pm$  SEM),  $0.149 \pm 0.035$  and  $0.067 \pm 0.023$ , respectively, while for control group was  $0.730 \pm 0.048$ ,  $0.132 \pm 0.034$  and  $0.138 \pm 0.032$ , respectively. Increased African component was associated with worse surgical prognosis ( $p=0.036$ ). There was also a statistically significant ( $p<0.05$ ) positive and moderate correlation between axial length (AL) and African component (initial AL:  $r = 0.647$ ; final AL:  $r = 0.429$ ).

**Conclusions:** Increased African component may be associated with worse prognosis in PCG in an admixed population. Genetic ancestry markers may be helpful in assessing risk factors for surgical outcomes in PCG. Further studies are needed to unveil the role of ancestry in primary congenital glaucoma in heterogeneous populations such as Brazilians.

## INTRODUCTION

Pediatric glaucoma is a rare disease, with primary congenital glaucoma (PCG) being the most common type of glaucoma in childhood and an important cause of blindness with an average birth incidence of 1: 10,000.[1,2] However, in some populations due to consanguineous marriages, this incidence is higher, as in the Middle East (1:2,500).[1]

It is characterized as a dysplasia at the periphery of the anterior chamber of the eye that results in impairment of aqueous humour drainage. This impairment causes elevated intraocular pressure (IOP), that results in changes in the ocular morphological parameters as well as in the anterior ocular segment (edema and corneal enlargement, Descemet's membrane rupture and iris hypoplasia) and in the posterior ocular segment (loss of retinal ganglion cells and pathological cup/disc ratio).[2,3] Abnormal morphological and functional findings contribute to characterize childhood glaucoma as a constellation of IOP, axial length (AL), horizontal corneal diameter (HCD) and central corneal thickness (CCT).[4,5]

PCG is usually bilateral and occurs more frequently in males. Most cases are sporadic, but disease is familial in 10% to 40% of cases. An autosomal recessive pattern of inheritance with variable penetrance is common, particularly in populations in whom there is a higher rate of consanguineous marriages.[6,7] Four loci have been linked to PCG: the major locus GLC3A on 2p21, GLC3B on 1p36.2-p36.1, GLC3C on 14q24.3, and GLC3D on 14q24.2-24.3.[8] There are two genes in which mutations are currently known to cause PCG: *CYP1B1* on locus GLC3A and *LTBP2* on locus GLC3D.[3,9] Most of mutations of *CYP1B1* in PCG patients have been identified in ethnically homogeneous populations.[10]

Brazilians have been considered a trihybrid population. Its genetic composition was formed by an intense fusing of genes proceeding from indigenous Amerindians, European colonizers and African slaves. A set of 40 autosomal short insertion-deletion polymorphisms (indels) is sufficient for the characterization of human population structure.[11] Samples of Brazilian individuals from different geographical groups have been tested with indels and the results suggested that phenotype characteristics can mask the genetic ancestry that is more uniform than expected.[12] Thus, skin color as determined by physical appearance is a poor predictor of genomic African ancestry in the Brazilian population.[12,13] It is evident that individuals grouped phenotypically as African descent and European descent should not be classified as a risk group in the medical literature based on skin color. For this analysis, it is necessary to study ancestry using genetic ancestry markers.

PCG is a vision-threatening disease and treatment is essentially surgical. Clinical treatment is used as an adjuvant.[7,14,15] Therefore, it is important to understand its association with ancestry, clinical data, and treatment for the patients' optimal management. The present study was performed to evaluate genomic ancestry and its correlation with clinical parameters and epidemiological data to assess variations in terms of prevention and treatment of the disease.

## **METHODS**

Participants were recruited from a tertiary eye care center in a state of the southeast of Brazil. Thirty patients had PCG and 60 were unrelated controls. Approval was obtained from the University's Human Research Ethics Committee (CAAE 035.0.203.000-11). This study has been conducted in accordance with the



Declaration of Helsinki. The patient or the guardian of an affected child provided informed consent.

All affected individuals included in this study had PCG with an early onset (age 0-3 years). Each affected participant underwent a complete eye examination. We used the Perkins applanation tonometer (Haag-Streit, Koniz, Switzerland) to measure IOP (mmHg), the DGH5100e pachymeter and echo-biometer (DGH Technology, Inc., Exton, PA, USA) to measure the CCT ( $\mu\text{m}$ ) and AL (mm), and a Jameson caliper to measure de HCD (mm). When necessary, examination was done under general anesthesia. The diagnosis was reviewed independently by another investigator. Inclusion criterion was a minimum follow-up of six months after last surgical intervention.

Patients with secondary glaucoma or other associated ocular and systemic anomalies were excluded. Demographic data, the number of surgeries and the follow-up period after primary surgery were registered. Criteria for surgical success were IOP  $\leq$  14 mmHg without glaucoma medication and qualified success was IOP  $\leq$  14 mmHg with glaucoma medication. At the time of examination, ethnicity was based on the self-classification criteria of the Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), which is responsible for the official census of Brazil. Controls free from glaucoma by examination were recruited. They had no metabolic, genetic, ocular disorders and negative family history of glaucoma or blindness. Exclusion criteria for controls were IOP  $\geq$  14 mmHg or suspicious optic disc.

### **Genomic ancestry analysis**

DNA from each individual was independently genotyped as previously described,[11] for a panel of 40 validated ancestry-informative insertion-deletion

DNA polymorphisms (indels).[12] Amplicons were sized using an ABI3130 DNA Sequencer (Applied Biosystems) and analyzed using the GeneMapper® Software (version 3.7). We used the European, African and Amerindian individuals of the HGPD-CEPH Human Genome Diversity Cell Line Panel as parental populations.[16]

### **Statistical analysis**

To estimate at an individual level the proportion of European, African and Amerindian components of ancestry, we used the Structure program (version 2.3). We then calculated the mean and standard error of the mean (SEM) of individual estimates for each group in probands and controls. The initial (before surgery) and final (at the last visit) IOP, CCT, HCD and AL measurements were compared using the *t* test for paired samples. To evaluate genomic ancestry/clinical parameters relationship, we compared the proportions of genomic ancestry components and the following parameters: number of glaucoma surgeries, presence of buphthalmos at least in one eye and bilateral/unilateral involvement (Mann-Whitney test). A Pearson correlation coefficient (*r*) was computed to assess the relationship between genomic ancestry and clinical parameters (age of diagnosis, IOP, CCT, HCD, and AL). For this analysis, we considered only the moderate (0.400 – 0.690) and strong (0.700 – 0.890) *r* values. The clinical data were analyzed statistically using SPSS version 19.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). In all analyses,  $p < 0.05$  was taken to indicate statistical significance.

### **RESULTS**

Forty-eight eyes from 30 children, 18 (60%) with bilateral and twelve (40%) with unilateral PCG were included: 16 (53.3%) male and 14 (46.7%) female. According to self-declared skin color, twelve (40%) patients were considered Browns,

thirteen (43.3%) Whites and five (16.7%) Blacks. Consanguinity could be determined in only one patient (3.3%) and family history of PCG in five cases (16.7%). In table 1, demographic data are shown.

**Table 1. Epidemiological profile - 30 PCG patients**

<b>Origin</b>	<b>n</b>	
Belo Horizonte and Metropolitan area	13	43.3%
Other cities	17	56.7%
<b>Prenatal consultation</b>		
Complete $\geq 6$ consultations	25	83.3%
Incomplete	5	16.7%
<b>Gestacional age in birth</b>		
Term	27	90%
Preterm	2	6.7%
Postem	1	3.3%
<b>Birth weight (Kg)</b>		
Mean	3.143	
Range	1.870-4.700	
Standard Deviation	0.658	
<b>Child birth type</b>		
Normal	15	50%
Cesarean	15	50%
<b>Complications in the neonatal period</b>		
No	26	86.7%
Yes	4	13.3%
<b>Family history</b>		
Glaucoma	6	20%
Hypertension	5	16.7%
Diabetes	5	16.7%
<b>n = number of PCG patients</b>		

Suspicion of PCG was based on eye asymmetry (46.7%), corneal enlargement (40%) associated with hazy corneas (36.7%), and photophobia, blepharospasm and epiphora (3.3%). The mean and median age of diagnosis were

6.3 and 3.5 months, respectively, ranging from 0 to 31 months. Figure 1 represents the main findings on initial ophthalmologic examination.

