



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

ARTUR LINS TENÓRIO

**ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO DO GENE *TXNRD2* (rs35934224) E
GLAUCOMA PRIMÁRIO DE ÂNGULO ABERTO**

RECIFE

2019

ARTUR LINS TENÓRIO

**ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO DO GENE *TXNRD2* (rs35934224) E
GLAUCOMA PRIMÁRIO DE ÂNGULO ABERTO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Colegiado do curso de Pós-Graduação em Cirurgia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de mestre em cirurgia.
Área de concentração: cirurgia clínica e experimental.

Orientador:
Dr. Rodrigo Pessoa Cavalcanti Lira
Coordenador do Curso de Pós-Graduação,
CCS-UFPE

RECIFE

2019

Catálogo na fonte:
Bibliotecária: Elaine Freitas, CRB4-1790

T312a	Tenório, Artur Lins Associação entre o polimorfismo do gene TXNRD2 (rs35934224) e glaucoma primário de ângulo aberto / Artur Lins Tenório. - 2019. 68 p. Orientador: Rodrigo Pessoa Cavalcanti Lira. Dissertação (Cirurgia) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Médicas. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia. Recife, 2019. Inclui referências, apêndices e anexos. 1. Glaucoma. 2. TXNRD2. 3. GPAA. 4. Estudo de associação genômica ampla. 5. Glaucoma de ângulo aberto. I. Lira, Rodrigo Pessoa Cavalcanti (Orientador). II. Título. 610 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2023-008)
-------	---

ARTUR LINS TENÓRIO

**ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO DO GENE *TXNRD2* (RS35934224) E
GLAUCOMA PRIMÁRIO DE ÂNGULO ABERTO**

Dissertação de mestrado apresentada ao
Colegiado do curso de Pós-Graduação em
Cirurgia do Centro de Ciências da Saúde da
Universidade Federal de Pernambuco, para
obtenção do título de mestre em cirurgia.
Área de concentração: cirurgia clínica e
experimental.
Aprovada em: 15/02/2019

Banca Examinadora

Prof. Dr. Rodrigo Pessoa Cavalcanti Lira

Instituição: HC/UFPE

Assinatura: _____

Prof. Dr. Fernando Ribeiro de Moraes Neto

Instituição: CCS/UFPE

Assinatura: _____

Prof^a. Dr^a. Patrícia Muniz Mendes Freire de Moura

Instituição: ICB/UPE

Assinatura: _____

RECIFE
2019

Dedico este trabalho

Primeiramente a Deus, por me dar saúde e forças para superar todos os obstáculos.

A minha esposa, Marina, pelo apoio incondicional e pelo incentivo constante.

A meus pais, Valéria e Antônio, pelo amor e pelos esforços que fizeram para me dar a melhor educação possível.

A meus irmãos, Bartira e André, pelo companheirismo e apoio em todas as horas.

A Rosimary Battaglia, pelo carinho e por todas as orientações.

AGRADECIMENTOS

Aos pacientes que participaram do projeto.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Rodrigo Pessoa Cavalcanti Lira**, por acreditar no projeto e pela atenção nos detalhes do trabalho.

Ao meu co-orientador **Prof. Dr. Luydson Richardson Vasconcelos e Rodrigo Feliciano do Carmo** por me acompanharem desde a graduação e pelo entusiasmo com as pesquisas científicas.

Ao meus co-orientadores **Prof. Dr. Roberto Galvão Filho e Dr. Pedro Teixeira Falcão Neto** pelo apoio institucional e incentivo para a realização do projeto.

Ao **Prof. Dr. Luiz Eduardo Correia Miranda**, por mostrar o quão fascinante são as pesquisas científicas.

Ao Instituto de Olhos de Pernambuco IOR – Ação Visual, minha escola da Oftalmologia, pelas oportunidades oferecidas e pelo estímulo ao desenvolvimento de ciência.

RESUMO

Recentes avanços em tecnologias genômicas e estudos de associação genômica ampla (GWAS) aceleraram a descoberta e compreensão de genes e regiões genômicas associadas ao glaucoma primário de ângulo aberto (GPAA) e influenciaram as características endofenotípicas quantitativas relacionadas à patogênese do GPAA. Estudar a associação do polimorfismo rs35934224 do gene *TXNRD2* com GPAA. Foi realizado um estudo transversal para confirmar a associação entre a SNP (Single Nucleotide Polymorphism) rs35934224 (*TXNRD2*) e o GPAA em uma população brasileira. Foram incluídos 184 indivíduos, sendo 94 casos com GPAA (45 homens e 49 mulheres) e 94 controles (40 homens e 54 mulheres) do Instituto do Olho do Recife. A idade média foi de 68,85 anos para os casos e 68,55 anos para os controles. O DNA genômico foi isolado usando kits comercialmente disponíveis e a detecção da SNP foi realizada por PCR em tempo real usando sondas TaqMan. A população estudada estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Indivíduos do grupo glaucoma apresentaram maior frequência do genótipo CC quando comparados ao grupo controle (72,3% vs. 59,5%; $p = 0,032$). Caso contrário, o genótipo CT foi associado à proteção ao GPAA (24,4% vs. 38,2%; $p = 0,022$). Nossos dados confirmam a associação entre o polimorfismo do gene *TXNRD2* (rs35934224) com o GPAA em uma população brasileira. Este é o primeiro estudo a associar essa SNP ao glaucoma em latino-americanos e corrobora com o uso dessa SNP em futuros testes baseados em genes para identificar indivíduos em risco de desenvolver GPAA.

Palavras-Chave: glaucoma; *TXNRD2*; GPAA.

ABSTRACT

Introduction: Recent advances in genomic technologies and genome-wide association studies (GWAS) have greatly accelerated the discovery and understanding of genes and genomic regions associated with primary open angle glaucoma (POAG) and influencing the quantitative endophenotype traits related to POAG pathogenesis. **Objective:** To study the association of the rs35934224 polymorphism of the *TXNRD2* gene with POAG. **Methods:** We performed a cross-sectional study to confirm the association between the SNP (Single Nucleotide Polymorphism) rs35934224 (*TXNRD2*) and POAG in a population from Brazil. A total of 184 individuals were enrolled, being 94 cases with POAG (45 males and 49 females) and 94 controls (40 males and 54 females) from the Recife Eye Institute. **Results:** Mean age was 68,85 years for cases and 68,55 years for controls. Genomic DNA was isolated using commercially available kits and detection of the SNPs was done by Real Time PCR using TaqMan probes. The studied population was in Hardy–Weinberg equilibrium. Individuals from glaucoma group presented a higher frequency of the CC genotype when compared to the control group (72.3% vs. 59.5%; $p=0.032$). Otherwise, the CT genotype was associated with protection to POAG (24.4% vs. 38.2%; $p=0.022$). **Conclusion:** To sum up, our data confirm the association between *TXNRD2* gene polymorphism (rs35934224) with POAG in an admixed Brazilian population. This is the first study to associate this SNP with glaucoma in Latin-Americans and support the potential use of this SNP in the future for gene-based tests for identifying individuals at risk for developing POAG.

Keywords: glaucoma; *TXNRD2*; POAG.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Prevalência global de GPAA, para indivíduos com idade ≥ 40 anos. Os dados de prevalência da população (%) em 2015 por região, codificados por cores. 16
- Figura 2** - Mecanismos de lesão das células ganglionares da retina e associado ao glaucoma. 19
- Figura 3** - Algoritmo de Tratamento do GPAA Recém Diagnosticado. 25
- Figura 4** - Imagens representativas de imunofluorescência usando um anticorpo para TXNRD2 mostram a presença de TXNRD2 (verde) em células na camada de células ganglionares (setas; painéis superiores), bem como manchas puntiformes substanciais na camada plexiforme interna. 28
- Figura 5** - A expressão de TXNRD2 em tecidos oculares humanos por RT-PCR. 28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resumo do resutado do " <i>Central Córnea Thicknes as a Risk for Progression of Glaucoma</i> "	21
Tabela 2 - Variáveis indepedentes	30
Tabela 3 - Protocolo da reação do experimento.	32
Tabela 4 - Distribuição da população quanto a idade e gênero.	34
Tabela 5 - Dados demograficos e médicos do grupo glaucoma.	35
Tabela 6 - Frequência dos alelos e genótipos do <i>TXNRD2</i>	36
Tabela 7 - Genes associados a risco para GPAA	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGIS	Advanced Glaucoma Intervention Study
ALT	Argone Laser Trabeculoplasty
CFNR	Camada de Fibras Nervosa da Retina
CIGTS	The Collaborative Initial Glaucoma Treatment Study
CGR	Células Ganglionares da Retina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EEC	Espessura Central da Córnea
ELA	Esclerose Lateral Amniotrófica
EMGT	The Early Manifest Glaucoma Trial
GPAA	Glaucoma Primária de Ângulo Aberto
GPAF	Glaucoma Primário de Ângulo Fechado
GPC	Glaucoma Primário Congênito
GPN	Glaucoma de pressão Normal
GWAS	Genome-wide association study
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Nervo Óptico
OCT	Tomografia de Coerência Ótica
OHTS	Ocular Hypertension Treatment Study
PIO	Pressão intraocular
ROS	Reactive Oxygen Species
RT-PCR	Real Time Polymerase Chain Reaction
SLT	Seletive Laser Trabeculoplasty
SNP	Single Nucleotide Polimorphism
TEK	Tirosine Endotelial Kinase
TREC	Trabeculotomia
µm	Micrômetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	APRESENTAÇÃO DO PROBLEMA	13
2	OBJETIVOS	14
2.1	GERAL	14
2.2	ESPECÍFICOS	14
3	REVISÃO DA LITERATURA	15
3.1	GLAUCOMA	15
3.1.1	Introdução	15
3.1.2	Prevalência	16
3.1.3	Fatores de risco	16
3.1.4	Fisiopatologia	17
3.1.5	Screening	20
3.1.6	Diagnóstico	20
3.1.6.1	Espessura central da córnea	20
3.1.6.2	Avaliação do campo visual	22
3.1.6.3	Cabeça do nervo óptico e imagem quantitativa da camada de fibras nervosas da retina	22
3.1.7	Tratamento clínico	23
3.1.7.1	Medicação tópica	24
3.1.7.2	Trabeculoplastia a laser	25
3.1.8	Tratamento cirúrgico	26
3.2	TXNRD2	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1	DESENHO DO ESTUDO	29
4.2	POPULAÇÃO ALVO	29
4.3	GRUPOS DE ESTUDO	29
4.4	DESFECHO E DEFINIÇÃO DO TAMANHO DA AMOSTRA	30
4.5	DEFINIÇÃO E CATEGORIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS	30
4.6	PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS	30
4.7	EXTRAÇÃO DO DNA	31

4.8	DETECÇÃO DAS VARIANTES POLIMÓRFICAS	31
4.9	PROTOCOLO DA REACÇÃO DO EXPERIMENTO	32
5	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	33
6	RESULTADOS	34
7	DISCUSSÃO	37
8	LIMITAÇÕES DO ESTUDO	40
9	CONCLUSÃO	41
	REFERÊNCIAS	42
	APÊNDICE A – QUESTIONÁRIO DA PESQUISA	50
	APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO	51
	ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	53
	ANEXO B – COMPROVAÇÃO DA SUBMISSÃO EM REVISTA	54
	ANEXO C – CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO NA CBO	55
	ANEXO D – CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO NA PARD	56
	ANEXO E – MANUSCRITO SUBMETIDO AO JOURNAL OF GLAUCOMA	57

1 INTRODUÇÃO

1.1. APRESENTAÇÃO DO PROBLEMA

Glaucoma Primário de Ângulo Aberto (GPAA) é uma doença neurodegenerativa de etiologia multifatorial caracterizado pela perda de células ganglionares da retina acarretando em lesão característica no campo visual e afinamento dessa camada retiniana.¹⁻³ Estima-se que cerca de 35 a 58 milhões de pessoas sejam afetadas pelo GPAA em todo o mundo e espera-se que este número aumente entre 53 e 65,5 milhões até 2020, devido ao envelhecimento da população mundial.⁴⁻⁵

Embora existam muitos mecanismos propostos, a fisiopatologia do GPAA e os fatores que contribuem para o agravamento da doença ainda permanecem obscuros.⁶ Avanços recentes em tecnologias genômicas e estudos de associação genômica ampla (GWAS) aceleraram enormemente a descoberta e o entendimento de genes e regiões genômicas associadas ao GPAA e influenciaram os traços endofenotípicos quantitativos relacionados à patogênese do GPAA. No entanto, a maioria dos estudos foi realizada em populações européias e asiáticas. Dados sobre a influência desses genes em outras populações são escassos.

Um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) no gene da tioredoxina redutase 2 (TXNRD2) (rs35934224) foi fortemente associado ao GPAA em um GWAS recente.⁷ O TXNRD2 está localizado no cromossomo 22q11.21 e consiste em 18 exons de tamanho relativamente pequeno, com tamanhos intrônicos entre 200 e 10.000 pb.⁸ O TXNRD2 codifica a tioredoxina redutase 2, uma proteína mitocondrial necessária para reduzir as espécies reativas de oxigênio prejudiciais geradas pela fosforilação oxidativa e outras funções mitocondriais.^{9,1}

Além do GPAA, verificou-se que há associação entre o polimorfismo do *TXNRD2* e retinopatia diabética¹¹, câncer próstata^{12,13}, câncer gástrico¹⁴ e câncer colo retal¹⁵.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Investigar a associação do polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) rs35934224 no gene *TXNRD2* com o GPAA.

