



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS

Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*

Mestrado em Genética

**Glaucoma primário de ângulo aberto não associado ao polimorfismo do
codon 72 do gene *p53* em pacientes brasileiros**

*Primary open angle glaucoma was not found to be associated with p53 codon 72
polymorphism in a Brazilian cohort*

Rodrigo Egidio da Silva

Goiânia-GO

2009



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS

Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*

Mestrado em Genética

**Glaucoma primário de ângulo aberto não associado ao polimorfismo do
codon 72 do gene *p53* em pacientes brasileiros**

*Primary open angle glaucoma was not found to be associated with p53 codon 72
polymorphism in a Brazilian cohort*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Stricto Sensu em Genética da Universidade Católica de
Goiás, para obtenção do Título de Mestre em Genética.

Rodrigo Egidio da Silva

Orientadora: Prof^a. Dra. Katia Karina Verolli de Oliveira Moura

Goiânia-GO

2009

Dedico...

Sabendo que nada sou, dedico a Deus Pai, pela inspiração e força que me permitiram concretizá-la. Aos meus pais Alvarino e Terezinha, que me apoiaram com palavras de incentivo e carinho, a minha esposa Kerley e aos meus filhos João Paulo e Sophia, que estiveram comigo em todos os momentos.

Agradecimentos

A Professora Dra. Katia Karina Verolli de Oliveira Moura pela orientação rigorosa na condução desta dissertação, pela confiança depositada e pelos ensinamentos.

Ao amigo, irmão e Professor Francisco W. Rodrigues, pela contribuição, apoio e ensinamentos para minha formação pessoal e profissional.

Aos Professores Clausmir Jacomi e Célio Heitor pelos ensinamentos em minha formação profissional.

A amiga Jalsi Tacon Arruda pela amizade, solicitude e colaboração indispensável nesta dissertação.

*“Para terminar uma caminhada de mil passos devemos
iniciar com o primeiro”.*

Provérbio chinês

Sumário

	Página
Lista de Figuras	vii
Lista de Abreviaturas	viii
Resumo	ix
1. Revisão Bibliográfica	x
2. Justificativa	xix
3. Objetivos	xx
4. Artigo	xxi
5. Conclusões	xxvi
6. Referências Bibliográficas	xxvii

Lista de Figuras

	Página
Figura 01. Esquema anatômico do globo ocular e fluxo do humor aquoso	1
Figura 02. A) setas indicam a escavação glaucomatosa; B) campimetria com dano glaucomatoso	2
Figura 03. Esquema do seio camerular e foto visualizando o seio camerular ..	2
Figura 04. Esquema do gene e da proteína p53 identificando o codon 72 onde ocorre o polimorfismo entre os aminoácidos prolina e arginina	7
Figura 05. Distribuição do polimorfismo no codon 72 entre diversas populações estudadas	9

Lista de Abreviaturas

GPAA	-	Glaucoma primário de ângulo aberto
GPAE	-	Glaucoma primário de ângulo estreito
DM	-	Diabetes mellitus
HAS	-	Hipertensão arterial sistêmica
PIO	-	Pressão intra-ocular
OMS	-	Organização Mundial de Saúde
TIGR	-	Trabecular meshwork induced glucocorticoid response protein
MYOC	-	Myocilin
OPTN	-	Optineurin
TNF α	-	Fator de necrose tumoral alfa
WDR36	-	WD repeat domain 36
Kb	-	Kilobases
SUS	-	Sistema Único de Saúde
mL	-	Mililitros
mmHg	-	Milímetro de mercúrio
%	-	Por cento
Mg/mL	-	Miligramas por mililitro
PCR	-	Reação em Cadeia da Polimerase
Pb	-	Pares de bases
μ g/mL	-	Microgramas por mililitro
VDS	-	Sistemas de vídeo documentação
X ²	-	Qui-quadrado
OR	-	Odds Ratio
IC	-	Intervalo de confiança
P	-	Probabilidade
\leq	-	Menor igual que
$>$	-	Maior que
SNP	-	Single Nucleotide Polymorphisms