The child's median age at first surgery procedure was 6.5 months and ranged from 0.1 to 34 months. The surgical follow-up varied from 8 to 85 months, with a median of 23.5 months. In all, 87 surgeries were performed in 48 eyes from the 30 PCG patients with 63 (72.4%) being trabeculotomies. At the moment of last examination, 28 (93.3%) affected individuals (16 bilateral and 12 unilateral glaucoma) had controlled IOP ( $\leq 14$ mmHg) with surgical success in 18 (37.5%) eyes and qualified success in 26 (54.2%) eyes. Sixteen (47.9%) children had adequate IOP control with only one trabeculotomy performed (per eye, when bilateral) in 23 eyes (53.3%), with surgical success in nine eyes and qualified success in 14 eyes. Table 2 shows the number of surgeries per eye performed in the 48 eyes from 30 PCG patients.

**Table 2. Number of surgical procedures per eye performed in 48 eyes with PCG**

<b>Number of surgical procedures</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
1	27	56.3
2	10	20.8
3	6	12.5
$\geq 4$	5	10.4
<b>N = number of eyes</b>		

It was observed that after surgery, the average IOP and CCT decreased but AL and HCD had increased. There were positive correlations between the initial (before surgery) and final (last exam) clinical parameters (table 3). Moderate and statistically significant positive correlations were found between the initial HCD and

initial AL ( $r = 0.52$ ;  $p < 0.001$ ) between the final HCD and final AL ( $r = 0.49$ ;  $p < 0.001$ ) and between the initial AL and final HCD ( $r = 0.42$ ;  $p = 0.002$ ).

**Table 3. Pearson's correlation coefficients (r) between the initial and final clinical parameters in 48 eyes performed PCG surgeries**

Parameters*	Before 1 <sup>st</sup> surgery (mean $\pm$ SD)	Final exam (mean $\pm$ SD)	R	P value	Association strength
IOP	19.94 $\pm$ 6.32	11.31 $\pm$ 5.30	0.4	0.005	moderate
CCT	659.36 $\pm$ 106.79	558.68 $\pm$ 47.51	0.53	<0.001	moderate
HCD	12.92 $\pm$ 1.28	13.72 $\pm$ 1.17	0.76	0.001	strong
AL	22.72 $\pm$ 2.50	25.12 $\pm$ 3.14	0.67	<0.001	moderate

Parameters\*: IOP = intraocular pressure, CCT = central corneal thickness, HCD = horizontal corneal diameter, AL axial length

### Genomic ancestry results

For the PCG group, the proportion of Europeans, Africans and Amerindians were  $0.784 \pm 0.044$  (mean  $\pm$  SEM),  $0.149 \pm 0.035$  and  $0.067 \pm 0.023$ , respectively while for control group were  $0.730 \pm 0.048$ ,  $0.132 \pm 0.034$  and  $0.138 \pm 0.032$  respectively. The differences in the proportions of genomic ancestry between groups were not significant.

When we compared the proportion of genomic ancestry (indel) with bilateral/unilateral ocular involvement, presence of buphthalmos in at least one eye at diagnosis and number of surgeries procedures (surgical prognosis), we found a statistically significant association only between African component and prognosis (table 4). There was a minor association between the Amerindian proportion compared to eye involvement. Increases in the Amerindian proportion were correlated with a higher incidence of bilateral disease, although the result was not statistically significant ( $p=0.062$ ). Presence of buphthalmos at least in one eye was associated with higher proportion of African component, but this finding was not statistically significant ( $p=0.069$ ). A statistical significant association was observed

between African proportion and surgical prognosis ( $p=0.036$ ). Children with controlled IOP with one surgery (good surgical prognosis) had lower proportion of African component.

**Table 4. Association of genomic ancestry (indel proportions) and clinical parameters in 30 PCG patients**

Indel proportion	Clinical parameter	Cases (n)	Median	Mean	P value
European	Unilateral	12	0.945	0.792	0.385
	Bilateral	18	0.873	0.779	
African	Unilateral	12	0.038	0.175	0.849
	Bilateral	18	0.062	0.132	
Amerindian	Unilateral	12	0.017	0.033	0.062
	Bilateral	18	0.038	0.089	
European	Buphthalmos in at least one eye: yes	12	0.835	0.677	0.099
	Buphthalmos in at least one eye: no	18	0.931	0.856	
African	Buphthalmos in at least one eye: yes	12	0.122	0.211	0.069
	Buphthalmos in at least one eye: no	18	0.027	0.108	
Amerindian	Buphthalmos in at least one eye: yes	12	0.035	0.112	0.244
	Buphthalmos in at least one eye: no	18	0.018	0.037	
European	Controllable IOP with 1 surgery (if bilateral per eye)	16	0.938	0.863	0.134
	More than 1 surgery	14	0.845	0.694	
African	Controllable IOP with 1 surgery (if bilateral per eye)	16	0.033	0.089	<b>0.036*</b>
	More than 1 surgery	14	0.119	0.219	
Amerindian	Controllable IOP with 1 surgery (if bilateral per eye)	16	0.023	0.048	0.868
	More than 1 surgery	14	0.024	0.089	

Statistical analysis performed with Mann-Whitney test:  $p$  value < 0.05 = statistical significance.\*

We also detected a moderate and statistically significant positive correlation between initial AL and African component ( $r = 0.647$ ,  $p < 0.001$ ) and final AL and African component ( $r = 0.429$ ,  $p = 0.018$ ). Conversely, there was a moderate and statistically significant inverse correlation between European component and initial AL ( $r = -0.497$ ,  $p = 0.005$ ), and the final AL with the same component ( $r = -0.469$ ,  $p = 0.009$ ). Increases in AL were correlated with increases in African component rate. On the other hand, increases in AL were correlated with decreases in the proportion

of European component. No correlation was found between genomic ancestry and age of diagnosis, IOP, HCD, and CCT ( $p>0.05$ ).

## **DISCUSSION**

PCG is an important cause of childhood blindness worldwide.[6] Control of IOP, eye dimensions (HCD and AL) and optic nerve damage are important indicators of the course of PCG after surgical treatment. Angle surgery must be performed as soon as the diagnosis is established. This prompt treatment is essential to prevent its progression that impacts visual acuity and visual field.[17]

In our study, disease was bilateral in 60% ( $n=18$ ) corroborating previous data.[7,17] The male sex prevailed which is also consistent with the literature.[5,18] It was observed a low prevalence of positive family history of congenital glaucoma (16.7%) and consanguinity (3.3%) in this study, differing from Stoilov *et al.* (2002).[19] Their data from 52 Brazilian PCG patients established family history in 27 (51.9%) individuals and consanguinity in 14 (26.9%). The reason for this discrepancy remains to be established.

High IOP can lead to enlargement of the eye, breaks in Descemet's membrane (Haab's striae) and stromal edema because the young eye is still distensible.[5] In accordance with Hilal *et al.*(2010),[10] the main findings of biomicroscopy were Haab's striae, severe corneal edema and increase of corneal diameters. Asymmetric horizontal corneal diameters (46.7%) were the main sign reported in the first consultation differing from Papadopoulos *et al.*(2007), who reported as cloudy cornea the most frequent sign first recognized by parents or doctors.[7]

The definitive treatment for PCG is surgical accomplishing the goal of opening a portion of the trabecular meshwork to allow greater outflow of aqueous.[18,20] Trabeculotomy and goniotomy are the most common types of surgical procedures.[20] In our cohort, trabeculotomy was the primary surgery, since the incidence of corneal edema was high, making difficult the angle view and thereby goniotomy.

In this study, the majority of patients (93.3%) had controlled IOP, except two individuals with bilateral disease. According to Papadopoulos *et al.* (2007) after the first angle surgery 50% of eyes required a second operation, 31% a third, and 15% a fourth, within the first year to control IOP.[7] These results are similar to those of the present study which showed that 16 children had IOP control after the first surgery.

It is known that for a correct diagnosis and effective screening is necessary to monitor parameters such as IOP, AL, HCD and CCT.[4] We found that, after surgical procedure, there was a reduction in IOP and CCT measurements but not in HCD and AL. According to Beck,[21] once buphthalmos has developed, the globes do not return to normal size with glaucoma control.

Association of genomic ancestry with PCG clinical data is first reported in this study.

In 2010, the population census of IBGE showed that the Brazilian population was composed by 47.73% of Whites (Caucasians), 7.61% of Blacks, 43.13 % of Brown (“pardos” in Portuguese), 1.09% of Yellow, and 0.43% of Indigenous subjects.[22] In our data, Caucasians were the most prevalent followed by Browns and Blacks. PCG in Blacks were more prevalent than their share in the Brazilian population. Stoilov *et al.* (2002) prior to the use of genomic ancestry markers used



the self-report classification to stratify the population, despite the admixed Brazilian population and showed that 40.4% were of African descent and 57.7% of European descent.[19] The use of recent techniques (indels) could explain this discrepancy.