2.2 ESPECÍFICOS

Determinar a frequência dos alelos da SNP rs35934224 do *TXNRD2* em pacientes com GPAA;

Determinar a frequência dos alelos da SNP rs35934224 do *TXNRD2* em indivíduos sem GPAA;

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 GLAUCOMA

3.1.1 Introdução

O glaucoma é uma doença que tem registros de longas datas, possivelmente o mais antigo trata-se de uma placa de argila da antiga Mesopotâmia que se refere a crianças com olhos muito grandes, possivelmente casos de glaucoma congênito. Posteriormente, na escola de Alexandria (Século III a.C) o glaucoma já era considerado uma doença incurável, no entanto estava sempre associado a doença do cristalino.¹⁶ Só no do século XVII, Brisseau demonstrou que a catarata e o glaucoma são entidades diferentes, sendo a primeira uma doença do cristalino e a segunda atribuída, erroneamente, ao vítreo. Von Graefe, o fundador da oftalmologia científica, também é considerado a personalidade mais importante na historia do glaucoma, pelas grandes contribuições dadas para esclarecer a doença, por exemplo, foi ele quem estabeleceu a divisão em glaucoma simples, agudo, crônico e secundário. Já no início do século XX Barkan após estudar o ângulo camerular dividiu a patologia em dois grandes grupos: ângulo aberto e de ângulo estreito sendo este suscetível ao fechamento do angulo podendo causar crise glaucomatosa aguda.¹⁷

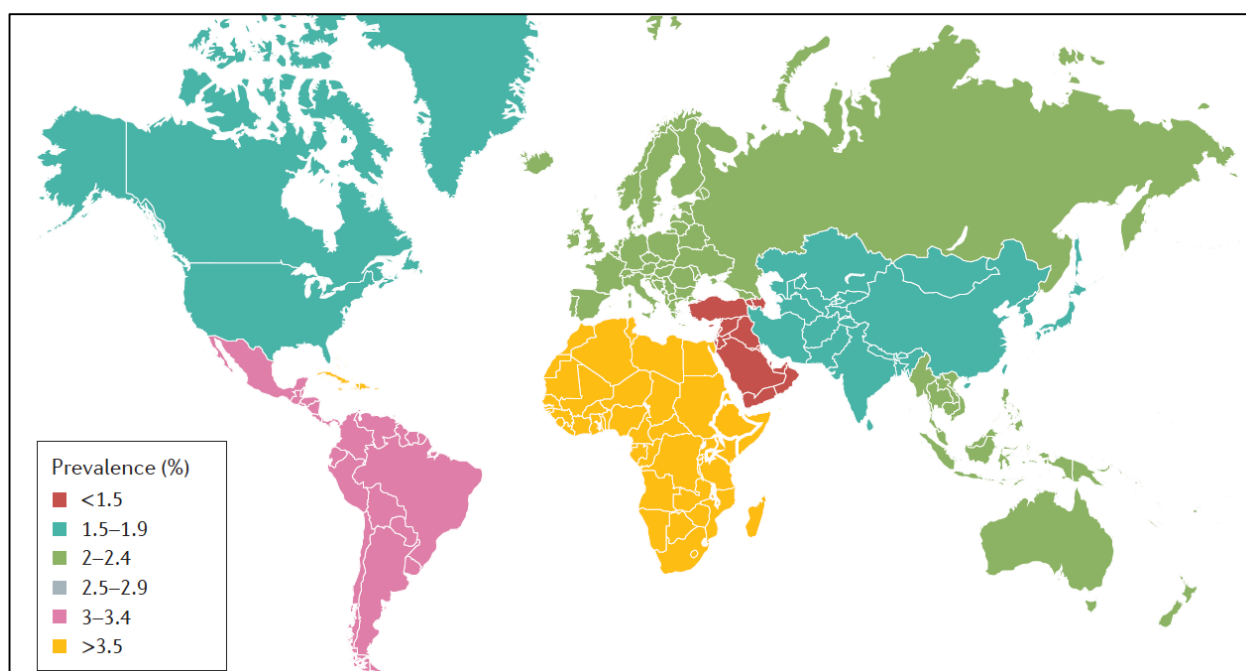
O glaucoma primário de ângulo aberto (GPAA) é uma neuropatia óptica crônica, em que há uma característica degeneração progressiva do nervo óptico com perda de células ganglionares da retina e seus axônios³. Existem diversas classificações do glaucoma, dentre elas a classificação quanto a etiologia: Primário ou Secundário. Existem também classificação quanto a perviedade do escoamento do humor aquoso da câmara anterior: Ângulo Aberto ou Oclusível. Esta condição está associada ao seio camerular da câmara anterior, pela gonioscopia. Além desses tipos também existe o glaucoma primário congênito (GPC). Em 75% dos casos o GPC acomete ambos os olhos e apresenta forte herança genética envolvida. A causa mais comum do GPC descrita é a mutação do gene CYP1B1, envolvido na formação do citocromo p450, no entanto essa mutação explica poucos casos dessa doença em população de etnia heterogênea. Segundo Souma et al¹⁸, a angiopetina 1 e 2, e seu receptor TEK tem papel importante na fisiopatologia do GPC pela importância no desenvolvimento da principal via de drenagem do humor aquoso.

O glaucoma primário de ângulo aberto representa um espectro de doença em adultos, no qual a suscetibilidade do nervo óptico a danos varia entre os pacientes. Embora muitos pacientes com GPAA apresentem pressão intra-ocular elevada (PIO), quase 40% daquelas lesões características do GPAA podem não ter medidas elevadas de PIO¹⁹. A grande maioria dos pacientes com GPAA alterações no disco óptico e no campo visual²⁰, mas há casos raros em que podem ocorrer alterações precoces no campo visual antes que ocorram alterações detectáveis no nervo óptico.

3.1.2 Prevalência

A prevalência do GPAA varia amplamente entre as populações (Figura 1) e etnias.^{4,21,22} Esta também é fortemente correlacionada com a idade. A maior prevalência é entre indivíduos hispânicos ou latinos mais velhos (18%), seguidos por indivíduos negros (15%), brancos (7%) e asiáticos (5%) nos pacientes com até 85 anos de idade. Esta prevalência é ainda maior em aqueles com > 90 anos de idade.^{5,6} Indivíduos negros desenvolvem o GPAA mais cedo do que indivíduos de outras etnias. Além disso, indivíduos negros têm a maior prevalência de GPAA, com mais de 5% dos indivíduos com 60 anos de idade, comparados a 2,7% entre hispânicos ou latinos, aproximadamente 2% entre as populações asiáticas e cerca de 1,5% entre brancos.²²

Figura 1 - Prevalência global de GPAA, para indivíduos com idade ≥ 40 anos. Os dados de prevalência da população (%) em 2015 por região, codificados por cores.⁵



3.1.3 Fatores de Risco

Existem diversos fatores de riscos associados ao GPAA, claramente a idade é um dos principais. Ademais, o sexo masculino é um fator de risco, quando comparado ao feminino com o ajuste da idade.²¹ A PIO é outro importante fator de risco para o glaucoma, sendo o único passível de intervenção na tentativa de modificar a evolução natural da doença. Importantes estudos foram publicados nos últimos anos mostrando a importância da PIO na evolução dessa doença. O OHTS sugere que PIO, assim como a idade, espessura central da córnea e a escavação do disco ótico devem ser avaliados para se identificar os pacientes com maior propensão a desenvolver GPAA.²³ A prevalência do GPAA aumenta drasticamente a com PIO mais alta, mas o glaucoma pode ocorrer em todos os níveis da PIO.²⁴ O papel da PIO na patogênese do glaucoma na população com pressão normal é evidenciado pelas taxas reduzidas de progressão da doença observadas no “Estudo Colaborativo de Glaucoma de Tensão Normal” quando a PIO foi reduzida em 30% por tratamento médico ou cirúrgico.²⁵ Nesse estudo, 12% dos pacientes com glaucoma em PIO normal que foram tratados tiveram piora da doença, enquanto uma proporção significativamente maior de pacientes (35%) que não foram tratados piorou. Sabe-se também que a flutuação diária da PIO é outro fator importante, Stewart et al,²⁶ demonstraram que a baixa flutuação dessa pressão durante o dia está associada a diminuição da perda de campo visual. Posteriormente, esses resultados foram confirmados pelo AGIS²⁷ que sugere que se deve priorizar uma menor variação possível da PIO, principalmente em glaucoma avançados. Fatores sistêmicos de risco para GPAA incluem pressão arterial e diabetes mellitus tipo 2.^{28,29} A hipertensão está associada a um aumento de 16% no risco de GPAA.²⁸ Por outro lado, pressão arterial baixa também pode estar associada ao risco de desenvolver glaucoma, pela redução da pressão de perfusão ocular, ou seja, a pressão pela qual o sangue entra no olho, calculada pela diferença da pressão arterial da PIO.³⁰ Além da pressão de perfusão ocular, a baixa pressão do fluido cerebral, resultando no aumento da pressão da trans-lâmina cribrosa (PIO menos a pressão intracraniana), também pode contribuir para o dano glaucomatoso do nervo óptico.³¹ Uma história familiar confirmada de GPAA é um forte fator de risco, com um aumento de aproximadamente oito vezes no risco entre irmãos.²⁴

3.1.4 Fisiopatologia

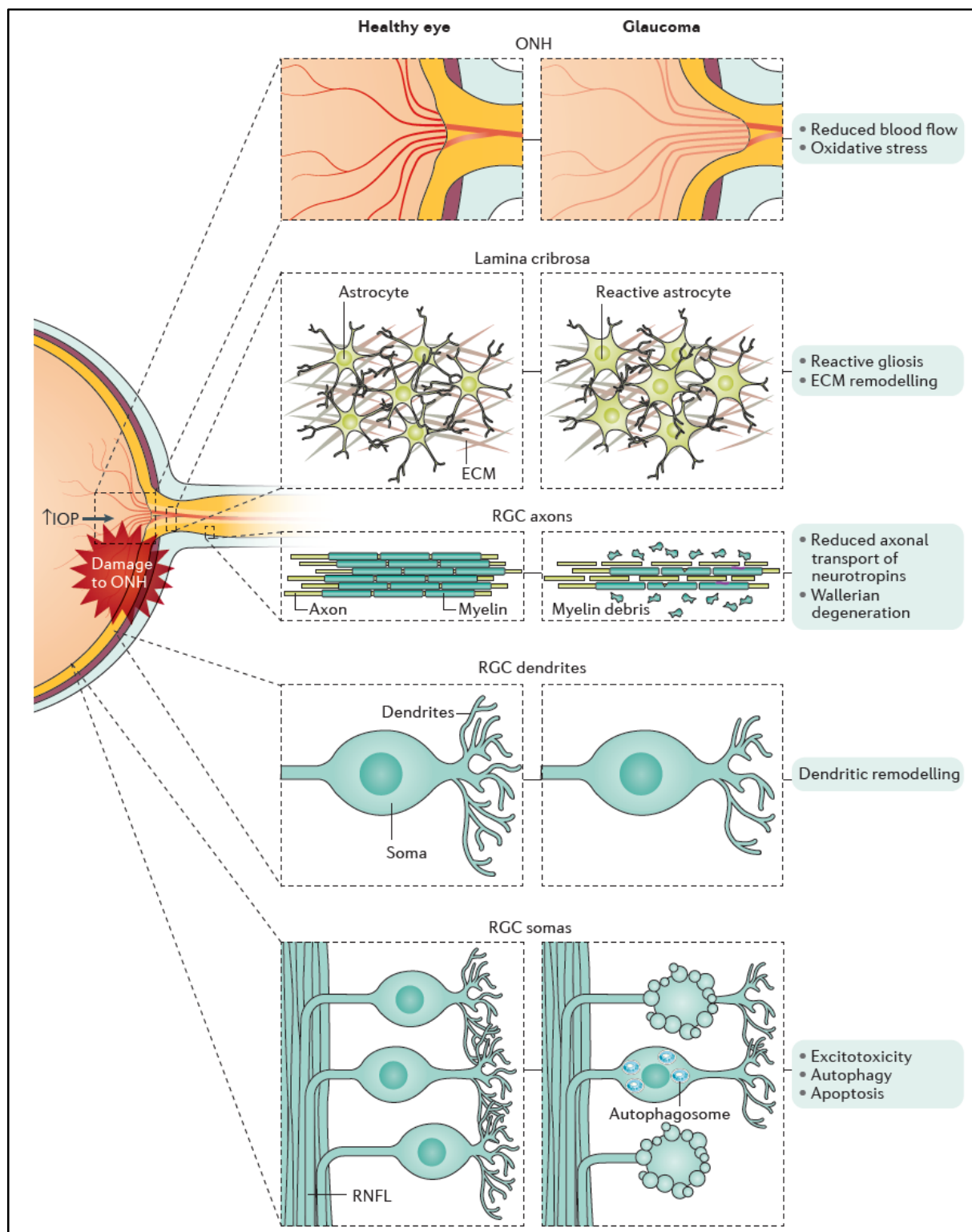
O dano característico a cabeça do nervo ótico é o achado definidor do glaucoma. Embora o glaucoma esteja frequentemente associado ao aumento da PIO, a condição pode ocorrer em qualquer pressão ocular em indivíduos suscetíveis.⁵ Variações na PIO causam estresses e tensões dinâmicas dentro do disco ótico que provavelmente variam em diferentes indivíduos de acordo com a arquitetura e composição de seu tecido conjuntivo.³² Além disso, estudos em primatas e post-mortem em humanos mostra que diferente de outras neuropatias do NO o glaucoma se caracteriza por uma perda de fibras nervosas na região anterior a lamina crivosa.¹⁻³³

A deformação biomecânica no disco ótico pode afetar drasticamente a função das CGRs, incluindo o transporte de fatores neurotróficos (Figura 2). A lesão axonal pode desencadear cascatas de reações que levam a degeneração dos axônios e morte das CGRs. Embora a cabeça do disco ótico seja o local primário da lesão, o aumento da PIO também pode afetar o corpo da CGR. Até pouco tempo esse efeito mecânico da PIO no NO era a única teoria associada ao glaucoma. Com os avanços da biologia molecular, diversas outras teorias foram formuladas mostrando o quão complexo são as vias de lesão no NO em relação ao desenvolvimento do glaucoma primário. Atualmente as principais vias de lesão conhecidas são: estresse oxidativo,³⁴⁻³⁶ desregulação vascular ou isquemia,³⁷ excitotoxicidade,³⁶ inflamação^{38,39}, autofagia, autoimunidade⁴⁰ e gliose reativa,⁴¹ também podem ter um papel no glaucoma, pelo menos em modelos animais, e pode estar envolvido em doenças humanas.⁴²

Certamente a maioria dessas vias estão de alguma maneira interligadas. No entanto, entender melhor cada uma delas pode gerar diagnóstico mais preciso do glaucoma “primário” fazendo com que tratamentos mais específicos possam gerar melhores resultados clínicos. Assim como a doença de Alzheimer, o glaucoma também é uma doença neurodegenerativa, tanto que alguns trabalhos atuais vêm mostrando que há diversas semelhanças na fisiopatologia dessas patologias.⁴³

A excitotoxicidade causada pelo glutamato, já bem descrito na fisiopatologia da doença de Alzheimer é tratado com um antagonista dos receptores tipo NMDA deste neurotransmissor, a memantina. Em pacientes com glaucoma já foi descrito que essa droga tem um efeito positivo em reduzir a morte de células ganglionares da retina em ratos e primatas.⁴⁴⁻⁴⁵ No entanto, em estudos na fase III esse efeito positivo não mostrou diferença quando avaliado a função visual.⁵

Figura 2 - Mecanismos de lesão das células ganglionares da retina e associado ao glaucoma.



Fonte: Weinreb, R.N., et al., *Primary open-angle glaucoma*. Nat Rev Dis Primers, 2016:

3.1.5 Screening

O rastreamento do glaucoma na população em geral não é economicamente viável devido ao alto custo.⁴⁶ Por isso, rastreamento é mais útil e custo-efetivo quando direcionado a populações com alto risco de glaucoma, como idosos, com história familiar de glaucoma, e afro-americanos e hispânicos.^{47,48}

O glaucoma primário de ângulo aberto é uma patologia que idealmente deve ser diagnosticada por rastreamento, pois é frequentemente assintomático até o final do processo, cria morbidade significativa e o tratamento retarda ou previne a progressão da perda de campo visual.¹⁵⁹ A perda de campo visual no glaucoma diminui qualidade de vida relacionada à saúde.⁴⁹ Existem três abordagens principais para o rastreamento de pacientes para GPAA: medir a PIO, avaliar o disco ótico e a CFNR além de avaliar o campo visual, isoladamente ou em combinação. Atualmente não há recomendação de uso de screenings genéticos para a população de risco para glaucoma, apesar de já haver diversos polimorfismo associado a essa patologia.⁵⁰ O avanço no mapeamento dos polimorfismos envolvidos no desenvolvimento do glaucoma poderá facilitar muito tanto o rastreio quanto o tratamento dos pacientes com glaucoma e suspeitos de portar essa doença. Apesar do alto custo atual, sabe-se que com o desenvolvimento de novas tecnologias esses custos tende a cair de maneira muito significativa.

3.1.6 Diagnóstico

A avaliação inicial do glaucoma (história e exame físico) inclui todos os componentes da avaliação abrangente do olho no adulto¹, além de, e com especial atenção, os aspectos que dizem respeito especificamente ao diagnóstico, curso e tratamento do GPAA. O exame pode exigir mais de uma visita para avaliação adicional com o intuito de confirmar o diagnóstico, incluindo medidas adicionais de PIO, gonioscopia, paquimetria, avaliação de campo visual e avaliação com documentação de disco ótico e CFNR.

