



## **ANÁLISE DO POLIMORFISMO DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE M1 E EM PACIENTES PORTADORES DE GLAUCOMA PRIMÁRIO DE ÂNGULO ABERTO**

Constanza Thaise Xavier Silva

Natalie Borges Costa

Kleber Santiago Freitas Silva

Rodrigo Egídio Silva

Katia Karina Verolli Oliveira Moura

**Palavras-Chave:** Glaucoma; Glutationa S-transferase; GSTM1; GSTT1; Polimorfismo.

### **Introdução**

O Glaucoma designa um grupo de doenças oculares que evoluem progressivamente sendo caracterizadas por danos típicos no nervo óptico com consequentes alterações de visão. O tipo mais frequente é o glaucoma primário de ângulo aberto (GPAA) que corresponde aproximadamente 60% dos casos. O epitélio ocular expressa genes que codificam as enzimas Glutationa S-Transferase (GST). A GST está presente em várias estruturas oculares, incluindo humor aquoso, corpo ciliar e cristalino. Este estudo teve como objetivo avaliar o perfil genotípico dos polimorfismos dos genes GSTM1 e GSTT1 em pacientes portadores de Glaucoma Primário de Ângulo Aberto e grupo controle na cidade de Goiânia.

### **Desenvolvimento**

Foram coletadas amostras de sangue periférico (10mL) de 100 pacientes comprovadamente diagnosticados como portadores de Glaucoma Primário de Ângulo Aberto (GPAA) e o grupo controle com exames oftalmológicos dentro dos padrões considerados normais que corresponderam a 53 amostras. A coleta de sangue foi realizada na Pronto Clínica de Olhos em Goiânia e a análise genética molecular foi realizada no Núcleo de Pesquisas Replicon-PUC-Goiás. Todos os pacientes responderam a um questionário com dados relativos a nome, etnia, hábito de fumar e o hábito de ingerir bebida alcoólica. O Termo de Consentimento Livre Esclarecido foi assinado aceitando participar da pesquisa. O projeto foi aprovado pela Comissão Nacional de Ética em



Pesquisa/Sistema Nacional de Informações Sobre Ética em Pesquisas envolvendo Seres Humanos CEP/PUC GOIAS (FR160294).

A extração de DNA genômico das amostras de sangue periférico foi realizada conforme as instruções do Kit comercial Illustra Blood Genomic Prep Mini Spin® (GE Healthcare, USA). A integridade do DNA foi certificada por eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo (0,5mg/mL) e visualizado no Sistema de Vídeo Documentação VDS (Amersham Biosciences, Biotech, USA).

Após a extração do DNA as amostras foram submetidas à amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês, Polymerase Chain Reaction – PCR) alelo-específica para detectar o polimorfismo dos genes GSTM1 e GSTT1. Três reações foram realizadas por paciente: a) utilizando o primer para o gene GSTM1 e GSTT1 segundo Abdel-Rahma et al., (1996); c) utilizando o primer para o gene ZFX/ZFY (Arruda et al., 2008), como controle interno para presença de DNA humano evitando os falsos negativos, sendo todos feitos em duplicatas. Foi utilizado o software estatístico BioEstat® (versão 5.0, Ayres et al., 2007; Sociedade Civil Mimirauá/MCT – CNPq). A comparação da distribuição das idades entre os grupos de pacientes com glaucoma e pacientes controle foram realizados usando o teste de Mann Whitney. Neste estudo caso X controle foram avaliadas as frequências das variáveis: sexo, etnia, tabagismo e o etilismo usando o teste qui-quadrado ( $\chi^2$ ). Para análise do genótipo de risco foi avaliado também o teste de Odds Ratio com intervalo de confiança de 95% ( $\alpha=0,05$ ).