In this study the genomic ancestry showed a more representative European component, as previously reported by Pena *et al.* (2011).[12] Although an increase in African component in PCG patients was associated with a high number of surgeries to control IOP and higher ocular globe growth. This suggests that ancestry component can influence the prognosis of this disease. Based on these results, we infer that increased African component might be a risk factor to PCG.

The epidemiological and inheritance data is routinely evaluated to ascertain variations in terms of prevention and treatment. PCG, although rare, causes a disproportionately high percentage of childhood blindness worldwide. Early detection and treatment of this disease is essential to preserve vision. We concluded that increased African component may be associated with worse prognosis in PCG. Genomic ancestry markers may be helpful in assessing risk factors for surgical outcomes in PCG in heterogeneous populations such as Brazilians. Further studies are needed to unveil the role of ancestry in primary congenital glaucoma in admixed populations.

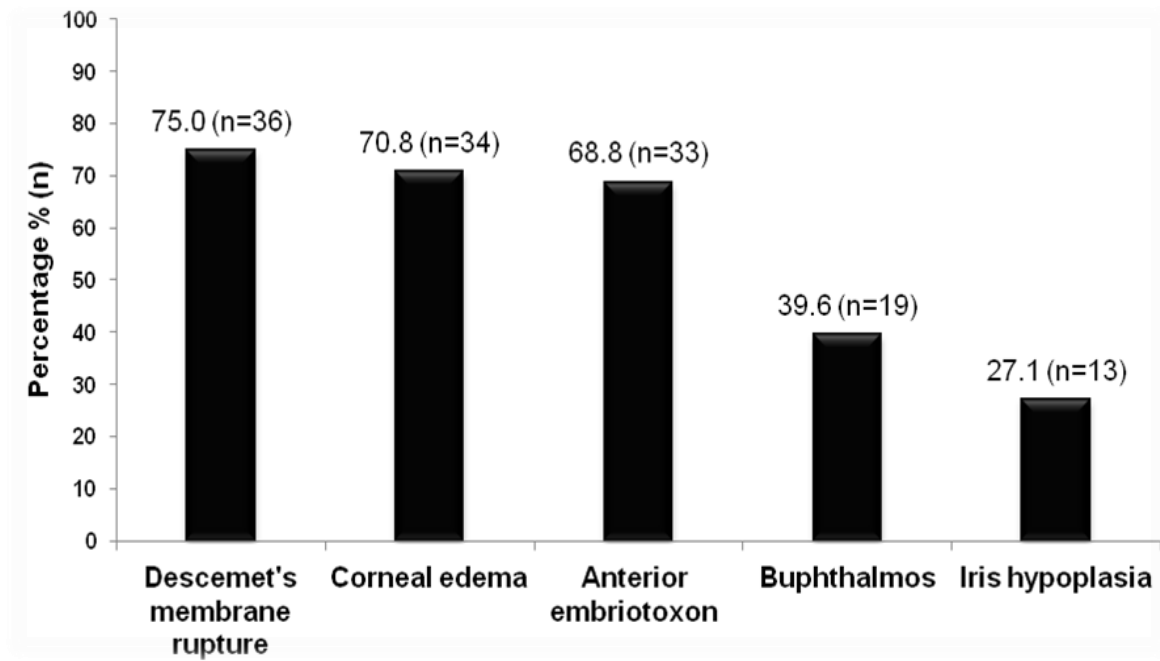
## REFERENCES

1. Turacli ME, Aktan SG, Sayli BS, *et al.* Therapeutical and genetical aspects of congenital glaucomas. *Int Ophthalmol* 1992;16:359–62.
2. Alanazi FF, Song JC, Mousa A, *et al.* Primary and secondary congenital glaucoma: baseline features from a registry at King Khaled Eye Specialist Hospital, Riyadh, Saudi Arabia. *Am J Ophthalmol* 2013;155:882-9.
3. Sena DF, 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 Genet* 2004;41:e6.
4. Zhang X, Du S, Fan Q, *et al.* Long-term surgical outcomes of primary congenital glaucoma in China. *Clinics* 2009;64:543-51.
5. Aponte EP, Diehl N, Mohny BG. Incidence and clinical characteristics of childhood glaucoma: a population-based study. *Arch Ophthalmol* 2010;128:478-82.
6. Bejjani BA, Stockton DW, Lewis RA, *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;9:367-74.
7. Papadopoulos M, Cable N, Rabi J, *et al.* The British Infantile and Childhood Glaucoma (BIG) Eye Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:4100-6.

8. Firasat S, Riazuddin SA, Hejtmancik JF, *et al.* Primary congenital glaucoma localizes to chromosome 14q24.2-24.3 in two consanguineous Pakistani families. *Mol Vis* 2008;14:1659-65.
9. Lim SH, Tran-Viet KN, Yanovitch TL, *et al.* *CYP1B1*, *MYOC* and *LTBP2* mutations in primary congenital glaucoma patients in the United States. *Am J Ophthalmol* 2013;155:508-17.
10. Hilal L, Boutayeb S, Serrou A, *et al.* Screening of *CYP1B1* and *MYOC* in Moroccan families with primary congenital glaucoma: three novel mutations in *CYP1B1*. *Mol Vis* 2010;16:1215-26.
11. Bastos-Rodrigues L, Pimenta JR, Pena SD. The genetic structure of human populations studied through short insertion-deletion polymorphisms. *Ann Hum Genet.* 2006;70:658-65.
12. Pena SDJ, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, *et al.* The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One* 2011;6(2):e17063.
13. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, *et al.* Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:177-82.
14. Meyer G, Schwenn O, Pfeiffer N, *et al.* Trabeculotomy in congenital glaucoma. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 2000;238:207-13.
15. Essuman VA, Braimah IZ, Ndanu TA, *et al.* Combined trabeculotomy and trabeculectomy: outcome for primary congenital glaucoma in a West African population. *Eye (Lond)* 2011;25:77-83.

16. Cann HM, de Toma C, Cazes L, *et al.* A human genome diversity cell line panel. *Science* 2002; 296:261-2.
17. Abu-Amero KK, Osman EA, Mousa A, *et al.* Screening of *CYP1B1* and *LTBP2* genes in Saudi families with primary congenital glaucoma: genotype-phenotype correlation. *Mol Vis* 2011;17:2911-9.
18. Chang TC, Cavuoto KM. Surgical management in primary congenital glaucoma: four debates. *J Ophthalmol* 2013;2013:612708.
19. Stoilov IR, Costa VP, Vasconcellos JP, *et al.* Molecular genetics of primary congenital glaucoma in Brazil. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:1820-7.
20. Kiefer G, Schwenn O, Grehn F. Correlation of postoperative axial length growth and intraocular pressure in congenital glaucoma - a retrospective study in trabeculotomy and goniotomy. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 2001;239:893-9.
21. Beck AD. Diagnosis and management of pediatric glaucoma. *Ophthalmol Clin of North Am* 2001;14:501-12 .
22. Censo demográfico 2010. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. [www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010) (accessed 18 Jul 2013).

Figure 1.



**Figure 1.** Main findings on biomicroscopy at diagnosis time in 30 PCG patients (n=48 eyes)

**ANEXO C**

***Primary congenital glaucoma: novel mutations in CYP1B1 gene and African ancestry in Brazilian patients***

**Glaucoma congênito primário: novas mutações no gene CYP1B1 e componente ancestral africano em pacientes brasileiros**

**Primary congenital glaucoma: novel mutations in *CYP1B1* gene and African ancestry in Brazilians patients**

Hévila Rolim<sup>1,2</sup>, Sebastião Cronemberger<sup>1</sup>, Wagner Duarte Batista<sup>2</sup>, Nassim Calixto<sup>1</sup>,  
Luciana Bastos-Rodrigues<sup>3,4</sup>, Luiz De Marco<sup>3,5</sup>

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, Glaucoma Service, Hospital São Geraldo, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

<sup>2</sup>Glaucoma and Cataract Reference Center, Santa Casa de Belo Horizonte, Belo Horizonte, Brazil

<sup>3</sup>Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Medicina Molecular (INCT/MM), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

<sup>4</sup>Basic Sciences Department, Health Area, Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Governador Valadares, Governador Valadares, Brazil

<sup>5</sup>Department of Surgery, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

**Competing interests:** None

**Address all correspondence to:** Hévila Rolim

Av. Alfredo Balena 190, room 325. Belo Horizonte 30130-100, Brazil

**Phone/Fax:** +55(31)3409-9134 **Email:** hevinha@hotmail.com

**Key words:** primary congenital glaucoma, *CYP1B1*, gene, mutation, ancestry

## **ABSTRACT**

Purpose: To present new molecular data in primary congenital glaucoma (PCG) and to determine whether genetically determined African ancestry is associated with the presence of *CYP1B1* mutations or prognosis in Brazilian PCG patients.