3.1.6.1 Espessura Central da Córnea

A medida da ECC auxilia na interpretação das leituras de PIO e ajuda a estratificar o risco de dano ocular do paciente.⁵¹⁻⁵³ Nos estudos OHTS e European Glaucoma Prevention Study, a média de ECC no grupo de hipertensão ocular foi de 570 μm , e o risco de desenvolvimento do GPAA foi maior em olhos com espessura da córnea inferior a 555 μm em comparação com olhos com espessura da córnea de 588 μm ou maior. Uma superestimação da PIO real medida pelo tonometro de aplanção pode ocorrer em olhos com córneas mais espessas do que a média, enquanto uma subestimação da PIO real tende a ocorrer nos olhos com córneas que são mais finas que a média. Vários estudos têm procurado quantificar a relação entre o nível de PIO medido e a ECC, mas não há uma fórmula de correção geralmente aceita. Existe controvérsias sobre se a ECC representa um fator de risco para o glaucoma, devido ao seu efeito na medida da PIO ou se a mesma é um fator de risco em si, não relacionado à PIO.⁵⁴

Tabela 1 - Resumo do resultado do "*Central Córnea Thickness as a Risk for Progression of Glaucoma*" (Adaptado de [3])

Estudo	Nº de pacientes	Nível de Evidência	Risco	Comentários
Early Manifest Glaucoma Trial	255	I	+	ECC fina é fator de risco para progressão do glaucoma (em pacientes com PIO basal $\geq 21\text{mmHg}$).
Kim and Chen	88	II	+	ECC fina está associado a progressão no defeito no campo visual.
Chauhan, et al	54	II	-	ECC não está associado a progressão glaucomatosa no disco ótico ou no campo visual.
Jonas, et al	454	II	-	ECC não está associado com progressão da lesão glaucomatosa no campo visual.
Jonas, et al	390	II	-	ECC não está associado com hemorragia no disco ótico.
Congdon, et al	230	II	-	ECC não está associado a progressão glaucomatosa, no entanto há associação da progressão com baixa histerese da córnea.
Stewart, et al	310	III	+/-	ECC está associado com progressão do glaucoma em análise univariável, mas sem associação na multivariável.

ECC: Espessura Central da Córnea

Embora esteja claro que a ECC mais fina é um fator de risco para o desenvolvimento de GPAA quando a PIO é medida com tonometro de aplanção,⁵¹ estudos de progressão tiveram resultados variáveis. Alguns estudos encontraram uma associação com ECC fina (Tabela 1).

3.1.6.2 Avaliação do Campo Visual

O campo visual é avaliado usando perimetria de limiar estático automatizado com estímulos branco sobre branco. É o teste padrão-ouro para do campo visual para glaucoma.⁵⁵ As estratégias de teste podem ser adaptadas ao paciente e grau de perda de campo visual usando programas específicos que avaliam a sensibilidade do limiar central em 24 graus, 30 graus e 10 graus e variando o tamanho do estímulo. Existem diversos modelos para avaliar a o diagnóstico da lesão glaucomatosa pela perimetria visual, modelo mais aceito é conhecido por Critérios de Anderson: 1) Gráfico de probabilidades do *pattern deviation* mostrando três pontos adjacentes não periféricos com $p < 5\%$, sendo que um deles com $p < 1\%$, em localização compatível com defeito glaucomatoso. 2) PSD (*Pattern Standard Deviation*) com $p < 5\%$, 3) GHT (*Global Hemifield Test*) *outside normal limits*. Sendo considerado lesão glaucomatosa quando o exame apresenta alteração em pelo menos 2 critérios.^{1,2}

O cuidadoso teste combinado de cinética e limiar estático manual (por exemplo, campos visuais de Goldmann) é uma alternativa aceitável quando os pacientes não podem realizar a perimetria automatizada de forma confiável ou se ela não estiver disponível. Em pacientes com danos no campo visual que envolvem a fixação, o uso de programas centrais de 10 graus facilita a medição dessa área, que é amostrada em apenas quatro locais, utilizando as estratégias de teste de 24 e 30 graus. Antes de mudar o tratamento do glaucoma, exames de repetição e confirmação do campo visual são recomendados para resultados de testes que não são confiáveis ou mostram um novo defeito glaucomatoso.⁵⁶⁻⁵⁷ É melhor usar a mesma estratégia para confirmar a progressão do campo visual.

3.1.6.3 Cabeça do Nervo Óptico e Imagem Quantitativa da Camada de Fibras Nervosas da Retina

Uma fotografia (estereoscópica ou não) ou um desenho do disco óptico deve ser registrada, mas essa é uma alternativa menos desejável à estereofotografia ou a imagens baseadas em computador.⁵⁸ A imagem quantitativa baseada em computador do disco óptico e da CFNR é rotineiramente usada para fornecer informações quantitativas para complementar o exame clínico do nervo óptico.⁵⁹

Alguns pacientes demonstram alterações estruturais CFNR antes que ocorra a alteração funcional. Uma justificativa para o uso de imagens computadorizadas é distinguir o dano glaucomatoso dos olhos sem glaucoma quando o afinamento da CFNR é medido, facilitando assim o diagnóstico precoce e a detecção de danos ao nervo óptico.⁶⁰ Existem três tipos de dispositivos de imagem disponíveis para o nervo óptico para glaucoma: Tomografia de Coerência Óptica (OCT), oftalmoscopia confocal de varredura a laser, e polarimetria de varredura a laser. As versões desses dispositivos que foram estudadas em uma revisão sistemática foram semelhantes em sua capacidade de distinguir glaucoma de controles.⁶¹⁻⁶² À medida que a tecnologia do dispositivo evolui (por exemplo, bancos de dados de referência, domínio OCT de resolução mais alta), espera-se que o desempenho dos dispositivos de diagnóstico por imagem melhore.

3.1.7 Tratamento Clínico

O objetivo do tratamento do GPAA é melhorar a qualidade de vida do paciente através da preservação da visão.¹ Atualmente, isso implica reduzir a PIO para um nível que provavelmente evite mais danos ao nervo óptico.⁶³ A redução da PIO diminui a progressão da doença em todo o glaucoma: pacientes com maior risco de desenvolver glaucoma (OHTS²⁰) a doença precoce (CIGTS⁶⁴) a estágios avançados do glaucoma (AGIS[4]). Além disso, a redução da PIO também demonstrou retardar a progressão em pacientes com hipertensão ocular e em pacientes com GPAA, nos quais a PIO basal estava dentro da normalidade, chamado por alguns autores por glaucoma de pressão normal.²⁵ A decisão de quando e como tratar o glaucoma é frequentemente complexa (Fig. 3) e requer a consideração de uma série de fatores, incluindo o estágio da doença, a taxa de progressão do glaucoma para perda de visão sintomática, o risco de progressão da doença e a expectativa de vida do paciente.

Medicamentos tópicos são convencionalmente considerados como o tratamento de primeira linha para o GPAA, apesar de numerosos estudos mostrarem controle de PIO equivalente ou melhor com terapia a laser inicial [Trabeculoplastia a laser (SLT/ALT)] ou

cirurgia^{65,66}. Apesar do potencial para um excelente controle da PIO, a cirurgia não tem sido amplamente adotada na maioria dos casos como tratamento primário devido aos riscos associados às complicações. Devido ao alto custo dos equipamentos para realizar o SLT / ALT nem todos os serviços dispõem do equipamento, conseqüentemente nem todos os oftalmologistas estão habilitados a utilizar essa tecnologia para reduzir o uso de colírios com segurança, melhorando a qualidade de vida dos pacientes.

3.1.7.1 Medicação Tópica

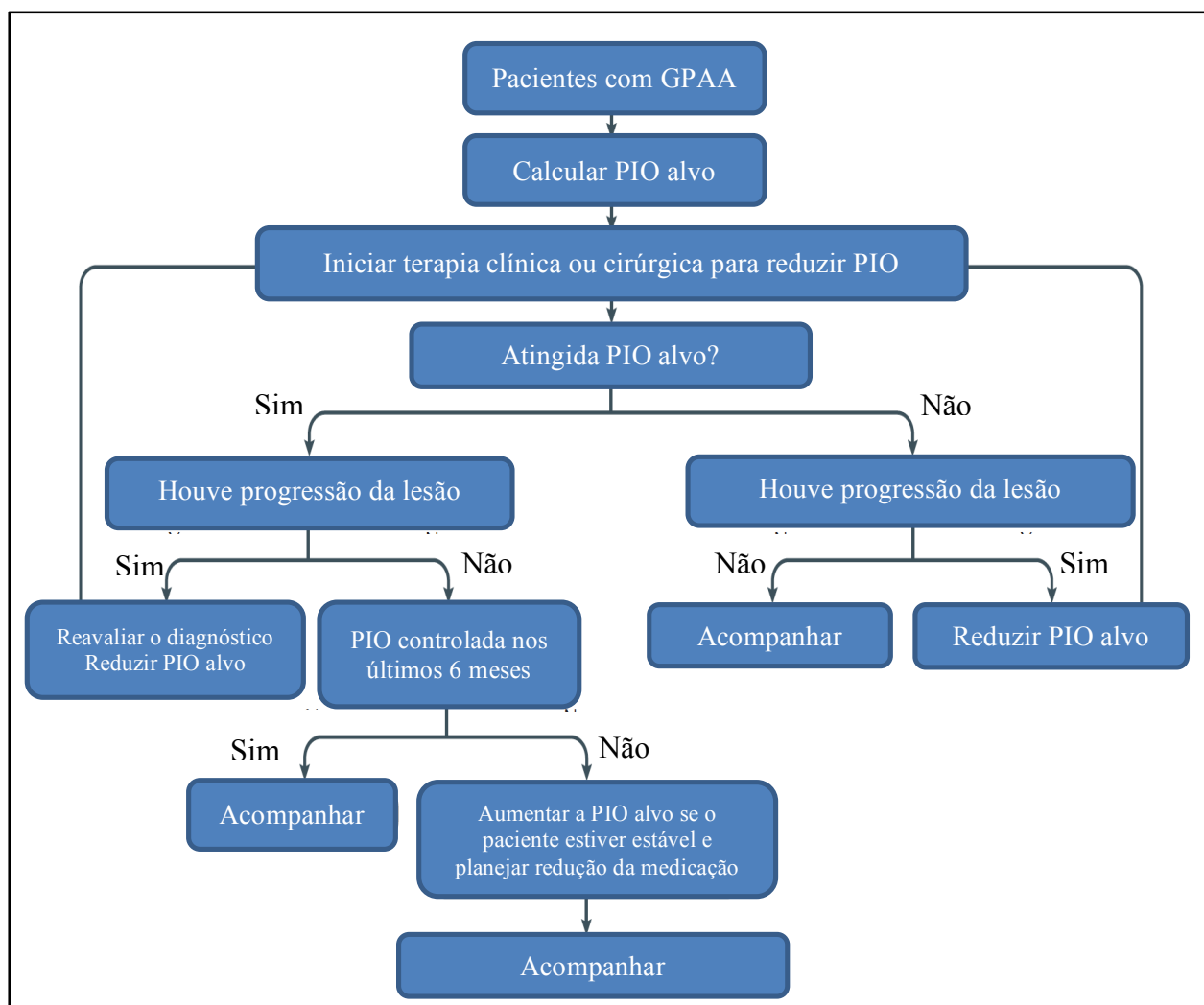
Medicações tópicas aplicadas diretamente na superfície ocular podem reduzir a PIO promovendo a saída do humor aquoso ou reduzindo a produção deste líquido.⁶⁷ A absorção dessas drogas na circulação sistêmica através do ducto nasolacrimal pode ser evitada através do uso de oclusão lacrimal mecânica ou fechamento da pálpebra por pelo menos 1 minuto após a aplicação.

Atualmente os oftalmologistas dispõem de cinco classes de medicações tópicas para o tratamento do GPAA. Os *análogos de prostaglandinas* são geralmente usados como tratamentos de primeira linha para o glaucoma em muitos países. No entanto, por ser a medicação de maior custo, muitas vezes dificulta o acesso dos pacientes a essa classe de medicação. Tem um excelente mecanismo de ação já que facilita o escoamento do aquoso pela via de Bill. Os *agonistas colinérgicos* podem ser usados para o manejo do GPAA, mas requerem administração repetida (até quatro vezes por dia) e podem resultar em efeitos oculares adversos, por exemplo, formação de cistos na íris, diminuição do campo visual pela redução da pupila, dentre outros. Os *β-bloqueadores tópicos* são amplamente usados para baixar a PIO através da redução da secreção aquosa do corpo ciliar. Em muitos serviços é a primeira droga de escolha, no entanto é necessária cautela nos pacientes que já usam β-bloqueadores sistêmico e sendo contraindicados nos pacientes com doenças pulmonares (Asma, DPOC). *Agonistas α-adrenérgicos* também reduzem a secreção aquosa e alguns podem aumentar o fluxo aquoso pela via trabecular. Os *inibidores da anidrase carbônica* reduzem a secreção aquosa. A aplicação tópica é menos eficaz na redução da PIO do que a administração oral, mas está associada a efeitos adversos sistêmicos menos graves do que a forma do comprimido.

O concesso de GPAA da academia americana de oftalmologia¹ apresenta um fluxograma para o tratamento da doença (figura 3). O uso prolongado de terapias tópicas para

uma doença frequentemente assintomática pode resultar em baixa adesão. A educação cuidadosa e o uso de tecnologias como lembretes automatizados têm potencial para melhorar a adesão do paciente a essas terapias.⁶⁸

Figura 3 - Algoritmo de Tratamento do GPAA Recém Diagnosticado.



Fonte: adaptado: *American Academy of Ophthalmology Preferred Practice Patterns Committee*¹

3.1.7.2 Trabeculoplastia a Laser

A trabeculoplastia a laser tem um papel importante no manejo do GPAA. Os tratamentos a laser para a malha trabecular reduzem a PIO pela ativação das células dessa região, o que leva ao remodelamento da matriz extracelular local e aumenta a vazão do humor aquoso. Existem duas opções de laser para realizar esse procedimento, o SLT e o ALT.

Ambos apresentam eficácia semelhante na redução da PIO, mas o SLT induz menos danos mecânicos ao trabéculado e menos efeitos adversos, possibilitando que esse procedimento seja repetido outras vezes, quando necessário.⁶⁹ Segundo Estudo realizado por Reliani, T, o tratamento inicial com SLT em indivíduos com GPAA de origem africana ocidental resultou em redução sustentada da PIO.⁷⁰ Além disso, os dados de uma meta-análise mostraram uma redução na PIO de 6,9 a 35,9% 1 ano após a SLT.⁶⁹

3.1.8. Tratamento Cirúrgico

O trabeculectomia é o procedimento cirúrgico utilizada no tratamento do glaucoma que consite em uma esclerectomia (um pequeno orifício na esclera) coberta por um retalho escleral de espessura parcial por onde o humor aquoso da câmara anterior é drenado diretamente para o espaço subconjuntival.

A trabeculectomia tem sido a cirurgia de glaucoma mais freqüentemente realizada por mais de 40 anos. A aplicação adjuvante intraoperatória ou pós-operatória de mitomicina C ou 5-fluorouracil pode melhorar ainda mais o controle da PIO no pós-operatório, diminuindo a cicatrização e a fibrose dos tecidos subconjuntivais. Alguns estudos sugeriram que a mitomicina C é mais eficaz que o 5-fluorouracil na obtenção do sucesso cirúrgico.⁵⁹ A trabeculectomia pode resultar em controle de longo prazo da PIO, com um estudo observando uma redução estável na PIO em 57% dos pacientes (sem a necessidade de medicação adicional) e 88% dos pacientes (com a necessidade de medicação adicional), 20 anos após o procedimento.⁷¹ Complicações da trabeculectomia incluem efeitos adversos de curto prazo, como infecção, hemorragia supracoroidiana e hipotonia (baixa PIO), e efeitos a longo prazo, como aumento do risco de endoftalmite.