RESUMO

Glaucoma primário de ângulo aberto (GPAA) é o tipo de glaucoma mais comum. O polimorfismo Arg-Pro (CGC para CCC) no exon 4 do codon 72 do gene *p53* afeta várias propriedades biológicas; recentemente foi publicado que este afeta a indução da apoptose *in vitro*. Vários genótipos têm sido associados significativamente ao GPAA. Nós analisamos a distribuição deste polimorfismo em 104 pacientes com GPAA e em 58 pessoas saudáveis sem história de glaucoma na Pronto Clínica de Olhos em Goiânia, Brasil. Os controles foram recrutados entre os indivíduos em acompanhamento oftalmológico. O polimorfismo do codon 72 do gene *p53* foi analisado no DNA genômico por PCR. O alelo Arg72 foi mais comum do que o alelo Pro72 em ambos os grupos. Não houve diferença significativa na distribuição do polimorfismo do codon 72 entre os grupos ($P=0.3311$). A distribuição de genótipo no grupo com GPAA foi de 23,07% homozigotos Arg, 75% heterozigotos e 1,93% homozigotos Pro, enquanto que no grupo controle foi de 31,04% homozigotos Arg, 68,96% heterozigotos e 0% homozigotos Pro. Concluímos que o polimorfismo do codon 72 Arg/Pro não está associado com o glaucoma em pacientes brasileiros.

Palavras Chave: glaucoma primário de ângulo aberto, polimorfismo do codon 72, gene *p53*.

1. Revisão Bibliográfica

Glaucoma

Pode ser definido como uma neuropatia óptica crônica, progressiva, caracterizada por alterações típicas no disco óptico e na camada de fibras nervosas da retina, com repercussões características no campo visual (Figura 01 e 02), podendo ou não ser acompanhados de pressão intra-ocular acima dos níveis considerados normais (Mello e Mandia Junior, 2005; Dias e Almeida, 2007).

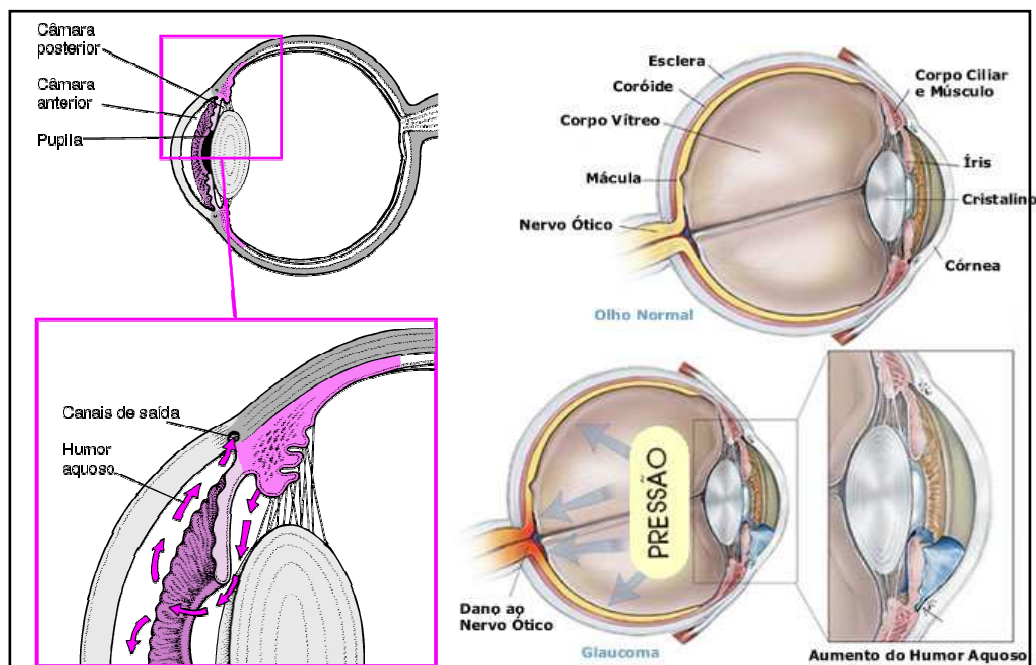


Figura 01. Esquema anatômico do globo ocular e fluxo do humor aquoso.