Methods: Thirty unrelated PCG patients and 60 controls were screened for *CYP1B1* variations by DNA direct sequencing analysis. African ancestry was estimated using 40 validated ancestry-informative insertion-deletion DNA polymorphisms (indels).

Results: *CYP1B1* mutations were present in 36.7% patients. Three novel mutations (p.Gln109→Stop, p.Ser476→Pro and fs.1416delC) were identified. No association was found between genomic ancestry and *CYP1B1* mutation status (presence or absence). Lower African ancestry was associated with better disease prognosis (intraocular pressure controlled with one trabeculectomy) in univariate analysis ( $p=0.036$ ) and when adjusted for presence of *CYP1B1* mutations, age of diagnosis, ocular involvement and presence of buphthalmos in at least one eye at diagnosis.

Conclusions: Our results support that mutations in *CYP1B1* are the major cause for PCG worldwide. For the first time, we demonstrate, using genetically determined ancestry that lower African ancestry may be protective for primary congenital glaucoma prognosis.



## INTRODUCTION

Primary congenital glaucoma (PCG; OMIM 231300) is characterized by marked increase of intraocular pressure (IOP) at birth or early childhood (generally before age of three years), large ocular globes (buphthalmos) and corneal edema.<sup>1</sup> It results from abnormal development of the ocular anterior segment, including the trabecular meshwork, anterior chamber angle and aqueous outflow pathways.<sup>2</sup>

In 60% to 80% of patients, it is a bilateral disease and clinical signs and symptoms may not be equally present in both eyes.<sup>3</sup> PCG is more common in males and clinical findings vary depending on age of onset and the severity of glaucoma, and diagnosis is based on them.<sup>3,4</sup>

The primary goal of the treatment is to normalize IOP, eliminating surgically the resistance of aqueous outflow pathways. Sometimes is necessary more than one surgical intervention to control IOP. Topical medications help to control IOP when surgery has led to incomplete control of the glaucoma.<sup>3,5</sup> Control of IOP, ocular dimensions and optic nerve damage are important indicators of PCG course after surgery.<sup>6</sup>

PCG is an important cause of childhood blindness worldwide,<sup>4</sup> and accounts for approximately 10.8% of visual impairment at low vision services of a Brazilian study.<sup>7</sup> Birth incidence is geographically and ethnically variable, estimated at 1:10,000-38,000 in Western countries; 1:3,030 in Saudi Arabia and 1:1,250 in the Gypsy population of Slovakia.<sup>1,8</sup> Disease is familial in 10-40% of cases. An autosomal recessive pattern of inheritance with variable penetrance is common (40-100%), particularly in populations where there is a higher rate of consanguineous marriages.<sup>4</sup>

Four *loci* have been linked to PCG: the major locus GLC3A on 2p21, GLC3B on 1p36.2-p36.1, GLC3C on 14q24.3, and GLC3D on 14q24.2-24.3.<sup>9</sup> There are only two genes in which mutations are currently known to cause PCG: *CYP1B1* that encodes the protein cytochrome *P450*, subfamily *I*, polypeptide *I* on locus GLC3A and *LTBP2* that encodes the protein latent-transforming growth factor beta-binding protein 2 on locus GLC3D.<sup>10</sup>

*CYP1B1* is a member of the cytochrome *P450* gene superfamily and encodes a protein of 453 amino acids. This protein, a monooxygenase localized to the endoplasmic reticulum, is involved in the phase 1 metabolism of a variety of substrates, including steroids, procarcinogens, retinoids, and drugs.<sup>2,10,11</sup> Most of *CYP1B1* mutations in PCG patients have been identified in variable frequency worldwide with a high prevalence in homogeneous and inbred population.<sup>12</sup> Mutations in *CYP1B1* have also been described in Peters' anomaly, Sturge-Weber Syndrome, Rieger's anomaly and juvenile open-angle glaucoma.<sup>11</sup>

Brazilians have been considered a trihybrid population formed by an intense fusing of genes proceeding from native Amerindians, European colonizers and African slaves. A set of 40 autosomal short insertion-deletion DNA polymorphisms (indels) is sufficient for the characterization of human population structure and efficiently separate African, European and Amerindian ancestry.<sup>13</sup>

Samples of Brazilian individuals from different populations groups have been tested with indels and the results suggested that phenotype characteristics can mask the "genetic ancestry". Individuals grouped phenotypically as African descent and European descent should not be classified as a risk group in medical literature based

on skin color, because skin color is a poor predictor of African ancestry in Brazil.<sup>14</sup> For this analysis, it is necessary to study ancestry using genetic markers.

The contribution of *CYP1B1* mutations to PCG etiology varies among populations and the exact role this gene product plays in congenital glaucoma is not well understood. The aim of this study is to provide new molecular genetic data and to study genomic ancestry in primary congenital glaucoma in Brazil.

## **METHODS**

Participants were recruited consecutively from a tertiary eye care center in a state of the southeast of Brazil. Thirty patients had PCG and 60 were unrelated controls. Patients seen at this hospital are referred from diverse urban and rural areas and are representative of state. The University's Human Research Ethics Committee approved the study protocol (CAAE 0305.0.203.000-11) which adhered to the tenets of the Declaration of Helsinki, and written informed consent was obtained by controls and the legal guardian of PCG patients.

Probands inclusion criteria were: PCG with an early onset (age 0-3 years) manifested by symptoms of elevated IOP and corneal edema; trabeculotomy as initial procedure and on second surgical attempt and trabeculectomy with mitomycin C as third surgery when was necessary; minimum follow-up of six months after last surgical intervention. Proband with IOP  $\leq$  14 mmHg was considered to have surgical success and a child who performed just one trabeculotomy to control IOP (per eye if bilateral involvement) was considered to have a good disease prognosis. Each affected participant underwent a complete eye examination, including slit lamp biomicroscopy, measurement of intraocular pressure with a Perkins hand-held applanation tonometer (Haag-Streit, Koniz, Switzerland), cornea's horizontal

diameter and thickness, and ultrasound biometry with DGH5100e pachymeter and echo-biometer (DGH Technology, Inc., Exton, PA, USA). When necessary, examination was done under anesthesia. In these cases, IOP was measured during the first 10 minutes after anesthesia induction.

Individuals presenting with secondary glaucoma or other associated ocular and systemic anomalies were excluded. Demographic and clinical data were registered. Controls free from glaucoma by examination were recruited. They had no metabolic, genetic, ocular disorders and negative family history of glaucoma or blindness. Controls with IOP  $\geq$  14 mmHg or suspicious optic discs were also excluded.

### **Mutation Analysis**

Genomic DNA from controls, affected children and their parents was extracted from peripheral whole blood. Exon 1 and the entire coding region including exon-intron boundaries of *CYP1B1* were amplified with polymerase chain reaction (PCR) using the primers listed in table 1.

For PCR reactions, 2  $\mu$ l of each DNA at 30 ng/ $\mu$ l were mixed to 2.5  $\mu$ l of 10X IIB Buffer (40 mM NaCl; 10 mM Tris HCl pH 8.4; 0.1% Triton X-100; 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>), 2.5  $\mu$ l of 0.2 mM dNTP, 0.5  $\mu$ l of each primer at 10 pmol/ $\mu$ l and 0.25  $\mu$ l of Taq polymerase 0.625 U, on a final volume of 25  $\mu$ l. Samples were placed on an Eppendorf Mastercycler (Hamburg, Germany) at 94°C for 3 minutes and then 35 cycles of 94°C for 30 seconds, 55°C for 30 seconds and 72°C for 30 seconds and a final extension time at 72°C for 5 minutes. PCR products were purified using Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, São Paulo, Brazil)

following manufacturer's protocol and visualized on a silver-stained 6.5% polyacrylamide gel.

Sequences were obtained on ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Bidirectional sequence data were analyzed by using Sequencer 5.0 software (Gene Codes Corp, Ann Arbor, Michigan) and compared with RefSeq sequence (ENSG00000138061, transcript ID ENST00000260630).

### **Computational assessment of DNA changes**

PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2) software was used to predict the structural impact of missense changes identified in this study.<sup>15</sup> PROVEAN (Protein Variation Effect Analyzer) was computed to predict the functional impact of new protein sequence variations.<sup>16</sup>

### **Genomic ancestry analysis**

DNA from each individual was independently genotyped as previously described<sup>13</sup> for a panel of 40 validated ancestry-informative indels.<sup>14</sup>

To estimate the quantitative proportion of European, African and Amerindian components of ancestry at an individual level, we used the Structure program (version 2.3). We calculated the mean and standard error of the mean (SEM) of individual estimates for each group (probands and controls).