O implante de um dispositivo de drenagem de glaucoma conecta a câmara anterior e o espaço subconjuntival, é outra opção comum para o tratamento do glaucoma e demonstra uma eficiência semelhante da redução da PIO à trabeculectomia.⁷² No mercado estão disponíveis vários modelos de difenretes desenhos e alguns possuem válvulas que evitam a hipotonia severa, que esta associado a maculopatia hipotensiva. Estima-se que a redução adequada da PIO dos dispositivos de drenagem do glaucoma ocorra a uma taxa de aproximadamente 90% ao ano.⁷³

As cirurgias de glaucoma minimamente invasivas (MIGS) vem fornecendo novas alternativas para preencher a lacuna entre o uso de terapias tópicas e a cirurgia para o controle

da PIO. O desenvolvimento do Trabectome (Neomedix, Tustin, Califórnia, EUA), um dispositivo portátil que incorpora pulso eletro-cirúrgico com irrigação simultânea e aspiração para remover cirurgicamente a malha trabecular, pode ser eficaz combinando com cirurgia de catarata.⁷⁴ O stent trabecular (iStent; Glaukos Corporation, Laguna Hills, Califórnia, EUA), que pode ser administrado usando cirurgia minimamente invasiva, recebeu aprovação da FDA norte-americana para o tratamento do GPAA em 2012. Combinado com extração de catarata, implante de stent trabecular pode reduzir a PIO minimamente em comparação com a extração de catarata isolada.⁷⁵

3.2 TXNRD2

O *TXNRD2* gene codifica a tiorredoxina redutase 2.⁷⁶ Essa proteína faz parte do grupo das tiorredoxina. Esse grupo é caracterizado por apresentar dois grupos de sulfeto que possibilita essa proteína a participar dos processos de redução e oxidação das células. No grupo das tiorredoxinas existem as proteínas do tipo 1, que se encontram dissolvido no citosol celular, enquanto as proteínas tipo 2 são proteínas mitocondriais necessária para reduzir os níveis de espécies reativas de oxigênio prejudiciais as mitocôndrias, geradas pela fosforilação oxidativa e outras funções mitocondriais.⁹

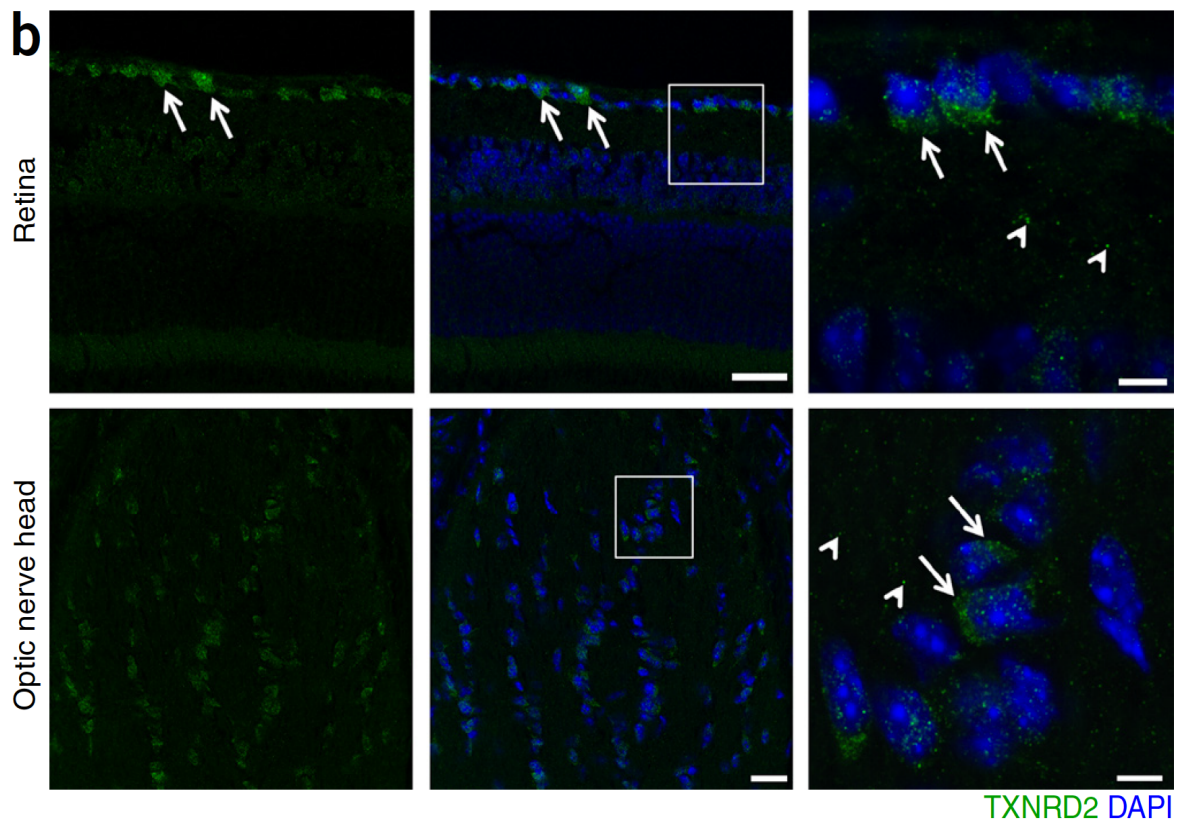
O status redox dos grupos de proteínas sulfidrilas, no qual a tiorredoxina redutase esta incluída, é essencial para as funções das células dos mamíferos.⁷⁷ Proteínas antioxidantes dependentes do radical tiol são componentes chave do sistema de regulação redox. Eles funcionam eliminando espécies reativas de oxigênio (ROS) e controlando as concentrações de intermediários de sinalização reativa. Algumas dessas proteínas antioxidantes, como a tiorredoxina e a glutaredoxina, também reduzem diretamente as proteínas oxidadas e reverterem as mudanças induzidas pelo estresse oxidativo em suas atividades.

O estresse oxidativo celular tem sido apontado como uma causa de disfunção das células ganglionares da retina no glaucoma,⁷⁷ e a superexpressão da tiorredoxina 2, o substrato da tiorredoxina redutase 2 (codificada por *TXNRD2*), aumentou a sobrevivência das células ganglionares da retina em um modelo experimental de glaucoma.⁷⁸

Bailey, et al, confirmaram por RT-PCR que o *TXNRD2* é expresso em tecido ocular humano normal (Figura 4)⁷, incluindo a retina e o nervo óptico. A imunomarcagem em camundongos mostrou forte coloração nas células ganglionares da retina, bem como no nervo óptico (Fig. 5). Estes dados sugerem que a redução dos níveis de espécies reativas de oxigênio

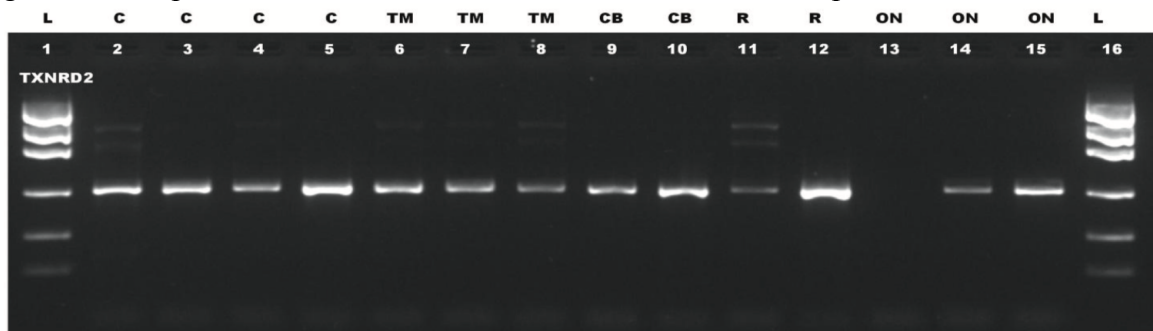
pelo TXNRD2 poderia prevenir a disfunção mitocondrial e a apoptose de células ganglionares da retina no glaucoma. Até o momento, o TXNRD2 é a primeira proteína mitocondrial associada ao risco de glaucoma.

Figura 4 - Imagens representativas de imunofluorescência usando um anticorpo para TXNRD2 mostram a presença de TXNRD2 (verde) em células na camada de células ganglionares (setas; painéis superiores), bem como manchas puntiformes substanciais na camada plexiforme interna.



Fonte: Bailey, J.N.C., et al.⁷

Figura 5 - A expressão de TXNRD2 em tecidos oculares humanos por RT-PCR.⁷



Fonte: Bailey, J.N.C., et al.,⁷

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DESENHO DO ESTUDO:

O estudo será do tipo corte transversal com comparação de dois grupos.

4.2 POPULAÇÃO ALVO:

A população deste estudo será constituída por pacientes acima de 50 anos portadores de Glaucoma Primário de Ângulo Aberto, atendidos na Fundação Ação Visual/IOR. Este serviço é referência para atendimento oftalmológico eletivo no Estado de Pernambuco. Atende em média 400 pacientes por semana, referenciados pela Secretaria de Saúde de Pernambuco.

4.3 GRUPOS DE ESTUDO

A. Grupo 1: (Glaucoma): Pacientes portadores de Glaucoma Primário de Ângulo Aberto

Critérios de inclusão: Pacientes com pelo menos dois campos visuais confiáveis mostrando perda compatível com glaucoma (sem causa secundária), conforme os critérios de Hodapp-Parrish-Anderson ou pelo menos duas tomografias de coerência ótica (OCT-Spectralis®) demonstrando degeneração progressiva do nervo ótico. Todos com relação da escavação/disco ótico $> 0,6$ ou assimetria $> 0,2$ além de exame gonioscópico apresentando ângulo aberto.

Critérios de exclusão: Pacientes portadores de glaucoma secundário.

B. Grupo 2: (Não Glaucoma): Pacientes sem GPAA:

Critérios de inclusão: Pacientes com pressão intraocular < 17 mmHg na avaliação, relação da escavação/disco ótico $< 0,5$.

Critérios de exclusão: Pacientes diagnosticados com GPAA e histórico familiar

positivo para glaucoma ou cegueira.

4.4 DESFECHO E DEFINIÇÃO DO TAMANHO DA AMOSTRA

O principal desfecho foi a frequência do genótipo CC. O desfecho secundário foi a distribuição alélica. Os cálculos do tamanho da amostra com base na taxa de frequência presumida do genótipo CC de 55% no grupo controle e 75% no grupo GPAA indicaram que um tamanho amostral de 89 em cada grupo seria significativo para detectar uma diferença dessa magnitude com um poder de 80% e probabilidade de erro tipo 1 de 5%.

4.5 DEFINIÇÃO E CATEGORIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS

- **Variável dependente:** Neste estudo será considerada como variável dependente a doença do glaucoma sendo definida pelos critérios de inclusão acima descritos.
- **Variáveis independentes:** A tabela 2 resume essas variáveis.

Tabela 2 - Variáveis independentes

Nome da Variável	Definição	Categorização
Idade	Anos completos de vida do paciente	
Sexo	Categorizado como masculino e feminino	1-masculino 2-feminino
Polimorfismos SNPs	Alelo 1, Alelo 2	1-0; 2-1

4.6 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

Os dados foram coletados e organizados em uma planilha no programa Microsoft Excel 2010. Os resultados das variáveis numéricas foram expressos por suas médias e desvios-padrão e os das variáveis categóricas por suas frequências absolutas e relativas. Os dados

foram analisados através do pacote estatístico do programa GraphPad Prism version 6.00 for Mac, GraphPad Software, La Jolla California USA.

Para verificação da diferença das médias tendo as variáveis em análise distribuição normal foi utilizado o teste “t” de Student, para o cálculo das variáveis com distribuição não normal foi utilizado o teste de Mann-Whitney. O coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para avaliação de correlação entre variáveis numéricas. Para variáveis categóricas foi utilizado o teste do X^2 .

A significância estatística foi considerada admitindo-se como índice de confiança 5% em todos os casos ($p < 0,05$) para rejeição da hipótese de nulidade.

4.7 EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA das amostras foi extraído a partir de sangue total (EDTA) com kit QIAamp Mini Spin Columns (Qiagen) seguindo as instruções do fabricante, e após a extração foi identificado e armazenado em refrigerador -20° até o momento da identificação dos polimorfismos.

4.8 DETECÇÃO DAS VARIANTES POLIMÓRFICAS E EQUILÍBRIO GENÉTICO

Foi utilizada a metodologia do PCR em tempo real, através do sistema TAQMAN®, para detecção das mutações SNPs, que consiste de sondas marcadas com fluorocromos desenhadas especificamente para ser complementar aos alelos em estudo. O sistema funciona com um par de sondas específicas para a mutação quando presente ou ausente. As sondas têm em sua estrutura molecular um *Quencher* que inibe o sinal emitido pelo fluorocromo ou repórter, assim que ocorre o pareamento e hidrólise da sonda o composto fluorescente é liberado proporcionando liberação de energia que é captado pela máquina e analisado em um gráfico, dessa forma a detecção da mutação é observada. Este tipo de sonda possui uma tecnologia chamada de MGB (*Minor Groove Binder*) a qual tem a capacidade de se ligar na cavidade menor do DNA aumentando a especificidade e diminuindo o background da reação.

Todas as sondas e primers utilizados nesse estudo foram obtidas através de ensaios previamente validados através da busca no site da lifetechnologies que disponibiliza o banco de dados com os SNPs dos genes que serão utilizados. Para realização desta técnica será utilizado o PCR em tempo real Rotor Gene 6000 (Corbett Research, Austrália), disponível no

Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Pernambuco e no Instituto Aggeu Magalhães – Fio Cruz.

A lei de Hardy-Weinberg constitui um modelo nulo para o estudo da genética populacional. Essa lei formula as relações entre alelos e as frequências dos genótipos em populações que satisfaçam certas condições, entre elas: panmixia (a população panmictica é aquela em que todos os indivíduos são parceiros potenciais. Isso pressupõe que não há restrições de acasalamento, nem genética nem comportamental) e a ausência de selecção, mutação e migração. Sob estas condições, as frequências dos genótipos serão $(p + q)^2 = 1$, (onde $p = A$ e $q = a$). Baseado nessa teoria, uma população é considerada em equilíbrio quando a frequência da distribuição dos alelos da população estudada é semelhante a frequência esperada.⁷⁹ O teste do chi quadrado é utilizado para demonstrar se há diferença entre esses grupos.

4.9 PROTOCOLO DA REACÇÃO DO EXPERIMENTO

Para o experimento foi utilizada programação abaixo já padronizada e validada previamente em outros estudos e em nosso laboratório.

Tabela 3 - Protocolo da reacção do experimento.

Step	Temperatura/Ação	Time
1	50°C	2:00 minutos
2	95°C	10:00 minutos
3	92°C	0:30 segundos
4	60°C	1:00 minuto
5	Step 3	49 vezes
6	4°C	Aguardar

5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS, MÉTODOS DE COLETAS E PROCESSAMENTO DE DADOS

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade de Pernambuco (UPE) sob CAAE 91705218.4.0000.5207. O estudo foi informado aos pacientes atendido, segundo a rotina do serviço, e os mesmos disposto a participar da pesquisa assinará um termo de consentimento livre e esclarecido (maiores de 18 anos) (Apêndice A). Após a assinatura do termo, os dados de cada paciente foram coletados em um questionário previamente elaborado para este estudo (Apêndice B).