No grupo caso observou-se que o genótipo GSTM1 presente foi de 40% (n=40) e nos controles foi de 71,6% (n=38). O genótipo nulo foi 60% (n=60) e 28,3% (n=15), respectivamente. O genótipo GSTT1 presente no grupo caso foi de 52% (n=52) e no grupo controle foi de 66% (n=35); já o genótipo nulo foi de 48% (n=48) no grupo caso e 34% (n=18) no grupo controle. O genótipo GSTM1 nulo no grupo caso foi mais frequente do que no grupo controle, sendo esta diferença estatisticamente significativa ( $p=0,0004$ ). O mesmo não foi encontrado com o genótipo GSTT1 ( $p=0,13$ ). Foi verificado também a associação dos genótipos GSTM1 nulo/GSTT1 presente ao risco de glaucoma para 3,1 vezes mais a chance de ocorrência da doença, sugerindo que indivíduos que apresentam os genótipos GSTM1 nulo/GSTT1 presente pode ser considerado como um dos fatores de risco para o desenvolvimento do GPAA. Já para os genótipos GSTM1/GSTT1 nulos foi verificado o risco de 6,7 vezes mais a chance de ocorrência da doença ( $p=0,0004$ ; OR: 6,7; IC 95%: 2,7 – 20,3), sugerindo que indivíduos que apresentam os genótipos



GSTM1/GSTT1 nulos pode ser considerado como um dos fatores de risco para o desenvolvimento do GPAA.

## Considerações Finais

O glaucoma primário de ângulo aberto é um grande problema de saúde pública, preocupando médicos, autoridades e pacientes na busca por caminhos para combater a cegueira que pode causar. O GPAA é assintomático e quase nunca é objeto de campanhas preventivas. É diagnosticado na maioria das vezes por acaso em consultas oftalmológicas marcadas para verificação de alguma outra disfunção ocular

A incidência do GPAA está aumentando conforme o 3º Consenso Brasileiro de Glaucoma Primário de Ângulo Aberto que ocorreu em 2009. Estimou-se que em 2010 haveria cerca de 60,5 milhões de glaucomatosos em todo o mundo dos quais 4,5 milhões são portadores do glaucoma primário de ângulo aberto (GPAA) e 3,9 milhões são portadores de glaucoma primário de ângulo fechado (GPAF).

O GPAA é mais comum após os 40 anos afetando um em cada 100 indivíduos. Considerando que as idades médias da população brasileira vêm aumentando, supõe-se que esses números sejam ainda mais preocupantes no futuro.

Com o advento das técnicas de biologia molecular e o sequenciamento do genoma humano, estudos de genética em oftalmologia permitiram a identificação de locos e genes associados com o glaucoma. A correlação entre o genótipo/fenótipo permitiu observar manifestações clínicas e respostas terapêuticas distintas dentro das manifestações dos tipos de glaucoma. As alterações genéticas encontradas e o entendimento destas mutações geram o avanço no entendimento das bases genéticas na oftalmologia, o que em particular, auxiliará no diagnóstico precoce, na fisiopatologia da lesão glaucomatosa e mesmo no tratamento por meio de terapia gênica ou convencional, reduzindo o risco de cegueira no futuro. O olho precisa de um eficiente sistema de redução e enzimas de desintoxicação. O epitélio ocular expressa genes que codificam as enzimas glutathione S-transferases (GSTs) e outras envolvidas no ciclo da glutathione, como a glutathione peroxidase. Estudos epidemiológicos sugerem que a suscetibilidade a patologias oculares podem estar correlacionadas ao sistema GSTs.

Uma das contribuições da genética para o glaucoma é compreender melhor os mecanismos por meio dos quais esta doença se desenvolve. Com isso, propõem-se



melhores tratamentos e métodos diagnósticos. Outra contribuição da genética consiste na possibilidade de se realizar um futuro aconselhamento genético, pois, quanto mais se entende a genética do glaucoma, mais se chega a indivíduos com maior ou menor risco. Além disso, a genética permite indicar um acompanhamento personalizado de todos os pacientes com glaucoma.

Gostaríamos de observar aqui, que a análise de outros polimorfismos de enzima é necessária para elucidar ainda mais a fisiopatologia da doença. Talvez no futuro próximo possamos executar diagnósticos com base genética nos estágios iniciais da doença, evitando assim a cegueira associada ao GPAA e atuando com a medicina preventiva.