### **Statistical Analysis**

To evaluate the genotype-phenotype correlation, we compared the following parameters between PCG patients with and without mutations: sex, eye involvement, presence of buphthalmos in at least one eye at time of diagnosis, age of diagnosis, and number of surgical procedures (one or more than one intervention). Fisher exact test was used for categorical variables and Mann-Whitney for continuous variables.

Mann-Whitney test was used to evaluate the relationship between genomic ancestry and presence of *CYP1B1* mutation and clinical parameters, except age of diagnosis. To assess the relationship between genetic ancestry and age of diagnosis, Pearson correlation coefficient ( $r$ ) was computed and weak association ( $r < 0.400$ ) was considered non significant. Multivariate analysis (generalized logistic regression) of eye involvement, age at diagnosis, presence of buphthalmos in at least one eye at time of diagnosis, presence of *CYP1B1* mutation and African ancestry was used to identify factors associated with good prognosis. Data were analyzed with SPSS version 19.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). In all analyses,  $p < 0.05$  was taken to indicate statistical significance.

## RESULTS

### Mutation Analysis of *CYP1B1* gene

Sequencing analysis in 30 PCG patients resulted in an identification of 10 mutations, to our knowledge, three of which are novel, and seven have been identified in earlier reports as PCG-causing mutations (table 2). They were present in eleven (36.7%) affected individuals, with nine cases (30%) having a single one and two (6.7%) with double distinct mutations in the gene. Nineteen (63.3%) probands had no mutation.

We detected three missense mutations: p.Ala443→Gly (PolyPhen-2 score of 0), p.Arg444→Gln (PolyPhen-2 score of 1), and p.Ser476→Pro (PolyPhen-2 score of 0.998). PROVEAN scores were -2.798 for p.Gln109→Stop and -3.213 for p.Ser476→Pro.

Five affected individuals (16.7%) were heterozygous. One proband showed compound heterozygosity for two novel mutations (p.Gln109→Stop and

p.Ser476→Pro). In another case, a homozygous deletion (g.4339/4340delG) in exon 2 and a heterozygous insertion (g.8037-8046ins10) in exon 3 were detected. An interesting instance was observed in this patient, whereas his mother was heterozygous for the deletion and his father, after several rounds of sequencing, was found to be homozygous for the wild-type allele. Conversely, the father was heterozygous for the insertion. In order to assess the question of no paternity, we genotyped 40 indels and none of these autosomal markers showed any evidence of incompatibility in this pedigree.

None of the mutations described above were present in the 120 chromosomes from unrelated controls. DNA sequencing identified four single nucleotide polymorphisms (SNPs) in probands and controls: c.142C→G (p.Arg→48Gly), c.355G→T (p.Ala119→Ser), c.1294G→C (p.Val432→Leu) and c.1347T→C. Three SNPs were present only in PCG cases: c.564C→A, c.729G→C and c.1358A→G (p.Asn453→Ser). PolyPhen-2 software showed that their structural impact was predicted to be benign.

### **Genotype-phenotype correlation**

Clinical data are shown in table 3. There was a minor association between age of diagnosis and mutation status with an earlier diagnosis in the group of probands with *CYP1B1* mutations (mean age of 4.3 months vs. 7.4 months), but this difference was not statistically significant ( $p=0.055$ ). The frequency of bilateral disease in the group of patients with causative mutations was higher (100%) than that observed in the group without mutations (50%), but this minor correlation was not statistically significant ( $p=0.057$ ). We detected variable expressivity in relation to presence of

*CYP1B1* mutations and gender, skin color, presence of buphthalmos in at least one eye and number of surgical procedures ( $p>0.05$ ).

IOP (mmHg), CCT ( $\mu\text{m}$ ), HCD (mm) and AL (mm) values at initial and final exams are shown in table 4. Correlations between mutation status (presence or absence) and these parameters were not statistically significant.

### **Genomic ancestry analysis**

Children with PCG had an ancestry ratio of European, African and Amerindian of  $0.784 \pm 0.044$  (mean  $\pm$  SE),  $0.149 \pm 0.035$  and  $0.067 \pm 0.023$ , respectively, and the control group  $0.730 \pm 0.048$ ,  $0.132 \pm 0.034$  and  $0.138 \pm 0.032$ , respectively. Differences in these ratios between probands and controls were not significant ( $p>0.05$ ). No association was observed between genomic ancestry and *CYP1B1* mutation status (table 5). African ancestry was not associated with presence of buphthalmos in at least one eye at diagnosis ( $p=0.069$ ) and eye involvement, ( $p=0.0849$ ) and was weakly correlated with age of diagnosis ( $r=0.258$ ,  $p=0.169$ ). Lower African ancestry was associated with good disease prognosis in univariate analysis (table 6) and when adjusted for presence of *CYP1B1* mutations, age of diagnosis, ocular involvement and presence of buphthalmos in at least one eye at diagnosis with logistic regression ( $\chi^2$  de Wald=3.865,  $p=0.049$ ).

### **DISCUSSION**

*CYP1B1* gene, that had been mapped to the 2p21-22 region, is well known for its association with PCG.<sup>8,10,17,18</sup> The prevalence of *CYP1B1* mutations in individuals with PCG ranges from 17.2% in Chinese,<sup>19</sup> 47.8% among Moroccan,<sup>12</sup> to almost 100% in Saudi Arabians,<sup>4</sup> and Slovakian Gypsies.<sup>8</sup> The relatively higher prevalence of these mutations in the last two populations could be attributed to consanguinity



and inbreeding. In Brazilian studies, first Stoilov *et al.* (2002) identified mutations in 50% of the PCG patients.<sup>17</sup> Although, Della Paolera *et al.* (2010) found a lower frequency (30%) in accordance to our study.<sup>18</sup> This difference was probably due to the sample composition (consanguinity and sporadic/familial cases) and geographically background.

*CYP1B1* gene comprises three exons (exon 1 is non coding) and two introns. and exon 3 encodes the heme binding domain at the C-terminus, which is essential for the catalytic function.<sup>11,20,21</sup> Its protein is expressed in tissues of the anterior chamber of the eye such as ciliary body and iris.<sup>20</sup> The enzyme produced probably participates in the metabolism of an important biologically molecule that hypothetically takes part in the normal anterior eye segment development and function.<sup>2</sup>

The frameshift and nonsense mutations found in this study (70%) are predicted to truncate the open-reading frame that is essential for the proper folding and in heme binding of a *P450* molecule, resulting in an inactive protein product or in severely impairment of protein's function.<sup>10,20,21</sup> In 36.7% of the patients an autosomal recessive transmission was identified with the presence of homozygous or heterozygous mutations in *CYP1B1*. In fact, five carriers were heterozygotes and showed non-Mendelian segregation. Similar finding was also observed in previous studies, suggesting that in these cases the pathogenesis involves others genes or unknown variations.<sup>12,19,21</sup>

Stoilov *et al.* (2002)<sup>17</sup> described four novel mutations and Della Paolera *et al.* (2010), three.<sup>18</sup> Our finding of three novel mutations is consistent with these studies and from other countries and ethnic groups,<sup>10,12,19,21</sup> where novel mutations and a

high number of genetic insertions and deletions in *CYP1B1* gene are commonly observed, indicating that this gene is relatively susceptible to recombination events.<sup>11</sup>

Based on these facts, we hypothesized, that in the case of the homozygous mutation in a child with a non-carrier father, a mutant allele carrier was inherited by the mother and a mutation seem to have occurred *de novo* on allele transmitted by the non-carrier parent since we have found no evidence for non paternity. The probability of occurrence this event is higher in disorders in which new mutations are frequent.<sup>22</sup>

We are unaware of previous reports of p.Gln109→Stop, p.Ser476→Pro and frameshift c.1416delC (figure 1), and their mutational effect is unknown, following a brief description of these novel mutations with structural and functional implications.

Glutamine109→Stop (p.Gln109→Stop) mutation: position affected by this mutation is located in the cytosolic globular domain of the *CYP1B1* gene,<sup>11,21</sup> and a single-base cytosine (C) was replaced by thymine (T), coding nucleotide number c.325 in exon 2 (figure 1.a). This resulted in a codon change from CAG to TAG and p.Gln109→Stop non-sense mutation. This change produces a truncated protein of 108 amino acids, disrupting proper protein folding to create the heme binding domain. This mutated protein might lack all functional domains. PROVEAN score also predicts a deleterious functional effect to *CYP1B1* protein with this change.