O questionário contém dados pessoais como nome do paciente, prontuário, sexo, idade, procedência, fatores de risco, exame físico, medicações em uso, passado cirúrgico e exames complementares (perimetria visual computadorizada e tomografia de coerência ótica Spectralis®). Após a obtenção dos dados de cada paciente, foram coletadas amostras de sangue para o estudo específico da pesquisa. Após a coleta do sangue esses foram processados no laboratório e armazenados em forma no freezer a -80 até a genotipagem. Todos os dados obtidos estão mantidos em sigilo e utilizados exclusivamente para os fins da pesquisa científica.

6 RESULTADOS

Foram genotipados no total 188 pacientes, 94 pacientes do grupo glaucoma e 94 do Grupo Não Glaucoma. A população estudada estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p=0,879$). Os resultados descritos na tabela 4 descrevem a distribuição da população estudada quanto ao gênero e idade, demonstrando que os dois grupos apresentam distribuição semelhante em relação a essas categorias ($p > 0,05$).

Tabela 4 - Distribuição da população quanto a idade e gênero.

		Grupo Glaucoma	Grupo não Glaucoma	<i>P</i>
Total		94	94	
Idade (anos)	Média (DP)	68,85 (15,3)	68,55 (12,4)	0,946
Sexo	Masculino	45 (47.8%)	40 (42.5%)	0,559
	Feminino	49 (52,2%)	54 (57.5%)	

*DP: Desvio Padrão

Os dados demográficos e clínicos dos pacientes do grupo glaucoma estão descritos na tabela 5, de acordo com os genótipos apresentados. Não foi encontrado diferença significante estatística em relação as variáveis avaliadas. A média da PIO avaliada, trata-se da última PIO descrita no prontuário dos pacientes, por isso a média apresenta uma pressão com valores abaixo do limite superior da distribuição na população brasileira. Por se tratar de um serviço de referência, a maioria dos pacientes já chegavam ao serviço medicados, em relação a PIO. Por isso, não foi possível avaliar a pressão intraocular dos pacientes antes do início do tratamento. Foi considerado historia positiva para glaucoma na família apenas parentes de primeiro e segundo grau. Apesar da maior proporção de fumante no grupo CT/TT não houve diferença estatisticamente significante que pudesse causar um viés entre os grupos. Em relação a pressão intraocular, no grupo CC os pacientes apresentaram maior média (18,3mmHg vs. 15,5mmHg), no entanto essa diferença também não foi estatisticamente significante mostrando que não havia diferença importante entre na PIO entre os grupos. Nestes grupos, a distribuição de idade e sexo também foi semelhante.

A Tabela 6 resume as frequências alélicas e genótípicas do TXNRD2 rs35934224 em indivíduos no grupo com GPAA e do grupo não Glaucoma. Indivíduos com GPAA apresentaram maior frequência do genótipo CC quando comparados ao outro grupo (72,3%

vs. 59,5%; $p = 0,032$). Por outro lado, o genótipo CT foi associado à proteção ao GPAA (24,4% vs. 38,2%; $p = 0,022$). Além disso, ao avaliar os genótipos com a presença do alelo T (CT/TT) ao genótipo CC o alelo T demonstra o efeito protetor em relação ao glaucoma (27.7% vs 40.5% $p = 0,032$). Resultando similar do apresentado no GWAS publicado por *Bayle et al.* Apesar da significância quanto a distribuição dos genótipos, a distribuição alélica não foi significativamente associada.

Tabela 5 - Dados demograficos e médicos do grupo glaucoma.

<i>Características</i>	Genótipos <i>TXNRD2</i> gene (rs35934224)		
	CC n= 68 n (%)	CT/TT n=26 n (%)	<i>p</i>
Demográficas			
Idade em anos, média ($\pm$ DP*)	68,8 ($\pm$ 10,4)	70,45 ($\pm$ 10,8)	0,502
Masculino	34 (50%)	11 (42,3%)	0,446
Feminino	34 (50%)	15 (57,7%)	
História Médica			
História Familiar de	30 (44,1%)	9 (34,6%)	0,4860
Glaucoma			
Fumante	5 (7,3%)	4 (15,4%)	0,2365
Diabetes Mellitus II	13 (19,1%)	6 (23,0%)	0,669
Hipertensão Arterial	34 (50%)	16 (61,5%)	0,3159
Sistêmica			
Glaucoma indices, média (DP)			
PIO [†] em mmHg	18,3 ($\pm$ 6,04)	15,5 ($\pm$ 3,01)	0,0988
Escavação do NO [◇]	0.81 ($\pm$ 0.18)	0,84 ($\pm$ 0,14)	0,3681
Nº. de Colírios Anti-	2.12 ($\pm$ 1.21)	1,96 ($\pm$ 1,02)	0,7049
glaucoma			
TREC ^Δ	29 (42,6%)	6 (26%)	0,1746

*DP: Desvio Padrão, [†]PIO: Pressão Intraocular, [◇]NO: Nervo Ótico, ^ΔTREC:

Trabeculectomia

Tabela 6 - Frequência dos alelos e genótipos do *TXNRD2*

	Grupo Glaucoma	Grupo não Glaucoma	Odds Ratio IC 95%	P value
TXNRD2 (rs35934224)	n = 94	n = 94		
Genótipos				
CC	68 (72.3%)	56 (59.5%)	referência	referência
CT	23 (24.4%)	36 (38.2%)	0.52 (0.27-0.98)	0.022
TT	3 (3.3%)	2 (2.3%)	1.23 (0.19-7.65)	0.59
CT/TT	26 (27.7%)	38 (40.5%)	0.56 (0.30 – 1.03)	0.032
Alelos	n = 188	n = 188		
C	159 (84.6%)	148 (78.7%)	0.67 (0.39 – 1.14)	0.07
T	29 (15.4%)	40 (21.3%)		

X² Teste ou Fisher test, unicaldal.

7 DISCUSSÃO

No presente estudo, encontramos uma associação significativa entre um SNP no gene *TXNRD2* (rs35934224) e o GPAA em uma população brasileira. Este SNP foi recentemente descrito como sendo um fator de risco para o GPAA. Este é o primeiro estudo transversal a confirmar a associação deste SNP com o GPAA.

Tabela 7 - Genes associados a risco para GPAA, adaptado de Weinreb et al⁵

Gene	Função da Proteína	Associações	Referência
8q22	Enhancer ativos no corpo ciliar e plexo coroidal	GTN*	Hysi, et al. Nat Gen. 2014
ABCA1	Regulação do efluxo de lipídeos e sinalização da membrana	Aumento da PIO	Hysi, et al. Nat Gen. 2014
AFAP1	Neurodegeneração	ELA [‡]	Bailey, et al. Nat. Genetics. 2016
CAV1	Formação da Membrana Caveolae	Aumento da PIO	Thorleifsson, et al. Nat. Gen. 2010
CDKN2B-A S1	Divisão Celular	GTN*	Burdon, et al. Nat. Gen. 2011
FNDC3B	Metaloproteína	Aumento da PIO	Hysi, et al. Nat Gen. 2014
FOXC1	Desenvolvimento ocular	Glaucoma de início precoce	Wiggs, , et al. Prog. Mol. Bio. Transc. Sci. 2015
GAS7	Divisão Celular	Aumento da PIO	Von Koolwijk, et al. Plos Genet. 2012
SIX6	Desenvolvimento ocular	Espessura da CFN ^Δ	Carnes, et al. PLoS Gen. 2014
GMDS	N-Glycan	-	Gharahkhani, et al. Nat Gen. 2014
PMM2	N-Glycan	-	Gharahkhani, et al. Nat Gen. 2014
TMC01	Canal de Cálcio no Reticulo endoplasmático	-	Burdon, et al. Nat Gen. 2011
TXNRD2	Homeostase oxidativa da mitocôndria	-	Bailey, et al. Nat. Genetics. 2016

*GTN: Glaucoma de tensão normal; [‡]ELA: Esclerose Lateral Amiotrófica; ^ΔCFN: Camada de Fibras nervosas

A tabela 7 descreve os oitos genes já descritos como fator de risco para GPAA e apresenta a função das proteínas relacionadas com cada gene. Conforme a tabela, a única proteína relacionada, até o momento, com GPAA e estresse oxidativo é a tioredoxina redutase 2.

Por se tratar de uma doença com vários fatores associados na sua gênese, muitas vezes um início muito insidioso, muito pobre em sintomas, o momento para o início do tratamento algumas vezes é uma decisão difícil para o médico assistente. Sabe-se que o dano glaucomatoso já está presente bem antes de ser detectado tanto nos exames funcionais quanto nos quantitativos (por exemplo perimetria visual e OCT, respectivamente), por isso a importância de entender as vias de lesão nas células ganglionares da retina para iniciar o tratamento mais específico possível. Uma das vias mais descritas é a excitotoxicidade que semelhante a Doença de Alzheimer, Parkisson e ELA, a hiperestimulação dos receptores de glutamato causam um excesso de influxo de cálcio nas CGR e subsequente formação de radicais livres. Alguns estudos em primatas e ratos mostraram que o uso da memantina, um inibidor dos receptores NMDA do glutamato, diminui a apoptose das CGR⁴⁴, no entanto, estudos na fase III não mostrou benefício em relação a perda da visão em humanos.⁷

O estresse oxidativo e os sistemas antioxidantes são muito importantes no tecido ocular. Diversos estudos demonstraram uma contribuição significativa do estresse oxidativo na patogênese do GPAA⁸⁰⁻⁸⁴. Além disso, uma metanálise recente demonstrou um aumento geral das moléculas de estresse oxidativo no glaucoma, tanto no soro quanto no humor aquoso. Por outro lado, os autores observaram uma diminuição de alguns marcadores antioxidantes, sugerindo que a redução nas espécies reativas de oxigênio (ROS) poderia ser neuroprotetora⁸¹. A mitocôndria tioredoxina redutase (TXNRD2), teve uma importância central para a eliminação mitocondrial de espécies reativas de oxigênio (ROS)⁸⁵, está bem estabelecido que moléculas antioxidantes poderiam estar implicadas na patogênese do glaucoma, pois o estresse oxidativo poderia desempenhar um papel causal nesta doença^{81,86,87}. Além disso, polimorfismos em moléculas associadas a sistemas antioxidantes⁸⁸ foram relatados em pacientes com GPAA^{12,89-92}.

Indivíduos portadores do alelo T (genótipos CT / TT ou CT) em TXNRD2 (rs35934224) tiveram proteção para desenvolver GPAA quando comparados ao grupo controle. Nossos resultados confirmam a associação encontrada no estudo GWAS realizado por Bayle *et al*⁷, onde encontraram uma associação significativa entre o alelo T rs35934224 com proteção ao GPAA, além de demonstrar a expressão de TXNRD2 em células ganglionares da retina e cabeça do nervo óptico no tecido ocular humano normal⁷.

Adicionalmente, o papel do TXNRD2 na patogênese do glaucoma tem sido evidenciado através de um modelo experimental de glaucoma onde a superexpressão da tiorredoxina 2, o substrato da tiorredoxina redutase 2, aumentou a sobrevivência das células ganglionares da retina⁷⁸. Assim, a redução dos níveis de espécies reativas de oxigênio pelo TXNRD2 poderia prevenir o glaucoma, adicionalmente o SNP rs35934224 está localizado em uma região inter-exônica e está em desequilíbrio de ligação com outros SNPs em regiões reguladoras como 3'-UTR e região promotora pode afetar o nível de expressão desta molécula.⁷

Alem disso, este é o primeiro estudo a associar esta SNP ao GPAA em latino-americanos e reforçar o uso potencial deste SNP no futuro para testes baseados em genes para identificação de indivíduos em risco de desenvolvimento de GPAA. No entanto, mais estudos com coortes maiores em diferentes populações são necessários para elucidar o uso potencial de TXNRD2 na prática clínica.

8 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Nosso estudo apresenta algumas limitações, como o pequeno número de indivíduos inscritos e a caracterização funcional do TXNRD2 em relação ao SNP rs35934224.

9 CONCLUSÃO

Os dados da pesquisa sugerem que há associação entre o polimorfismo do gene TXNRD2 (rs35934224) com o GPAA em uma população brasileira, sendo o genótipo CC um fator de risco para o GPAA.

Em relação a frequência dos alelos da SNP estudada, nessa população, os dados sugerem que a frequência do alelo T é maior no grupo não glaucoma (21,3% vs. 15,4%), sugerindo o fator protetor desse alelo.

REFERÊNCIAS

1. American Academy of Ophthalmology Preferred Practice Patterns Committee. *Preferred Practice Pattern® Guidelines. Comprehensive Adult Medical Eye Evaluation. San Francisco, CA. Available at: <http://www.aao.org/ppp>. American Academy of Ophthalmology, 2015.*
2. de Mello, P.S.J., de Almeida, HG et al, *Glaucoma*. Série Oftalmologia Brasileira. Vol. III. 2013.
3. Weinreb, R.N., T. Aung, and F.A. Medeiros, *The pathophysiology and treatment of glaucoma: a review*. *Jama*, 2014. 311(18): p. 1901-11.
4. Tham, Y.-C., et al., *Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: a systematic review and meta-analysis*. *Ophthalmology*, 2014. 121(11): p. 2081-2090.
5. Weinreb, R.N., et al., *Primary open-angle glaucoma*. *Nat Rev Dis Primers*, 2016. 2: p. 16067.
6. Nunes, H.F., et al., *Investigation of CAV1/CAV2 rs4236601 and CDKN2B-AS1 rs2157719 in primary open-angle glaucoma patients from Brazil*. *Ophthalmic genetics*, 2018. 39(2): p. 194-199.
7. Bailey, J.N.C., et al., *Genome-wide association analysis identifies TXNRD2, ATXN2 and FOXC1 as susceptibility loci for primary open-angle glaucoma*. *Nature genetics*, 2016. 48(2): p. 189.
8. Miranda-Vizuite, A., et al., *Human mitochondrial thioredoxin reductase: cDNA cloning, expression and genomic organization*. *European journal of biochemistry*, 1999. 261(2): p. 405-412.
9. Chen, Y., J. Cai, and D.P. Jones, *Mitochondrial thioredoxin in regulation of oxidant-induced cell death*. *FEBS letters*, 2006. 580(28-29): p. 6596-6602.
10. Wiggs, J.L. and L.R. Pasquale, *Genetics of glaucoma*. *Hum Mol Genet*, 2017. 26(R1): p. R21-r27.
11. Ramus, S.M., et al., *Single nucleotide polymorphisms in the Trx2/TXNIP and TrxR2 genes of the mitochondrial thioredoxin antioxidant system and the risk of diabetic retinopathy in patients with Type 2 diabetes mellitus*. *Journal of Diabetes and its Complications*, 2016. 30(2): p. 192-198.