## Referências

Abdel-Rahman, SZ, El-Zein RA, Anwar NA, et al. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. *Cancer Letters*. 1996; 107(2): 229-233.

Abu-Amero KK, Morales J, Mohamed GH, et al. Glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms in Arab glaucoma patients. *Molecular Vision*. 2008;14:425-430.

Adam MF, Belmouden A, Binisti P, et al. Recurrent mutations in a single exon encoding the evolutionarily conserved olfactomedin-homology domain of TIGR in familial open-angle glaucoma. *Human Molecular Genetics*. 1997; 6(12):2091-2097.

Alexander JP, Samples JR, Acott TS, et al. Expression of matrix metalloproteinases and inhibitor by human trabecular meshwork. *Investigative Ophthalmology e Visual Science*. 1991;32(1):172-180.

Alward WL, Johnson AT, Nishimura DY, et al. Molecular genetics of glaucoma: current status. *Journal of Glaucoma*. 1996; 5(4):276-284.

Ayres M, Júnior M, Santos A, et al. *BioEstat-Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Bio-Médicas*. 2007. 5ª Edição. Belém-Pará-Brasil.

Bailey LR, Roodi N, Verrier CS, et al. Breast cancer and CYP1A1, GSTM1, and GSTT1 polymorphisms: evidence of a lack of association in Caucasians and African Americans. *Cancer Research*. 1998;58:65-70.

Bathija R, Gupta N, Zangwill L, et al. Changing definition of glaucoma. *Journal of Glaucoma*. 1998;7:165-177.

Betinjane AJ, Paranhos JA, Omi CA, et al. Conceito, fatores de risco e diagnóstico. In: Mello PAA, Mandia Júnior C, organizadores. In: *2º Consenso Brasileiro de Glaucoma Primário de Ângulo Aberto*. São Paulo: Sociedade Brasileira de Glaucoma; 2005:4-44.



BioEstat. *Software de bioestatística* versão 5. Disponível em <http://www.mamiraua.org.br/download>. Acesso em 18/09/2011.

Board PG, Baker RT, Chelvanayagam G, et al. Zeta, a novel class of glutathione transferases in a range of species from plants to humans. *Biochemical Journal*. 1997;328(3):929-935.

Boccia S, Cadoni G, Sayed-Tabatabaei FA, Volante M, Arzani D, De Lauretis A, et al. CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, GSTT1, EPHX1 exons 3 and 4, and NAT2 polymorphisms, smoking, consumption of alcohol and fruit and vegetables and risk of head and neck cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2008;134:93-100.

Costa NB. *Análise do polimorfismo CYP1A1M1 em pacientes com Glaucoma Primário de Ângulo Aberto* (Mestrado). Pontifícia Universidade Católica de Goiás – PUC-Goiás, Goiânia – Brasil, 2012.

Craig JE, Baird PN, Healey DL, et al. Evidence for genetic heterogeneity within eight glaucoma families, with the GLC1A Gln368STOP mutation being an important phenotypic modifier. *Ophthalmology*. 2001;108(9):1607-1620.

Da Silva-Júnior RL. *Implicações dos Polimorfismos Genéticos de CYP1A1, GSTM1 e GSTT1 em Carcinoma Espinocelular da Laringe* (Mestrado). Universidade Federal de Goiás - UFG, Goiânia-Brasil, 2008.

De Voogd S, Wolfs RC, Uitterlinden AG, et al. Estrogen receptors alpha and beta and the risk of open-angle glaucoma: the Rotterdam Study. *Archives of Ophthalmology*. 2008;126(1):110-114.

Frare AB. *Investigação dos polimorfismos GSTM1 e GSTT1 em mulheres com endometriose* (Mestrado). Pontifícia Universidade Católica de Goiás – PUC-Goiás, Goiânia-Brasil, 2011.

Funke S, Timofeeva M, Risch A, et al., Genetic polymorphisms in GST genes and survival of colorectal cancer patients treated with chemotherapy. *Pharmacogenomics*. 2010;11(1):33-41.