Serine476→Proline (Ser476→Pro) mutation: a nonsynonymous mutation consisted of an alteration of nucleotide 1426 from T to C, that resulted in a codon change from TCT to CCT and amino acid substitution from serine to proline at codon 476 (p.S476P) in the conserved L helix of exon 3 (figure 1.b).<sup>23</sup> PolyPhen-2 score also indicates that this change is probably damaging to the protein structure. Serine

at CYP1B1 codon 476 is a highly conserved amino acid among species (figure 2) and this sequence change might alter *CYP1B1* expression and the metabolic activity of protein, and cause ocular developmental defects. PROVEAN software also predicts that this amino acid substitution has a deleterious impact on the biological function of *CYP1B1* protein. In this position was also described a deletion (*rs72549374*).

These compound heterozygous mutations were only reported in one female patient, who had a high proportion of Ameridian component (0.669), bilateral disease with early onset (three days) and presence of buphthalmos at diagnosis in both eyes. It was necessary more than one surgery to control IOP and surgical success was acquired with two topical medications.

Frameshift fs.1416delC: this heterozygous mutation (figure 1.c) was observed in one male proband and his father at codon 472 in the conserved L helix of exon 3.<sup>23</sup> This deletion of C leads to a change in the reading frame and premature termination of the polypeptide chain at codon 503 and disrupts *CYP1B1* protein translation, resulting in a truncated protein and a probably nonfunctional enzyme inactive protein product. This affected patient with high proportion of European component (0.858) had bilateral disease with age of onset of four months without buphthalmos at diagnosis. For surgical success were necessary two surgeries per eye.

Stoilov *et al.* (2002)<sup>17</sup> and Hilal *et al.* (2010)<sup>12</sup> described the mutation 4339/4340delG as the most common in a Brazilian (20.2%) and a Moroccan (34.44%) studies, respectively. This frameshift results in a premature stop codon 51/52 amino acids downstream from the mutation site, eliminating the entire carboxyl-terminal region required for the proper function of cytochrome *P450*, most

notably the heme-binding portion.<sup>17,18</sup> Brazilian PCG patients had bilateral disease, with early onset (within 15 days), aggressive course and poor response to surgical treatment.<sup>17</sup> Della Paolera *et al.* (2010) also observed this mutation, in heterozygosis, with a severe phenotype, but in a lower frequency (6.7%).<sup>18</sup> Conversely, we observed only one patient with this homozygous mutation, with bilateral disease with age of onset at 2 months and good prognosis (surgical success with just one trabeculotomy per eye) after 41 months of follow-up. The reason for this phenotype discrepancy remains to be established and the lower frequency can be due to the higher prevalence of consanguinity and positive family history of PCG in these studies.

SNPs identified did not co-segregate with PCG phenotype, and they were also found in probands and health patients in previous studies.<sup>12,17,20</sup> When p.Arg48→Gly and p.Ala119→Ser were present, they were always co-inherited. This linked amino acid substitution, which does not alter *CYP1B1* function, has already been reported.<sup>24</sup>

When concerning about PCG and *CYP1B1* mutations, genotype-phenotype correlations are variable. Weisschuh *et al.* (2009) compared individuals with *CYP1B1* mutations with negative mutation cases and no significant differences were found with clinical findings (age of onset, severity and response to therapy).<sup>25</sup> In a Spanish PCG cohort,<sup>26</sup> the percentage of bilateral cases, age at diagnosis, gender ratio, and number of surgeries did not differ between *CYP1B1* carriers and non-carriers. In our cohort we also noted that phenotype of PCG probands with mutation did not differ from those without mutations. Others studies also reported similar observations.<sup>27,28</sup> Abu-Amero *et al.*(2011) observed no correlation between corneal diameter and IOP in the preoperative and last postoperative visit in accordance to our study.<sup>29</sup>

No *CYP1B1* mutation was detected in the two patients of our study who had worst prognosis (uncontrolled IOP) with poor visual outcomes. Conversely, other studies had reported that PCG individuals with *CYP1B1* mutations tend to have a more severe phenotype with earlier age of onset,<sup>17,19,21,30</sup> bilateral disease,<sup>17,19</sup> presence of buphthalmos in at least one eye at diagnosis,<sup>30</sup> worse prognosis with more than one surgical procedure to control IOP.<sup>18,21,30</sup> These conflict findings remains unclear, might be due to geographically background, inbreeding, surgical techniques and sample compositions.

The genetic structure of Brazilian population is approximately 80% European, 15% African and 5% Amerindian with significant variation between regions.<sup>13,14</sup> Although in a previous Brazilian study,<sup>17</sup> before the use of genomic ancestry markers to stratify an admixed population, *CYP1B1* mutations were found to be more frequent in individuals with European descent than African descent. In our study was not observed this relationship. Based on these findings, we should not affirm that *CYP1B1* may have a lesser role in PCG status of African ancestry in a heterogeneous population as Brazil.

This study of genomic ancestry suggests that lower African ancestry component is associated with a better disease prognosis. When considered others variables in PCG such as status mutation, lower African component was also a factor associated with good prognosis.

The main causative gene worldwide of primary congenital glaucoma is *CYP1B1*. In our patients, the absence of mutations in *CYP1B1* in 63.3% suggests that in these cases the mode of inheritance remains unclear, resulting from other genetic or undetermined causes. In conclusion, we find no evidence of association

between ancestry and mutations in *CYP1B1* in a Brazilian population. In the other hand, we show for the first time, using genetically determined ancestry, that lower African ancestry may be protective for primary congenital glaucoma prognosis functioning through either in the presence of *CYP1B1* mutations.

## REFERENCES

1. Alanazi FF, Song JC, Mousa A, Morales J, Al Shahwan S, Alodhayb S, *et al.* Primary and secondary congenital glaucoma: baseline features from a registry at King Khaled Eye Specialist Hospital, Riyadh, Saudi Arabia. *Am J Ophthalmol.* 2013;155(5):882-9.
2. Sena DF, 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 Genet.* 2004;41:e6.
3. deLuise VP, Anderson DR. Primary infantile glaucoma (congenital glaucoma). *Surv Ophthalmol.* 1983;28:1-19.
4. 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;9:367-74.
5. Saltzmann RM, Reinecke S, Lin X, Cavanagh HD, Whitson JT. Long-term outcomes of a pseudo 360-degree trabeculotomy ab externo technique for congenital glaucoma at children's medical center. *Clinical Ophthalmology.* 2012;6:689-98.
6. Mendes MH, Sakata L, Betinjane AJ. Central corneal thickness and its correlation with other ocular biometric data in patients with congenital glaucoma. *Arq Bras Oftalmol.* 2011;74(2):85-7.
7. Haddad MA, Sei M, Sampaio MW, Kara-José N. Causes of visual impairment in children: a study 3,210 cases. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus.* 2007;44(4):232-40.

8. 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.
9. 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.
10. Lim SH, Tran-Viet KN, Yanovitch TL, Freedman SF, Klemm T, Call W, *et al.* *CYP1B1*, *MYOC*, and *LTBP2* mutations in primary congenital glaucoma patients in the United States. *Am J Ophthalmol.* 2013;155(3):508-17.
11. Vasiliou V, Gonzalez FJ. Role of *CYP1B1* in glaucoma. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2008;48:333-58.
12. Hilal L, Boutayeb S, Serrou A, Refass-Buret L, Shisseh H, Bencherifa F, *et al.* Screening of *CYP1B1* and *MYOC* in Moroccan families with primary congenital glaucoma: three novel mutations in *CYP1B1*. *Mol Vis.* 2010;16:1215-26.
13. Bastos-Rodrigues L, Pimenta JR, Pena SD. The genetic structure of human populations studied through short insertion-deletion polymorphisms. *Ann Hum Genet.* 2006;70(Pt 5):658-65.
14. Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy Fde S, *et al.* The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS ONE.* 2011; 6(2): e17063.
15. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, *et al.* A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods.* 2010;7(4):248-9.



16. Choi Y, Sims GE, Murphy S, Miller Jr, Chan AP. Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. *PLoS ONE*. 2012;7(10):e46688.
17. Stoilov IR, Costa VP, Vasconcellos JP, Melo MB, Betinjane AJ, Carani JC, *et al*. Molecular genetics of primary congenital glaucoma in Brazil. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002;43(6):1820-7.
18. Della Paolera M, de Vasconcellos JP, 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;19:176-82.
19. Chen Y, Jiang D, Yu L, Katz B, Zhang K, Wan B, Sun X. *CYP1B1* and *MYOC* mutations in 116 Chinese patients with primary congenital glaucoma. *Arch Ophthalmol*. 2008;126(10):1443-7.
20. 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;62:573-84.
21. 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.
22. Zlotogora J. Parents of children with autosomal recessive diseases are not always carriers of the respective mutant alleles. *Hum Genet*. 2004;114:521-6.