12. Méplan, C., et al., *Polymorphisms in thioredoxin reductase and selenoprotein K genes and selenium status modulate risk of prostate cancer*. PLoS One, 2012. 7(11): p. e48709.
13. Xie, W., et al., *Association of genetic variations of selenoprotein genes, plasma selenium levels, and prostate cancer aggressiveness at diagnosis*. Prostate, 2016. 76(7): p. 691-9.
14. Wang, J., et al., *[Association of genetic polymorphisms in selenoprotein GPXI and TXNRD2 with genetic susceptibility of gastric cancer]*. Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi, 2008. 42(7): p. 511-4.
15. Slattery, M.L., et al., *Genetic variation in selenoprotein genes, lifestyle, and risk of colon and rectal cancer*. PLoS One, 2012. 7(5): p. e37312.
16. Monteiro, J.G., *História do Glaucoma*. . 2014. 1a Edição Loures - Portugal: p. 7-8.
17. R., G., *The History of Glaucoma*. . Klin Monatsbl Augenheilkd 1986. 188(2): p. 167-169.
18. Souma, T., et al., *Angiopoietin receptor TEK mutations underlie primary congenital glaucoma with variable expressivity*. J Clin Invest, 2016. 126(7): p. 2575-87.
19. Dielemans I, V.J., Wolfs RC, et al., *The prevalence of primary open-angle glaucoma in a population-based study in The Netherlands: the Rotterdam Study*. . Ophthalmology 1994. 101: p. 1851-5.
20. Kass MA, H.D., Higginbotham EJ, et al. , *The Ocular Hypertension Treatment Study: a randomized trial determines that topical ocular hypotensive medication delays or prevents the onset of primary open-angle glaucoma*. Arch Ophthalmol 2002. 120: p. 701-13; discussion 829-30.
21. Quigley, H.A.B., A. T. , *The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020*. . Br. J. Ophthalmol., 2006. 90: p. 262–267.
22. Kapetanakis, V.V.e.a., *Global variations and time trends in the prevalence of primary open angle glaucoma (POAG): a systematic review and metaanalysis*. Br. J. Ophthalmol. , 2016. 100(86–93).
23. Gordon, M.O., et al., *The Ocular Hypertension Treatment Study: baseline factors that predict the onset of primary open-angle glaucoma*. Arch Ophthalmol, 2002. 120(6): p. 714-20; discussion 829-30.
24. Wolfs, R.C.e.a., *Genetic risk of primary open-angle glaucoma. Population-based familial aggregation study*. . Arch. Ophthalmol. , 1998. 116: p. 1640–1645.

25. Collaborative Normal-Tension Glaucoma Study Group. *Comparison of glaucomatous progression between untreated patients with normal-tension glaucoma and patients with therapeutically reduced intraocular pressures.* . American Journal of Ophthalmology, 1998(126): p. 487–497.
26. Stewart, W.C., et al., *Factors associated with visual loss in patients with advanced glaucomatous changes in the optic nerve head.* Am J Ophthalmol, 1993. 116(2): p. 176-81.
27. The AGIS Investigators. *The advanced glaucoma intervention study (AGIS): 7. the relationship between control of intraocular pressure and visual field deterioration* American Journal of Ophthalmology, 2000(130): p. 429–440.
28. Zhao, D., Cho, J., Kim, M. H., Guallar, E. , *The association of blood pressure and primary open-angle glaucoma: a meta-analysis.* . American Journal of Ophthalmology, 2014(158): p. 615–627.e9.
29. Zhou, M., Wang, W., Huang, W. & Zhang, X. , *Diabetes mellitus as a risk factor for open-angle glaucoma: a systematic review and meta-analysis.* . PLoS ONE 2014(9): p. e102972.
30. Leske, M.C., Wu, S.-Y., Nemesure, B., Hennis, A., *Incident open-angle glaucoma and blood pressure.* . Arch. Ophthalmol. , 2002(120): p. 954–959.
31. Yang, D.e.a., *Optic neuropathy induced by experimentally reduced cerebrospinal fluid pressure in monkeys.* . Invest. Ophthalmol. Vis. Sci, 2014. 55: p. 3067–3073.
32. Nguyen, T.D., *Biomechanical assessment in models of glaucomatous optic neuropathy.* . Exp. Eye Res. , 2015(141): p. 125–138.
33. Burgoyne, C., *The morphological difference between glaucoma and other optic neuropathies.* J Neuroophthalmol, 2015. 35 Suppl 1: p. S8-s21.
34. Mozaffarieh, M., Grieshaber, M. C., Orgül, S., Flammer, J. , *The potential value of natural antioxidative treatment in glaucoma.* Surv. Ophthalmol. , 2008(53): p. 479–505.
35. Liu, Q.e.a., *Oxidative stress is an early event in hydrostatic pressure induced retinal ganglion cell damage.* . Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. , 2007(48): p. 4580–4589.
36. Seki, M.L., S. A. , *Targeting excitotoxic/free radical signaling pathways for therapeutic intervention in glaucoma.* . Prog. Brain Res. , 2008. 173: p. 495–510.
37. Flammer, J., Haefliger, I. O., Orgül, S. & Resink, T., *Vascular dysregulation: a principal risk factor for glaucomatous damage?* . Journal of Glaucoma, 1999(8): p. 212–219.

38. Wax, M.B., Tezel, G. , *Immunoregulation of retinal ganglion cell fate in glaucoma*. . Exp. Eye Res. , 2009. 88: p. 825–830.
39. Tezel, G.W., M. B. , *The immune system and glaucoma*. . Curr. Opin. Ophthalmol., 2004(15): p. 80–84.
40. Bell, K.e.a., *Does autoimmunity play a part in the pathogenesis of glaucoma?* . Prog. Retin. Eye Res. , 2013. 36(199–216).
41. Son, J.L.e.a., *Glaucomatous optic nerve injury involves early astrocyte reactivity and late oligodendrocyte loss*. . Glia, 2010. 58: p. 780-789.
42. Agarwal, R., Gupta, S. K., Agarwal, P., Saxena, R. Agarwal, S. S. , *Current concepts in the pathophysiology of glaucoma*. Indian J. Ophthalmol. 2009. 57: p. 257–266
43. Mancino, R., et al., *Glaucoma and Alzheimer Disease: One Age-Related Neurodegenerative Disease of the Brain*. Curr Neuroparmacol, 2018. 16(7): p. 971-977.
44. Yucel, Y.H., et al., *Memantine protects neurons from shrinkage in the lateral geniculate nucleus in experimental glaucoma*. Arch Ophthalmol, 2006. 124(2): p. 217-25.
45. Hare, W.A., et al., *Efficacy and safety of memantine treatment for reduction of changes associated with experimental glaucoma in monkey, II: Structural measures*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004. 45(8): p. 2640-51.
46. Hernandez RA, B.J., Vale LD. , *Economic evaluation of screening for open-angle glaucoma*. . Int J Technol Assess Health Care 2008(24): p. 203-11.
47. Friedman DS, W.R., O'Colmain BJ, et al, *Eye Diseases Prevalence Research Group. Prevalence of open-angle glaucoma among adults in the United States*. . Arch Ophthalmol, 2004(122): p. 532-8.
48. Doshi V, Y.-L.M., Azen SP, Varma R, *Los Angeles Latino Eye Study Group. Sociodemographic, family history, and lifestyle risk factors for open-angle glaucoma and ocular hypertension. The Los Angeles Latino Eye Study*. . Ophthalmology 2008(115): p. 639-47.
49. Freeman EE, M.B., West SK, et al. , *Glaucoma and quality of life: the Salisbury Eye Evaluation*. Ophthalmology 2008(115): p. 233-8.
50. *American Academy of Ophthalmology. Policy Statement. Recommendations for Genetic Testing of Inherited Eye Diseases. San Francisco, CA: American Academy of Ophthalmology; 2014. Available at: <http://www.aao.org/guidelines-browse?filter=clinicalstatement>. Accessed October 19, 2018.*

51. Gordon MO, B.J., Brandt JD, et al. , *The Ocular Hypertension Treatment Study: baseline factors that predict the onset of primary open-angle glaucoma*. Arch Ophthalmol 2002(120): p. 714-20.
52. Medeiros FA, S.P., Zangwill LM, et al. , *Corneal thickness as a risk factor for visual field loss in patients with preperimetric glaucomatous optic neuropathy*. . American Journal of Ophthalmology, 2003;(136): p. 805-13.
53. Dueker DK, S.K., Lin SC, et al. , *Corneal thickness measurement in the management of primary open-angle glaucoma: a report by the American Academy of Ophthalmology*. . Ophthalmology 2007(114): p. 1779-87.
54. Carbonaro F, H.P., Fahy SJ, et al. , *Optic disc planimetry, corneal hysteresis, central corneal thickness, and intraocular pressure as risk factors for glaucoma*. . American Journal of Ophthalmology, 2014(157): p. 441-6.
55. Jampel HD, S.K., Lin SC, et al. , *Assessment of visual function in glaucoma: a report by the American Academy of Ophthalmology*. . Ophthalmology, 2011(118): p. 986-1002.
56. Keltner JL, J.C., Quigg JM, et al. , *Ocular Hypertension Treatment Study Group. Confirmation of visual field abnormalities in the Ocular Hypertension Treatment Study*. Arch Ophthalmol, 2000(118): p. 1187-94.
57. Keltner JL, J.C., Levine RA, et al. , *Normal visual field test results following glaucomatous visual field end points in the Ocular Hypertension Treatment Study*. Arch Ophthalmol, 2005(123): p. 1201-6.
58. Iester M, D.F.R., Zanini M. , *Topographic analysis to discriminate glaucomatous from normal optic nerve heads with a confocal scanning laser: new optic disk analysis without any observer input*. Surv Ophthalmol Suppl 1999(44): p. S33-40.
59. De Fendi, L.I., Arruda, G. V., Scott, I. U. & Paula, J. S. , *Mitomycin C versus 5-fluorouracil as an adjunctive treatment for trabeculectomy: a meta-analysis of randomized clinical trials*. . Clin. Experiment. Ophthalmology, 2013(41): p. 798–806.
60. Alencar LM, B.C., Weinreb RN, et al. , *Comparison of HRT-3 glaucoma probability score and subjective stereophotograph assessment for prediction of progression in glaucoma*. Invest Ophthalmol Vis Sci 2008(49): p. 1898-906.
61. Lin SC, S.K., Jampel HD, et al. , *Optic nerve head and retinal nerve fiber layer analysis: a report by the American Academy of Ophthalmology*. . Ophthalmology 2007(114): p. 1937-49.

62. Medeiros FA, Z.L., Bowd C, Weinreb RN, *Comparison of the GDx VCC scanning laser polarimeter, HRT II confocal scanning laser ophthalmoscope, and stratus OCT optical coherence tomograph for the detection of glaucoma*. Arch Ophthalmol, 2004(122): p. 827-37.
63. Garway-Heath, D.F.e.a., *Latanoprost for open-angle glaucoma (UKGTS): a randomised, multicentre, placebo-controlled trial*. Lancet, 2015(385): p. 1295–1304.
64. Heijl, A.e.a., *Reduction of intraocular pressure and glaucoma progression: results from the Early Manifest Glaucoma Trial*. Arch. Ophthalmol. , 2002(120): p. 1268–1279.
65. Musch, D.C., Gillespie, B. W., Niziol, L. M., Lichter, P. R., Varma, R. , *Intraocular pressure control and long-term visual field loss in the Collaborative Initial Glaucoma Treatment Study*. Ophthalmology, 2011(118): p. 1766–1773.
66. McIlraith, I., Strasfeld, M., Colev, G. & Hutnik, C. M. L. , *Selective laser trabeculoplasty as initial and adjunctive treatment for open-angle glaucoma*. . Journal of Glaucoma 2006(15): p. 124–130
67. Zhang, K., Zhang, L. & Weinreb, R. N. , *Ophthalmic drug discovery: novel targets and mechanisms for retinal diseases and glaucoma*. . Nat. Rev. Drug Discov, 2012(11): p. 541–559.
68. Okeke, C.O.e.a., *Interventions improve poor adherence with once daily glaucoma medications in electronically monitored patients*. Ophthalmology, 2009(116): p. 2286–2293
69. Wong, M.O.M., Lee, J. W. Y., Choy, B. N. K., Chan, J. C. H. & Lai, J. S. M. , *Systematic review and meta-analysis on the efficacy of selective laser trabeculoplasty in open-angle glaucoma*. . Surv. Ophthalmol. , 2015(60): p. 36–50
70. Realini, T., *Selective laser trabeculoplasty for the management of open-angle glaucoma in St. Lucia*. JAMA Ophthalmology, 2013(131): p. 321–327.
71. Landers, J., Martin, K., Sarkies, N., Bourne, R., Watson, P. A. , *Twenty-year follow-up study of trabeculectomy: risk factors and outcomes*. Ophthalmology 2012(119): p. 694–702.
72. Saheb, H., Gedde, S. J., Schiffman, J. C. & Feuer, W. J. , *Outcomes of glaucoma reoperations in the tube versus trabeculectomy (TVT) study*. American Journal of Ophthalmology, 2014(157): p. 1179–1189.e2.
73. Minckler, D.S.e.a., *Aqueous shunts in glaucoma: a report by the American Academy of Ophthalmology*. Ophthalmology, 2008(115): p. 1089–1098.

74. Minckler, D., Mosaed, S., Francis, B., Loewen, N., Weinreb, R. N. , *Clinical results of ab internotrabeculotomy using the trabectome for open-angle glaucoma: the Mayo Clinic series in Rochester, Minnesota.* . American Journal of Ophthalmology, 2014(157): p. 1325–1326.
75. Samuelson, T.W., Katz, L. J., Wells, J. M., Duh, Y.-J., Giamporcaro, J. E. , *Randomized evaluation of the trabecular micro-bypass stent with phacoemulsification in patients with glaucoma and cataract.* . Ophthalmology 2011(118): p. 459–467.
76. Chen, Y., J. Cai, and D.P. Jones, *Mitochondrial thioredoxin in regulation of oxidant-induced cell death.* FEBS Lett, 2006. 580(28-29): p. 6596-602.
77. Chrysostomou, V., Rezania, F., Trounce, I.A. & Crowston, J.G. , *Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in glaucoma.* . Curr. Opin. Pharmacol, 2013(13): p. 12–15.
78. Caprioli, J., et al., *Overexpression of thioredoxins 1 and 2 increases retinal ganglion cell survival after pharmacologically induced oxidative stress, optic nerve transection, and in experimental glaucoma.* Transactions of the American Ophthalmological Society, 2009. 107: p. 161.
79. Mayo, O., *A century of Hardy-Weinberg equilibrium.* Twin Res Hum Genet, 2008. 11(3): p. 249-56
80. Bagnis, A., et al., *Aqueous humor oxidative stress proteomic levels in primary open angle glaucoma.* Experimental Eye Research, 2012. 103: p. 55-62.
81. d'Azy, C.B., et al., *Oxidative and anti-oxidative stress markers in chronic glaucoma: a systematic review and meta-analysis.* PloS one, 2016. 11(12): p. e0166915.
82. Ferreira, S.M., et al., *Oxidative stress markers in aqueous humor of glaucoma patients.* American journal of ophthalmology, 2004. 137(1): p. 62-69.
83. Majsterek, I., et al., *Evaluation of oxidative stress markers in pathogenesis of primary open-angle glaucoma.* Experimental and molecular pathology, 2011. 90(2): p. 231-237.
84. Pinazo-Duran, M.D., et al., *Oxidative stress and mitochondrial failure in the pathogenesis of glaucoma neurodegeneration,* in *Progress in brain research.* 2015, Elsevier. p. 127-153.
85. Arner, E.S. and A. Holmgren, *Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase.* Eur J Biochem, 2000. 267(20): p. 6102-9.
86. Chidlow, G., J.P.M. Wood, and R.J. Casson, *Investigations into Hypoxia and Oxidative Stress at the Optic Nerve Head in a Rat Model of Glaucoma.* Front Neurosci, 2017. 11: p. 478.