Fonte: Biblioteca virtual em saúde e Manual Merck

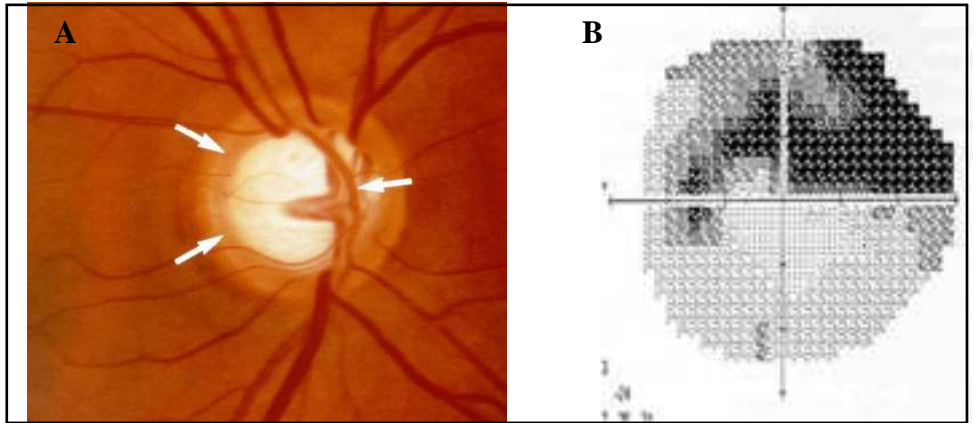


Figura 02. A) setas indicam a escavação glaucomatosa; B) campimetria com dano glaucomatoso.
 Fonte: Optical unettes e Nilson

O glaucoma pode ser classificado a partir do aspecto anatômico do seio camerular. O seio camerular compreende uma série de estruturas que inclui desde a íris periférica até a linha de Schwalbe (Figura 03).

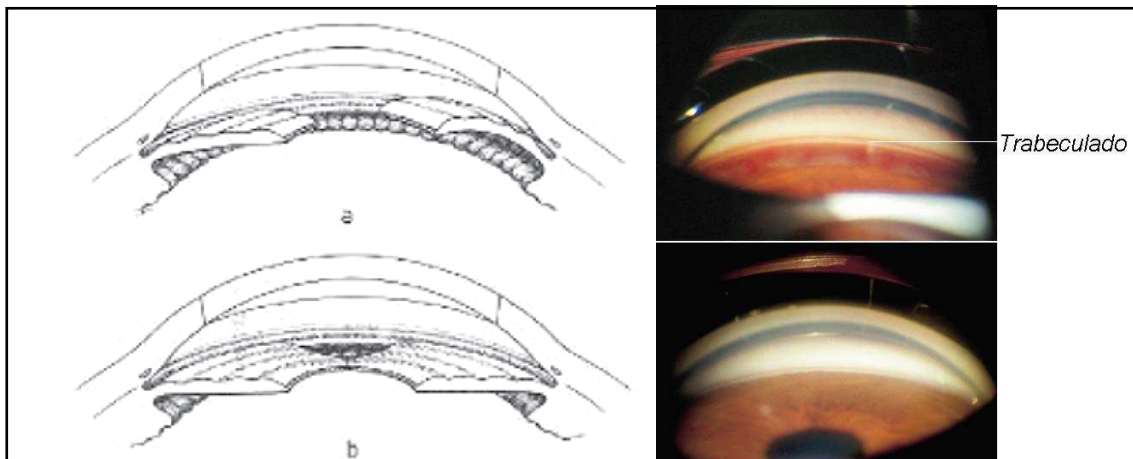


Figura 03. Esquema do seio camerular e foto visualizando o seio camerular.
 Fonte: Universo visual

A observação destas estruturas através da gonioscopia permite classificar o seio camerular em aberto, estreito ou fechado (Thylefors e Negrel, 1994). O glaucoma, portanto, pode ser denominado em: ângulo estreito ou aberto. Quando os mecanismos de ação envolvem condições oculares ou sistêmicas que resultem

na elevação da pressão intra-ocular é denominado secundário. O termo primário se restringe aos casos onde o mecanismo responsável pelo aumento da pressão intra-ocular não esteja estabelecido (Quigley e Broman, 2006).