23. Mammen JS, Pittman GS, Li Y, Abou-Zahr F, Bejjani BA, Bell DA, *et al.* Single amino acid mutations, but not common polymorphisms, decrease the activity of *CYP1B1* against (-)benzo[a] pyrene-7R-trans-7,8-dihydrodiol. *Carcinogenesis*. 2003;24(7):1247-55.
24. 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.
25. 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.
26. Campos-Mollo E, López-Garrido MP, Blanco-Marchite C, Garcia-Feijoo J, Peralta J, Belmonte-Martínez J, *et al.* *CYP1B1* mutations in Spanish patients with primary congenital glaucoma: phenotypic and functional variability. *Mol Vis*. 2009;15:417-31.
27. Curry SM, Daou AG, Hermanns P, Molinari A, Lewis RA, Bejjani BA. Cytochrome *P4501B1* mutations cause only part of primary congenital glaucoma in Ecuador. *Ophthalmic Genet*. 2004;25(1):3-9.
28. Alfadhli S, Behbehani A, Elshafey A, Abdelmoaty S, Al-Awadi S. Molecular and clinical evaluation of primary congenital glaucoma in Kuwait. *Am J Ophthalmol*. 2006;141(3):512-6.
29. Abu-Amero KK, Osman EA, 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;17:2911-9.

30. 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.

## TABLES AND FIGURES

Table 1. Primers sets used to amplify *CYP1B1* from genomic DNA

Primer*	Exon	Sequence (5'→ 3')	Amplicon size (bp)
CYP1F	1	CCCTCCTTCTACCCAGTCCT	441
CYP1R	1	CCTCGGCAGACAGACTGAC	
CYP2AF	2	GTGTCACGCCTTCTCCTCTC	330
CYP2AR	2	CGCCATTCAGCACCACTAT	
CYP2BF	2	CTACGGCGACGTTTTCCAG	267
CYP2BR	2	GTGGCCCTCGAGGACTTG	
CYP2CF	2	CATGATGCGCAACTTCTTCA	387
CYP2CR	2	TGCCTCAAGAACTTGTCCAG	
CYP2DF	2	AACCGCAACTTCAGCAACTTC	298
CYP2DR	2	TTTTTCAGAGGAGAAAAGACCTG	
CYP3AF	3	GCTCACTTGCTTTTCTCTCTCC	381
CYP3AR	3	TCATCACTCTGCTGGTCAGG	
CYP3BF	3	AACCCGGAGAACTTTGATCC	352
CYP3BR	3	AAAATTTTCAGCTTGCCTCTTG	

Primer\*: F = forward; R = reverse

**Table 2. Mutations detected in 11 probands and the predicted effected on *CYP1B1* gene**

Exon	Genomic DNA position	Codon	Nucleotide change	Predicted effect	Mutation	N*	References
2	g.3976G>A	57	c.171G→A	Trp57→Stop	Homozygous	2	Stoilov <i>et al.</i> (2002), <sup>17</sup> Lim <i>et al.</i> (2013) <sup>10</sup>
2	g.4130C>T	109	c.325C→T	Gln109→Stop	Heterozygous	1	novel mutation
2	g.4339/4340delG	179	c.535delG	Frameshift	Homozygous	1	Stoilov <i>et al.</i> (2002), <sup>17</sup> Hilal <i>et al.</i> (2010) <sup>12</sup>
3	g.7901_7913del13	355	c.1064_1076del13	Frameshift	Heterozygous	1	Stoilov <i>et al.</i> (2002), <sup>17</sup> Della Paolera <i>et al.</i> (2010) <sup>18</sup>
3	g.8037_8046ins10	403	c.1200_1209ins10	Frameshift	Heterozygous	1	Stoilov <i>et al.</i> (2002), <sup>17</sup> Stoilov A <i>et al.</i> (1998) <sup>20</sup>
3	g.8165C>G	443	c.1328C→G	Ala443→Gly	Heterozygous	2	Stoilov <i>et al.</i> (2002), <sup>17</sup> Della Paolera <i>et al.</i> (2010) <sup>18</sup>
3	g.8167C>T	444	c.1330C→T	Arg444→Stop	Heterozygous	1	Abu-Amero <i>et al.</i> (2011) <sup>29</sup>
3	g.8168G>A	444	c.1331G→A	Arg444→Gln	Homozygous	2	Mashima <i>et al.</i> (2001) <sup>24</sup>
3	g.8253delC	472	c.1416delC	Frameshift	Heterozygous	1	novel mutation
3	g.8263T>C	476	c.1426T→C	Ser476→Pro	Heterozygous	1	novel mutation

N\*= number of probands

**Table 3. Primary congenital glaucoma study characteristics (30 probands)**

<b>Clinical data</b>	<b>Probands</b>	<b><i>CYP1B1</i> mutation +</b>
Patients, n	30	11
Male/female, n (%)	16(53.3)/14(46.7)	4(36.4)/7(63.6)
Unilateral / bilateral disease, n (%)	12(40)/18(60)	3(27.3)/8(72.7)
Familial case, n (%)	5 (16.7)	2 (18.2)
Surgical success, n (%)	28 (93.3)	11 (100)
Buphthalmos in at least one eye, n (%)	12 (40)	5 (45.5)
Controlled IOP with 1 surgery (per eye if bilateral disease), n (%)	16 (53.3)	7 (63.6)
More than 1 surgery, n (%)	14 (46.7)	4 (36.4)
Mean age of diagnosis (range), months	9.2 (0-31)	4.3 (0-19)

**Table 4. Clinical parameters at initial and final exams in 30 primary congenital glaucoma patients with 48 eyes performed surgical procedures**

<b>Parameters<sup>a</sup></b>	<b>Before 1st surgery (mean ± SD)<sup>b</sup></b>	<b>Final exam (mean ± SD)<sup>b</sup></b>	<b>P value</b>
<b>IOP</b>	19.94 ± 6.32	11.31 ± 5.30	<0.001
<b>CCT</b>	659.36 ± 106.79	558.68 ± 47.51	<0.001
<b>HCD</b>	12.92 ± 1.28	13.72 ± 1.17	<0.001
<b>AL</b>	22.72 ± 2.50	25.12 ± 3.14	<0.001

**Parameters<sup>a</sup>: IOP = intraocular pressure, CCT = central corneal thickness, HCD = horizontal corneal diameter, AL = axial length; SD = standard deviation**

**Table 5. Association of genomic ancestry and *CYP1B1* mutation status in 30 primary congenital glaucoma patients**

<b>Indel proportion</b>	<b><i>CYP1B1</i> mutation status</b>	<b>N*</b>	<b>Median</b>	<b>Mean</b>	<b>P value</b>
<b>European</b>	Presence	11	0.888	0.780	0.451
	Absence	19	0.921	0.787	
<b>African</b>	Presence	11	0.070	0.113	0.897
	Absence	19	0.035	0.170	
<b>Amerindian</b>	Presence	11	0.025	0.107	0.747
	Absence	19	0.023	0.044	

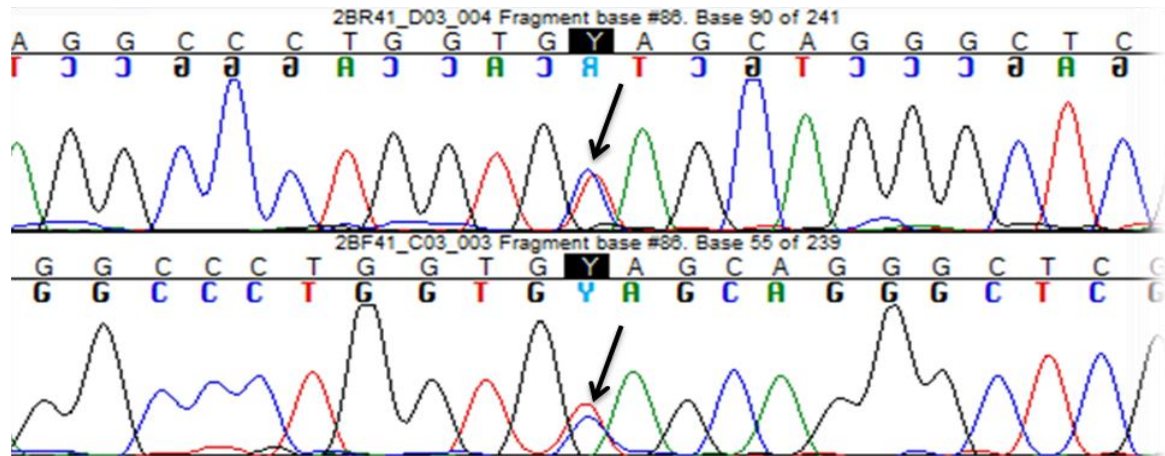
N\*= number of patients. Statistical analysis performed with Mann-Whitney test: *p* value<0.05 was statistically significant.