87. Tezel, G., *Oxidative stress in glaucomatous neurodegeneration: mechanisms and consequences*. Prog Retin Eye Res, 2006. 25(5): p. 490-513.
88. Micheal, S., et al., *Association of known common genetic variants with primary open angle, primary angle closure, and pseudoexfoliation glaucoma in Pakistani cohorts*. Mol Vis, 2014. 20: p. 1471-9.
89. Abu-Amero, K.K., et al., *Glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms in Arab glaucoma patients*. Molecular vision, 2008. 14: p. 425.
90. Malinowska, K., et al., *The role of Cat-262C/T, GPX1 Pro198Leu and Sod1+ 35A/C gene polymorphisms in a development of primary open-angle glaucoma in a Polish population*. Polish Journal of Pathology, 2016. 67(4): p. 404-410.
91. Safa, F.K., G. Shamsavari, and R.Z. Abyaneh, *Glutathione s-transferase M1 and T1 genetic polymorphisms in Iranian patients with glaucoma*. Iranian journal of basic medical sciences, 2014. 17(5): p. 332.
92. Unal, M., et al., *Glutathione S transferase M1 and T1 genetic polymorphisms are related to the risk of primary open-angle glaucoma: a study in a Turkish population*. Br J Ophthalmol, 2007. 91(4): p. 527-30.

APÊNDICE A – Questionário

UNIVERSIDADE DE PERNAMBUCO
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES – FIOCRUZ-PE
INSTITUTO DE OLHOS DO RECIFE- AÇÃO VISUAL

Estudo do Polimorfismo dos Genes TXNRD2 e CDKN2b em Pacientes com Glaucoma
 Primário de Ângulo Aberto

Nome:		Prontuário:	
DN: ____/____/____ Sexo: M() F ()		HFG:	
HAS () DM () TABAGISMO () Cirurgia Ocular: OD: _____ _____ OE: _____ _____		Medicações em Uso: • _____ • _____ • _____ • _____ • _____ • _____	
Em Uso	CD ()	MT ()	TB ()
Outro:			
Campimetria:	Sugestiva ()	Não Sugestiva ()	Data: ____/____/____
OCT:	NS: N() B() O() N: N() B() O() NI: N() B() O() TS: N() B() O() T: N() B() O() TI: N() B() O()	NS: N() B() O() N: N() B() O() NI: N() B() O() TS: N() B() O() T: N() B() O() TI: N() B() O()	Data: ____/____/____
PIO:	OD:	OE:	Data: ____/____/____
PIO inicial	OD:	OE:	Data: ____/____/____
E/D: atual	OD:	OE:	Data: ____/____/____
E/D: inicial	OD:	OE:	Data: ____/____/____
Paquimetria	OD:	OE:	Data: ____/____/____

APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Elaborado de acordo com a Resolução 466/2012-CNS/CONEP)

Convidamos V.Sa. a participar da pesquisa **Polimorfismo dos Genes *TXNRD2* (rs35934224) em Pacientes com Glaucoma Primário de Ângulo Aberto**, sob responsabilidade do pesquisador Artur Lins Tenório e sua equipe Luydson Richardson Silva Vasconcelos, Rodrigo Feliciano do Carmo, André Lins Tenório e Rodrigo Pessoa Cavalcanti Lira orientado pela Professor Luydson Richardson Silva Vasconcelos tendo por objetivo: Investigar a associação do polimorfismo rs35934224 do gene *TXNRD2* e com o GPAA.

Para realização deste trabalho usaremos o(s) seguinte(s) método(s): Preenchimento de um questionário por partes dos participantes da pesquisa selecionados e coleta de amostra de sangue.

Esclarecemos que manteremos em anonimato, sob sigilo absoluto, durante e após o término do estudo, todos os dados que identifiquem os participantes da pesquisa usando apenas, para divulgação, os dados inerentes ao desenvolvimento do estudo. Informamos também que após o término da pesquisa, todos os dados referentes aos participantes da pesquisa serão destruídos, não restando nada que venha a comprometer o anonimato de sua participação agora ou futuramente.

Quanto aos riscos e desconfortos, os participantes da pesquisa terão o desconforto da punção de uma veia periférica, para a coleta de um total de 10ml de sangue (o equivalente a duas colheres de chá, sem mais).

Caso você venha a sentir dor, irritação ou outra alteração no local da punção, comunique ao pesquisador para que sejam tomadas as devidas providencias. O benefício esperado com o resultado desta pesquisa é aperfeiçoar os recursos para o diagnostico precoce para ser usada pelo oftalmologista no manejo do GPAA.

O (A) senhor (a) terá os seguintes direitos: a garantia de esclarecimento e resposta a qualquer pergunta; a liberdade de abandonar a pesquisa a qualquer momento sem prejuízo para si ou para seu tratamento (se for o caso); a garantia de que em caso haja algum dano a sua pessoa (ou o dependente), os prejuízos serão assumidos pelos pesquisadores ou pela instituição responsável. Inclusive, acompanhamento médico e hospitalar (se for o caso). Caso haja gastos adicionais, para o participante ou acompanhante, por exemplo alimentação e transporte, esses valores serão pagos pelo pesquisador (conforme resolução CNS nº 466 de 2012, itens II.21 e IV.3.g). Ademais, caso haja qualquer dano aos participantes da pesquisa esses terão direito de buscar indenização (conforme resolução CNS nº 466 de 2012, item IV.3.h)

Os sangues coletados serão utilizados para extrair o DNA e posteriormente usar a técnica do PCR-RT para genotipar as amostras que posteriormente serão estatisticamente analisadas juntamente com as informações colhidas nesse questionário.

É sabido que o gene CDKN2b-AS1 está envolvido com diversas patologias na área da hematologia, cardiologia e pneumologia, mas ainda sem nenhuma mudança no tratamento baseado no polimorfismo desses genes. Por outro lado, o gene *TXNRD2* tem importante

papel no metabolismo mitocondrial, relacionado ao estresse oxidativo sendo associado apenas ao glaucoma até o momento. Além disso, o presente estudo visa estudar apenas um dos diversos polimorfismo de cada gene.

O resultado do polimorfismo desses genes ficará registrado no prontuário dos participantes da pesquisa (do IOR/Ação Visual) e estarão acessíveis aos mesmo a qualquer momento.

Nos casos de dúvidas e esclarecimentos o (a) senhor (a) deve procurar os pesquisadores Dr. Luydson Richardson Silva Vasconcelos – Luydson@gmail.com, Artur Lins Tenório - arturlt12@gmail.com fone: (81) 99702-2003

Caso suas duvidas não sejam resolvidas pelos pesquisadores ou seus direitos sejam negados, favor recorrer ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Pernambuco, localizado à Av. Agamenon Magalhães, S/N, Santo Amaro, Recife-PE, telefone 81-3183-3775 ou ainda através do e- mail comite.etica@upe.br.

Consentimento Livre e Esclarecido

Eu _____, após ter recebido todos os esclarecimentos e ciente dos meus direitos, concordo em participar desta pesquisa, bem como autorizo a divulgação e a publicação de toda informação por mim transmitida, exceto dados pessoais, em publicações e eventos de caráter científico. Desta forma, assino este termo, juntamente com o pesquisador, em duas vias de igual teor, ficando uma via sob meu poder e outra em poder do (s) pesquisador (es).

Recife,

Data: ____ / ____ / ____

Assinatura do participante da
pesquisa (ou responsável)

Assinatura do pesquisador

ANEXO A - Carta de Aprovação pelo CEP

UNIVERSIDADE DE
PERNAMBUCO/ PROPEGE/



Continuação do Parecer: 3.003.703

Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	16:13:47	TENORIO	Aceito
----------------	--------------------	----------	---------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 06 de Novembro de 2018

Assinado por:
Jael Maria de Aquino
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Agamenon Magalhães, s/nº

Bairro: Santo Amaro

CEP: 50.100-010

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)3183-3775

Fax: (81)3183-3775

E-mail: comite.etica@upe.br

ANEXO B - Comprovação da submissão em Revista

PERSONAL VIEW

Glaucoma

An Official Publication of the World Glaucoma Association

HOME • LOGOUT • HELP • REGISTER • UPDATE MY INFORMATION • JOURNAL OVERVIEW
MAIN MENU • CONTACT US • SUBMIT A MANUSCRIPT • INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Editorial Manager

Role: **Author** Username: ArturIt12

Submissions Being Processed for Author Artur Lins Tenório, M.D.

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
View Submission Author Status	JOG-D-19-008	TXNRD2 (rs35934224) CT/TT Genotypes as Protection Marker for Primary Open-Angle Glaucoma in a Brazilian Population	Jan 07, 2019	Jan 08, 2019	With Editor

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

<< Author Main Menu

ANEXO C - Certificado de Apresentação na CBO



www.cbo2017.com.br

**61º CONGRESSO BRASILEIRO DE
OFTALMOLOGIA**

6 a 9 de setembro Centro de Eventos do Ceará
Fortaleza Ceará Brasil

CERTIFICADO

Certificamos que o Trabalho Científico intitulado

**"TXNRD2 AND CDKN2B-AS1 GENE POLYMORPHISMS IN PATIENTS WITH PRIMARY
OPEN-ANGLE GLAUCOMA"**

de autoria de "ARTUR LINS TENORIO, Rodrigo Feliciano do Carmo, Luydson Richardson Vasconcelos, Lucas D e Silva, Raul E de Lima, Rinalva Tenorio Vaz, Pedro Teixeira Falcao Neto, Roberto Pedrosa Galvao Filho, Rodrigo Pessoa Cavalcanti Lira" foi apresentado em forma de Pôster no 61º Congresso Brasileiro de Oftalmologia, realizado de 06 a 09 de Setembro de 2017, no Centro de Eventos do Ceará.

Fortaleza, 09 de setembro de 2017



Dr. David da Rocha Lucena
Presidente
61º Congresso Brasileiro de Oftalmologia



Prof. Dr. Dácio Carvalho Costa
Presidente
61º Congresso Brasileiro de Oftalmologia



Prof. Dr. Homero Gusmão de Almeida
Presidente de Honra do Congresso
Presidente do Conselho Brasileiro de Oftalmologia



CONSELHO BRASILEIRO DE OFTALMOLOGIA
Empresa Certificada
ISO 9001



ANEXO D - Certificado de Apresentação na PAAO



Certificate Presented to

Artur Lins Tenório

for the oral presentation

*'TXNRD2 and CDKN2B-AS1 gene polymorphisms in patients with
Primary Open-Angle Glaucoma'*

Pan-American Research Day

Saturday, May 6, 2017 12:30 pm – 5:00 pm

Chesapeake Ballroom I and III, Sheraton Inner Harbor Hotel ... Baltimore, Maryland, USA

Jorge E. Valdez G., MD
PARD Coordinator

J. Fernando Azeiteiro, MD
PARD Committee

Paulo E.C. Damásio, MD
PARD Committee

Peter Quijas, MD
PARD Committee

***TXNRD2* (rs35934224) CT/TT Genotypes as Protection Marker
for Primary Open-Angle Glaucoma in a Brazilian Population**

Artur Lins Tenório MD¹, Rodrigo Pessoa Cavalcanti Lira PhD¹, Rodrigo Feliciano do Carmo PhD², Roberto Pedrosa Galvão Filho PhD³, Pedro Teixeira Falcão Neto MD³, Rinalva Tenório Vaz MD⁴, Raul Emidio de Lima MSc⁵, Luydson Richardson Vasconcelos PhD⁵

1 - Federal University of Pernambuco: Pós-graduação em Cirurgia - Hospital das Clínicas – Campus UFPE. Av Prof. Moraes Rego, s/n. Cidade Universitária. Recife-PE;

2- Federal University of São Francisco Valley: Av. José de Sá Manicoba, S/N - Centro, Petrolina – PE;

3- Recife Eye Institute: Av. José de Sá Manicoba, S/N - Centro, Petrolina – PE;

4- Santa Luzia Eye Hospital: Estr do Encanamento, 909 - Casa Forte, Recife – PE;

5- Aggeu Magalhães Institute: Campus da UFPE - Av. Prof. Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária, Recife – PE.

Précis:

This is the first cross-sectional study that suggest the GWAS candidate *TXNRD2* as biomarker for POAG.

Abstract:

Purpose: To study the association of the rs35934224 polymorphism of the *TXNRD2* gene with POAG. **Methods:** We performed a cross-sectional study to confirm the association between the rs35934224 (*TXNRD2*) and POAG in a population from the northeast region of Brazil. A total of 184 individuals were enrolled, being 94 cases with POAG (45 males and 49 females) and 94 controls (40 males and 54 females) from the Recife Eye Institute. **Results:** Mean age was 68,85 years for cases and 68,55 years for controls. Genomic DNA was isolated using commercially available kits and detection of the SNPs was done by Real Time PCR using TaqMan probes. The studied population was in Hardy–Weinberg equilibrium. Individuals from glaucoma group presented a higher frequency of the CC genotype when compared to the control group (72.3% vs. 59.5%; $p=0.032$). Otherwise, the CT genotype was associated with protection to POAG (24.4% vs. 38.2%; $p=0.022$). **Conclusion:** To sum up, our data confirm the association between *TXNRD2* gene polymorphism (rs35934224) with POAG in an admixed Brazilian population. This is the first study to associate this SNP with glaucoma in Latin-Americans and support the potential use of this SNP in the future for gene-based tests for identifying individuals at risk for developing POAG.

Keywords: Glaucoma. *TXNRD2*. POAG.

Introduction

Primary open-angle glaucoma (POAG) is characterized by loss of retinal ganglion cells, optic nerve damage and irreversible loss of visual field [5]. It is estimated that about 35-58 million people are affected by POAG worldwide, and this number is expected to increase up to between 53 and 65.5 million by 2020, owing to the ageing world population [6, 7].

Although there are many proposed mechanisms, the pathophysiology of POAG and factors that contribute to the worsening of disease still remains obscure[8]. Recent advances in genomic technologies and genome-wide association studies (GWAS) have greatly accelerated the discovery and understanding of genes and genomic regions associated with POAG and influencing the quantitative endophenotype traits related to POAG pathogenesis [9]. However, most studies have been conducted in European and Asian populations. Data regarding the influence of these genes in other populations are lacking.

A single nucleotide polymorphism (SNP) in Thioredoxin reductase 2 (*TXNRD2*) gene (rs35934224) was strongly associated with POAG in a recent GWAS [10]. *TXNRD2* is located on chromosome 22q11.21 and consists of 18 exons of relatively small size with intron sizes ranking between 200 and 10 000 bp [11]. *TXNRD2* codes for thioredoxin reductase 2, a mitochondrial protein necessary for reducing damaging reactive oxygen species generated by oxidative phosphorylation and other mitochondrial functions [12, 13].

In addition to POAG, genetic variation in the *TXNRD2* was found to be associated with diabetic retinopathy [14], prostate cancer [15, 16], gastric cancer [17] and colon and rectal cancer [18].

The aim of this study is to investigate the association of the single nucleotide polymorphism (SNP) rs35934224 in *TXNRD2* gene with POAG in a population from the northeast of Brazil.

Material and Methods

Study population

The present study recruited individuals from the northeast of Brazil attended at Fundação Ação Visual/IOR located in the city of Recife, Pernambuco.

All of the patients underwent a complete ophthalmological examination, biomicroscopy, gonioscopy, a fundus examination, and an optic disc evaluation by means of a stereoscopic fundus lens (90-dioptre lens, Volk Optical Inc., Mentor, OH, USA). Intraocular pressure (IOP) was assessed using a Goldmann applanation tonometer (Haag Streit AG, Bern, Switzerland). Automated perimetry was performed with Humphrey Automated Field Analyzer using a 24-2 SITA-FAST protocol (Humphrey Inc., San Leandro, CA, USA) or peripapillary retinal nerve fiber layer thickness (RNFLT) with SD-OCT (Spectral-domain Optical Coherence Tomography, Heidelberg, Germany) in order to assess visual field defects or quantify glaucomatous damage through nerve fiber layer (NFL) thickness in glaucoma patients.