Ghanem CC. Levantamento de casos de Glaucoma em Joinville - Santa Catarina, 1984. *Arquivo Brasileiro de Oftalmologia*. 1989;52(2):40-43.

Lopez-Martinez F, Lopez-Garrido MP, Campos-Mollo E, et al. Role of MYOC and OPTN sequence variations in Spanish patients with primary open-angle glaucoma. *Molecular Vision*. 2007;13:862-872.

Losi-Guembarovski R, Grégio D'Arce LP e Syllós IMC. Glutathione S-transferase Mu (GSTM1) null genotype in relation to gender, age and smoking status in a healthy Brazilian population. *Genetics and Molecular Biology*. 2002;25(4):357-360.

Mackay EO, Kallberg ME e Gelatt KN. Aqueous humor myocilin protein levels in normal, genetic carriers, and glaucoma beagles. *Veterinary Ophthalmology*. 2008;11(3):177-185.



- Mannervik B e Danielson UH. Glutathione transferases-structure and catalytic activity. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 1988;23(3):283-337.
- Mello PAA e Junior CM. In: 2º Consenso Brasileiro de Glaucoma Primário de Ângulo Aberto. *Sociedade Brasileira de Glaucoma*, São Paulo, 2005:40-44.
- Millikan R, Duell EJ, Tse C, et al. Dichlorodiphenyldichloroethene, polychlorinated biphenyls, and breast cancer among African-American and white women in North Carolina. *Cancer Epidemiology Biomarkers e Prevention*. 2000;9(11):1233–1240.
- Tomarev SI e Malyukova I. Gene expression profile of the human trabecular meshwork: NEIBank sequence tag analysis. *Investigative Ophthalmology e Visual Science*. 2003; 44(6):2588-2596.
- Ünal M, Güven M, Devranoglu K, et al. Glutathione transferase M1 and T1 genetic polymorphisms are related to the risk of primary open-angle glaucoma: a study in a Turkish population. *British Journal of Ophthalmology*. 2007; 91(4):527–530.
- Vasconcellos JPC. *Avaliação da frequência e do tipo de mutações no gene TIGR/MYOC em uma população brasileira com GPAA do tipo juvenil* (Doutorado). Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas - Unicamp, Campinas. 2001.
- Werner EB. Normal-tension glaucoma. In: Ritch R, Shields M, Krupin T (editores) *Ed. Mosby*, St Louis, 1996;2:769-797.
- Wiggs JL, Allingham RR, Hossain A, et al. Genome-wide scan for adult onset primary open angle glaucoma. *Human Molecular Genetics*. 2000;9(7):1109-1117.
- Wiggs JL. Genetic etiologies of glaucoma. *Archives of Ophthalmology*. 2007;125(1):30-37.
- Wiggs JL. The Human Genome Project and Eye Disease. *Archives of Ophthalmology*. 2001;119(11):1710-1711.
- Wilkinson J e Clapper ML. Detoxification enzymes and chemoprevention. *Experimental Biology and Medicine*. 1997;216:192-200.
- Wirtz, MK e Samples JR. The genetic loci of open-angle glaucoma. *Ophthalmology Clinics of North America*. 2003; 16(4):505-514.
- Xu S, Wang Y, Roe B, et al. Characterization of the human class Mu glutathione S-transferase gene cluster and the GSTM1 deletion. *Journal Biological Chemistry*. 1998; 273(6):3517-3527.
- Yang J, Tezel G, Patil RV, et al. Serum autoantibody against glutathione S-transferase in patients with glaucoma. *Investigative Ophthalmology Visual Science*. 2001;42(6):1273–1276.
- Yao HY, Cheng CY, Fan BJ, et al. Polymorphism of myocilin and optineurin in primary open angle glaucoma patients. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2006;86(8):554-559.

Yildirim O, Ates NA, Tamer L, et al. May glutathione S-Transferase M1 positive genotype afford protection against primary open-angle glaucoma? *Graefe's Archive Clinical and Experimental Ophthalmology*. 2005;243(4):327-333.