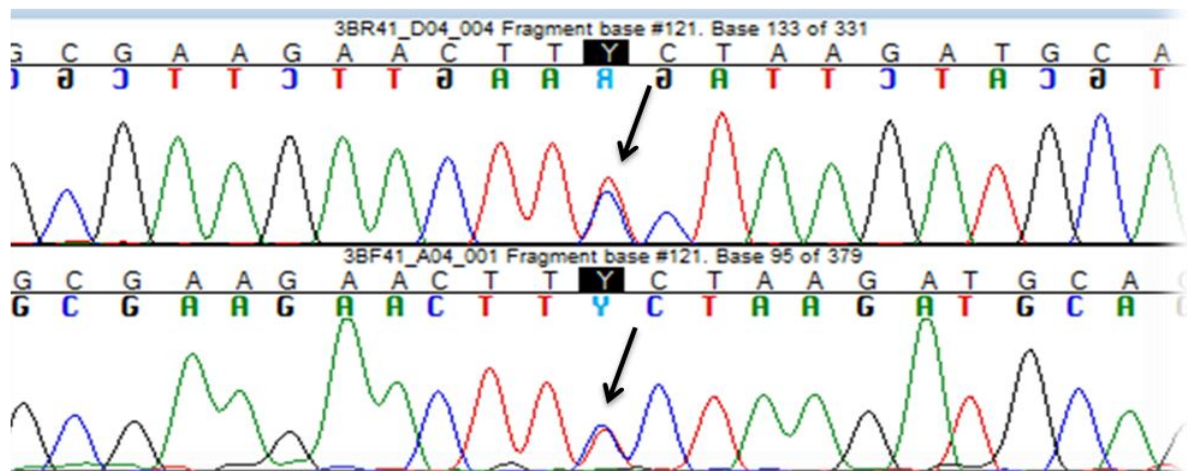
**Table 6. Association between genomic ancestry and disease prognosis in 30 primary congenital glaucoma patients**

<b>Indel proportion</b>	<b>IOP controlled with</b>	<b>N*</b>	<b>Median</b>	<b>Mean</b>	<b>P value</b>
Amerindian	one surgery (per eye if billateral)	16	0.023	0.048	0.868
	more than one surgery	14	0.024	0.089	
African	one surgery (per eye if billateral)	16	0.033	0.089	<b>0.036</b>
	more than one surgery	14	0.119	0.218	
European	one surgery (per eye if billateral)	16	0.938	0.863	0.134
	more than one surgery	14	0.845	0.694	

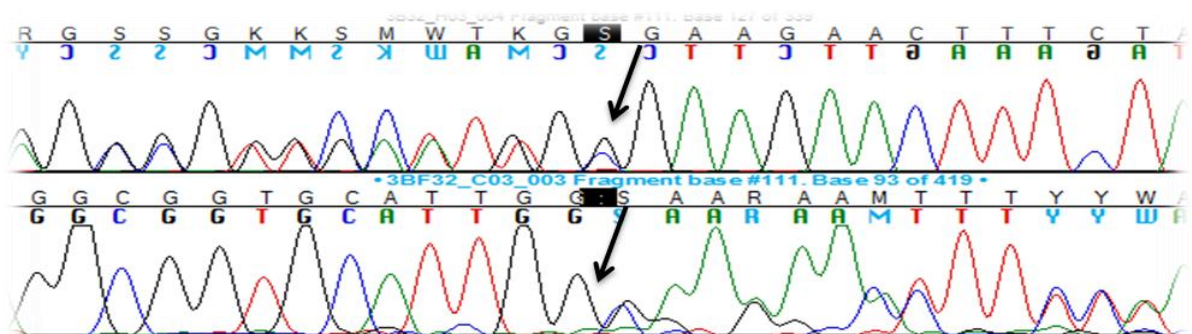
N\*= number of patients. Statistical analysis performed with Mann-Whitney test:  $p$  value<0.05 was statistically significant.



**Figure 1.a**



**Figure 1.b**





**Figure 1.c**

**Figure 1.** Sequencing results of novel mutations: two of them in compound heterozygous (1.a e 1.b) and one in heterozygous status (1.c). The different colors of the curves indicate the individual nucleotide (blue for cytosine, red for thymine, black for guanine, and green for adenosine). The chromatogram is read from left to right according to the 5' to 3' direction of the sequencing reaction: **1.a** p.Gln109→Stop; **1.b** p.Ser476→Pro. **1.c** fs.1416delC.



## ANEXO D

	<b>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS</b> PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA	
---	---	---

## ATA DA DEFESA DE TESE DA ALUNA HÉVILA TAMAR ROLIM LIMA

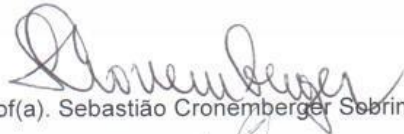
Realizou-se, no dia 22 de novembro de 2013, às 14:00 horas, 526, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese, intitulada *AVALIAÇÃO DO GENE CYP1B1 E DA ANCESTRALIDADE GENÔMICA NO GLAUCOMA CONGÊNITO PRIMÁRIO*, apresentada por HÉVILA TAMAR ROLIM LIMA, número de registro 2011657320, graduada no curso de MEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Sebastião Cronemberger Sobrinho - Orientador (UFMG), Prof(a). Luiz Armando Cunha de Marco Coorientador (UFMG), Prof(a). Homero Gusmão de Almeida (UFMG), Prof(a). Galton Carvalho Vasconcelos – UFMG, Prof(a). Roberto Pedrosa Galvão Filho (IOR - Instituto de Olhos do Recife), Prof(a). Adroaldo De Alencar Costa Filho

A Comissão considerou a tese:

Aprovada

Reprovada

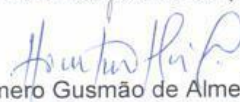
Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.  
Belo Horizonte, 22 de novembro de 2013.



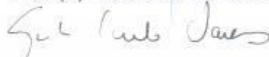
Prof(a). Sebastião Cronemberger Sobrinho (Doutor)



Prof(a). Luiz Armando de Marco (Doutor)



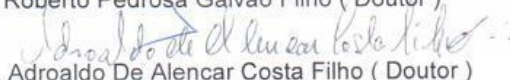
Prof(a). Homero Gusmão de Almeida (Doutor)



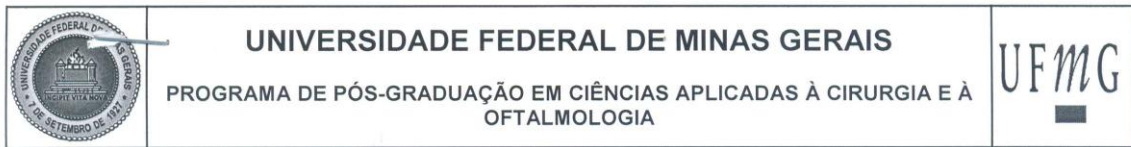
Prof(a). Galton Carvalho Vasconcelos (Doutor)



Prof(a). Roberto Pedrosa Galvão Filho (Doutor)



Prof(a). Adroaldo De Alencar Costa Filho (Doutor)



## FOLHA DE APROVAÇÃO

### AVALIAÇÃO DO GENE CYP1B1 E DA ANCESTRALIDADE GENÔMICA NO GLAUCOMA CONGÊNITO PRIMÁRIO

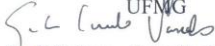
#### HÉVILA TAMAR ROLIM LIMA


Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA, área de concentração RESPOSTA INFLAMATÓRIA À AGRESSÃO

Aprovada em 21 de novembro de 2013, pela banca constituída pelos membros:

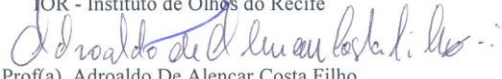
  
 Prof(a). Sebastião Cronemberger Sobrinho - Orientador  
 UFMG

  
 Prof(a). Luiz Armando Cunha de Marco

  
 UFMG  
 Prof. Galton Carvalho Vascelos

  
 Prof(a). Homero Gusmão de Almeida  
 UFMG

  
 Prof(a). Roberto Pedrosa Galvão Filho

IOR - Instituto de Olhos do Recife  
  
 Prof(a). Adroaldo De Alencar Costa Filho

UFRJ

Belo Horizonte, 21 de novembro de 2013.