A total of 94 individuals with POAG were included in the present study. Primary open angle glaucoma (POAG) was diagnosed, if we found glaucoma optic neuropathy (GON), visual field defects or retinal nerve fiber layer thickness, regardless of the IOP in one or both eyes, based on three criteria: (1) Morphological changes in the optic nerve head characteristic of GON. The cup to disc ratio cutoff value to separate GON from healthy eyes was 0.7 or asymmetry ≥ 0.2 between eyes, presence of localized RNFL defects, and/or neuroretinal rim area defects. (2) at least two OCT showing progressive retinal nerve fiber layer thinning or visual field defects corresponding with RNFL thinning, in the standard automated perimetry, considering Glaucomatous visual field defect with pattern standard derivation outside of 95% normal limits or a glaucoma hemifield test result outside of the 99% (Humphrey Swedish

interactive 24-2 SITA-FAST protocol). (3) Open and normal appearing angle of the anterior chamber in gonioscopy.

POAG was diagnosed in patients before they have been enrolled in the study. People using eye drops other than antiglaucoma, after ocular surgery, during 6 months after glucocorticosteroid or immunosuppressive therapy were excluded from this study.

The control group consisted of 94 individuals without glaucomatous optic nerve neuropathy, cup to disc ratio up to 0,5 and IOP less than 18mmHg. None of the healthy controls had evidence of any ocular diseases or autoimmune/autoinflammatory and systemic disorders matched by geographical region. Furthermore, patients with family history for glaucoma or blindness were excluded.

The present study was approved by the Ethical Committee in Research of the University of Pernambuco under the protocol 56467316.8.0000.5207 and was conducted in accordance with the provisions of the declaration of Helsinki and Good Clinical Practice guidelines.

DNA Extraction and Genotyping

Genomic DNA was extracted from whole blood by using QIAamp DNA Blood Kit (QIAGEN Inc, Chatsworth, CA) following the manufacturer's instructions. The extracted DNA was measured using nanodrop spectrometry technology and stored at -20°C until further analysis.

A 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA) was used to detect the SNP of gene *TXNRD2* (rs35934224) using Taqman probe (Assay:

C__2539086_10). The assays were performed with Taqman genotyping master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) in 96-well plates.

Outcomes and sample size

The main outcome was the frequency of the CC genotype. The secondary outcome was the allelic distribution. Sample size calculations based on presumed frequency rate of the CC genotype of 55% in the control group and 75% in the POAG group indicated that a sample size of 89 in each group would be significant for detecting a difference of this magnitude with a power of 80% and type 1 error probability of 5%.

Statistical analysis

The statistical analysis of the data was performed using SPSS statistical software package version 22.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). Categorical variables were compared using the chi-squared test, the results are presented using odds ratio (OR) with 95% confidence interval (CI), gender and age variables were performed between the groups using the Student's t-test or the Mann-Whitney U test for parametrically or non-parametrically distributed data when appropriated. The differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

Results

The studied population was in Hardy–Weinberg equilibrium. Table 1 describes mean age and gender distribution between cases and controls. The frequencies of males and females as also mean age were similar between cases and controls ($p>0.05$).

Based on the genotypes CC vs CT/TT of *TXNRD2* rs35934224 the glaucoma group was categorized according baseline characteristics. The analysis between the groups doesn't show statistical difference (Table 2).

Table 3 summarizes the allelic and genotype frequencies of *TXNRD2* rs35934224 in individuals with POAG and controls. Individuals with POAG presented a higher frequency of the CC genotype when compared to the control group (72.3% vs. 59.5%; $p=0.032$; OR=0.56; IC = 0.30 – 1.03). On the other hand, the CT genotype was associated with protection to POAG (24.4% vs. 38.2%; $p=0.022$; OR=0.52; IC = 0.27 – 0.98). Allelic distribution was not significantly associated.

Discussion

In the present study, we found a significant association between a SNP in the *TXNRD2* gene (rs35934224) and POAG in a Brazilian population. This SNP was recently described as being a risk factor for POAG. This is the first study to confirm the association of this SNP with POAG in a candidate gene cross-sectional study in an admixture population [19].

Oxidative stress and antioxidant systems are very important in ocular tissue. Several studies have demonstrated a significant contribution of oxidative stress in POAG pathogenesis [20-25]. Additionally, a recent meta-analysis demonstrated an overall increase of oxidative stress molecules in glaucoma, both in serum and aqueous humor. On the other hand, the authors observed a decrease of some antioxidant markers, suggesting that reduction in reactive oxygen species (ROS) could be neuroprotective [22]. The mitochondrial thioredoxin reductase (*TXNRD2*), had a central importance for mitochondrial scavenging of reactive oxygen species (ROS) [26], it is well established that antioxidant molecules could be implicated in the pathogenesis of glaucoma since the oxidative stress might play a causal role

in this disease [22, 27, 28]. In addition, polymorphisms in molecules associated to antioxidant systems [29] have been reported in POAG patients [15, 30-33].

Herein, individuals carrying the T allele (CT/TT or CT genotypes) in *TXNRD2* (rs35934224) had protection to develop POAG when compared to the control group. Our results confirm the association found in the GWAS study performed by [10], where they found a significant association between the rs35934224 allele T with protection to POAG, besides demonstrate *TXNRD2* expression in retinal ganglion cells and the optic nerve head in normal human ocular tissue [10]. Additionally, the role of *TXNRD2* in glaucoma pathogenesis has been evidenced through an experimental glaucoma model where overexpression of thioredoxin 2, the substrate of thioredoxin reductase 2, increased retinal ganglion cell survival [34]. Thus, reduction of reactive oxygen species levels by *TXNRD2* could prevent glaucoma, additionally the SNP rs35934224 is located in a inter-exon region and is in linkage disequilibrium with others SNPs in regulatory regions such as 3'-UTR and promoter region can be affect the expression levels of this molecule.

Our study has some limitations, such as the small number of individuals enrolled and the functional characterization of *TXNRD2* regarding the SNP rs35934224.

In summary, our data confirm the association between *TXNRD2* gene polymorphism (rs35934224) with POAG in an admixed Brazilian population. This is the first study to associate this SNP with POAG in Latin-Americans and reinforce the potential use of this SNP in the future for gene-based tests for identifying individuals at risk for developing POAG. However, further cross-sectional studies with larger cohorts in different populations are necessary to elucidate the potential use of *TXNRD2* in clinical practice.

References

1. Burgoyne, C., *The morphological difference between glaucoma and other optic neuropathies*. J Neuroophthalmol, 2015. **35 Suppl 1**: p. S8-s21.
2. Flammer, J., Haefliger, I. O., Orgül, S. & Resink, T., *Vascular dysregulation: a principal risk factor for glaucomatous damage?* . Journal of Glaucoma, 1999(8): p. 212–219.
3. American Academy of Ophthalmology Preferred Practice Patterns Committee. Preferred Practice Pattern® Guidelines. Comprehensive Adult Medical Eye Evaluation. San Francisco, CA. American Academy of Ophthalmology, 2015.
4. The AGIS Investigators. *The advanced glaucoma intervention study (AGIS): 7. the relationship between control of intraocular pressure and visual field deterioration* American Journal of Ophthalmology, 2000(130): p. 429–440.
5. Weinreb, R.N., T. Aung, and F.A. Medeiros, *The pathophysiology and treatment of glaucoma: a review*. Jama, 2014. **311**(18): p. 1901-11.
6. Tham, Y.-C., et al., *Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: a systematic review and meta-analysis*. Ophthalmology, 2014. **121**(11): p. 2081-2090.
7. Weinreb, R.N., et al., *Primary open-angle glaucoma*. Nat Rev Dis Primers, 2016. **2**: p. 16067.
8. Nunes, H.F., et al., *Investigation of CAV1/CAV2 rs4236601 and CDKN2B-AS1 rs2157719 in primary open-angle glaucoma patients from Brazil*. Ophthalmic genetics, 2018. **39**(2): p. 194-199.
9. Abu-Amero, K.K., Altaf A Chalam, Kakarla V, *An updated review on the genetics of primary open angle glaucoma*. International journal of molecular sciences, 2015. **16**(12): p. 28886-28911.
10. Bailey, J.N.C., et al., *Genome-wide association analysis identifies TXNRD2, ATXN2 and FOXC1 as susceptibility loci for primary open-angle glaucoma*. Nature genetics, 2016. **48**(2): p. 189.
11. Miranda-Vizuete, A., et al., *Human mitochondrial thioredoxin reductase: cDNA cloning, expression and genomic organization*. European journal of biochemistry, 1999. **261**(2): p. 405-412.
12. Chen, Y., J. Cai, and D.P. Jones, *Mitochondrial thioredoxin in regulation of oxidant-induced cell death*. FEBS letters, 2006. **580**(28-29): p. 6596-6602.
13. Wiggs, J.L. and L.R. Pasquale, *Genetics of glaucoma*. Hum Mol Genet, 2017. **26**(R1): p. R21-r27.
14. Ramus, S.M., et al., *Single nucleotide polymorphisms in the Trx2/TXNIP and TrxR2 genes of the mitochondrial thioredoxin antioxidant system and the risk of diabetic retinopathy in patients with Type 2 diabetes mellitus*. Journal of Diabetes and its Complications, 2016. **30**(2): p. 192-198.
15. Méplan, C., et al., *Polymorphisms in thioredoxin reductase and selenoprotein K genes and selenium status modulate risk of prostate cancer*. PLoS One, 2012. **7**(11): p. e48709.
16. Xie, W., et al., *Association of genetic variations of selenoprotein genes, plasma selenium levels, and prostate cancer aggressiveness at diagnosis*. Prostate, 2016. **76**(7): p. 691-9.
17. Wang, J., et al., *[Association of genetic polymorphisms in selenoprotein GPX1 and TXNRD2 with genetic susceptibility of gastric cancer]*. Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi, 2008. **42**(7): p. 511-4.

18. Slattery, M.L., et al., *Genetic variation in selenoprotein genes, lifestyle, and risk of colon and rectal cancer*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e37312.
19. Giolo, S.R., et al., *Brazilian urban population genetic structure reveals a high degree of admixture*. Eur J Hum Genet, 2012. **20**(1): p. 111-6.
20. Abu-Amero, K.K., et al., *Decreased total antioxidants in patients with primary open angle glaucoma*. Current eye research, 2013. **38**(9): p. 959-964.
21. Bagnis, A., et al., *Aqueous humor oxidative stress proteomic levels in primary open angle glaucoma*. Experimental Eye Research, 2012. **103**: p. 55-62.
22. d'Azy, C.B., et al., *Oxidative and anti-oxidative stress markers in chronic glaucoma: a systematic review and meta-analysis*. PloS one, 2016. **11**(12): p. e0166915.
23. Ferreira, S.M., et al., *Oxidative stress markers in aqueous humor of glaucoma patients*. American journal of ophthalmology, 2004. **137**(1): p. 62-69.
24. Majsterek, I., et al., *Evaluation of oxidative stress markers in pathogenesis of primary open-angle glaucoma*. Experimental and molecular pathology, 2011. **90**(2): p. 231-237.
25. Pinazo-Duran, M.D., et al., *Oxidative stress and mitochondrial failure in the pathogenesis of glaucoma neurodegeneration*, in *Progress in brain research*. 2015, Elsevier. p. 127-153.
26. Arner, E.S. and A. Holmgren, *Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase*. Eur J Biochem, 2000. **267**(20): p. 6102-9.
27. Chidlow, G., J.P.M. Wood, and R.J. Casson, *Investigations into Hypoxia and Oxidative Stress at the Optic Nerve Head in a Rat Model of Glaucoma*. Front Neurosci, 2017. **11**: p. 478.
28. Tezel, G., *Oxidative stress in glaucomatous neurodegeneration: mechanisms and consequences*. Prog Retin Eye Res, 2006. **25**(5): p. 490-513.
29. Micheal, S., et al., *Association of known common genetic variants with primary open angle, primary angle closure, and pseudoexfoliation glaucoma in Pakistani cohorts*. Mol Vis, 2014. **20**: p. 1471-9.
30. Abu-Amero, K.K., et al., *Glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms in Arab glaucoma patients*. Molecular vision, 2008. **14**: p. 425.
31. Malinowska, K., et al., *The role of Cat-262C/T, GPX1 Pro198Leu and Sod1+ 35A/C gene polymorphisms in a development of primary open-angle glaucoma in a Polish population*. Polish Journal of Pathology, 2016. **67**(4): p. 404-410.
32. Safa, F.K., G. Shahsavari, and R.Z. Abyaneh, *Glutathione s-transferase M1 and T1 genetic polymorphisms in Iranian patients with glaucoma*. Iranian journal of basic medical sciences, 2014. **17**(5): p. 332.
33. Unal, M., et al., *Glutathione S transferase M1 and T1 genetic polymorphisms are related to the risk of primary open-angle glaucoma: a study in a Turkish population*. Br J Ophthalmol, 2007. **91**(4): p. 527-30.
34. Caprioli, J., et al., *Overexpression of thioredoxins 1 and 2 increases retinal ganglion cell survival after pharmacologically induced oxidative stress, optic nerve transection, and in experimental glaucoma*. Transactions of the American Ophthalmological Society, 2009. **107**: p. 161.

Table 1: Mean age and sex distribution between individuals with POAG and controls

		POAG Group	Control Group	<i>P</i> value
Total		94	94	
Age (years)	Mean $\pm$ SD	68,85	68,55	0,946
Sex	Male	45 (47.8%)	40 (42.5%)	0,559
	Female	49 (52,2%)	54 (57.5%)	

Table 2: Baseline Characteristics of patients in Glaucoma Group stratified by genotypes of *TXNRD2* gene (rs35934224).

<i>Characteristics</i>	Genotypes <i>TXNRD2</i> gene (rs35934224)		<i>p</i>
	CC n= 68 n (%)	CT/TT n=26 n (%)	
Demographic			
Age in years, mean ($\pm$ SD)	68,8 ($\pm$ 10,4)	70,45 ($\pm$ 10,8)	0,5
Male	34 (50%)	11 (42,3%)	0,446
Female	34 (50%)	15 (57,7%)	
Medical History			
Family history of glaucoma	30 (44,1%)	9 (34,6%)	
Smoking	5 (7,3%)	4 (15,4%)	0,2365
Diabetes mellitus	13 (19,1%)	6 (23,0%)	0,669
Hypertension	34 (50%)	16 (61,5%)	0,3159
Glaucoma indices, mean ($\pm$ SD)			
IOP in mmHg	18,3 ($\pm$ 6,04)	15,5 ($\pm$ 3,01)	0,0988
Cup/disk ratio	0.81 ($\pm$ 0.18)	0,84 ($\pm$ 0,14)	0,3681
No. of anti-glaucoma medication	2.12 ($\pm$ 1.21)	1,96 ($\pm$ 1,02)	0,7049
TREC	29 (42,6%)	6 (26%)	0,1746

Table 3: Allele and genotype frequencies of the *TXNRD2* in individuals with POAG and controls.

	POAG Group (n = 94)	Control Group (n= 94)	Odds Ratio IC 95%	<i>P</i> value*
TXNRD2 (rs35934224)				
Genotypes				
CC	68 (72.3%)	56 (59.5%)	reference	reference
CT	23 (24.4%)	36 (38.2%)	0.52 (0.27-0.98)	0.022
TT	3 (3.3%)	2 (2.3%)	1.23 (0.19-7.65)	0.59
CT/TT	26 (27.7%)	38 (40.5%)	0.56 (0.30 – 1.03)	0.032
Alleles				
C	159 (84.6%)	148 (78.7%)	0.67 (0.39 – 1.14)	0.07
T	29 (15.4%)	40 (21.3%)		

*one talied qui-squared or fisher test