O glaucoma é classificado em 04 grandes grupos para facilitar o entendimento de sua fisiopatologia e possível terapêutica específica (Stamper, 1999). Esses grupos são: 1) glaucoma primário de ângulo aberto (GPAA), de maior incidência, cerca de 60% dos casos; 2) glaucoma primário de ângulo estreito (GPAE) com 26,6% dos casos; 3) glaucoma combinado, exemplo: glaucoma secundário a catarata, uveíte, trauma ocular, fármaco, etc.; 4) glaucoma do desenvolvimento (congenito, juvenil, etc.), onde nestes casos ocorre uma anormalidade do segmento anterior dos olhos que se inicia no nascimento, com incidência de aproximadamente 1,3% dos casos (Stamper, 1999).

Alguns autores consideram que certas doenças como fatores de risco para o surgimento do glaucoma, tais como diabetes mellitus (DM) e hipertensão arterial sistêmica (HAS) [Sakata et al., 2000]. Além destas, outros fatores como a idade, miopia, raça, hereditariedade e alimentação também podem estar relacionadas ao desenvolvimento do glaucoma (Lin et al., 2002). A pressão intra-ocular (PIO) maior ou igual a 21mmHg é considerada o principal fator de risco para o desenvolvimento do glaucoma (Susanna, 1999). O tamanho da escavação do nervo óptico, configuração do seio camerular, facilidade de escoamento do humor aquoso e resposta aos corticóides, são, ao menos em parte, também influenciados pela hereditariedade (Dias e Almeida, 2007).

Epidemiologia

O glaucoma é a segunda causa de cegueira irreversível nos caucasianos e a primeira em negros. Atinge cerca de 70 milhões de pessoas em todo o mundo e 2,25 milhões de pessoas acima de 45 anos nos Estados Unidos (Quigley, 1996). No Brasil, cerca de 900 mil pessoas possuem glaucoma e destes, 720.000 são assintomáticos, muitos deles, necessitando ainda de confirmação diagnóstica (Quigley e Broman, 2006). Esse número pode ser ainda maior segundo estudos internacionais que indicam casos não diagnosticados, já que muitas pessoas nem sabem que possuem a doença (Ressiniotis et al., 2005).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), em torno de 80% da cegueira encontrada nos países em desenvolvimento podem ser prevenidos ou curados (Mello e Mandia Junior, 2005). Só o glaucoma corresponde a cerca de 13% da cegueira global (Quigley, 1996). Além do impacto na qualidade de vida, a perda da função visual tem um custo elevado para a sociedade.

A prevalência de GPAA varia entre 1,1% e 2,1% em indivíduos da raça branca sendo três a quatro vezes maior em negros (Klein et al., 1993; Dielemans et al., 1994).

Genética e Glaucoma

A evolução da genética médica permitiu determinar que as doenças podem apresentar um padrão de herança monogênico ou um padrão complexo de hereditariedade, envolvendo mais de um gene e fatores ambientais na determinação etiológica (herança poligênica multifatorial) [Griffths et al., 2006; Rim et al., 2006].

A oftalmologia e a genética estão historicamente associadas desde o início do século XX e recentemente, com o desenvolvimento da biologia molecular, vários pesquisadores têm procurado identificar genes associados às diversas doenças humanas. Assim, um grande número de afecções oculares já tem um gene determinado através do mapeamento genético (Raymond, 1997; Wiggs, 2007).

A Organização Mundial do Genoma Humano propôs uma classificação para os genes associados ao glaucoma contendo a sigla “GLC” (Stoilov et al., 2002; Fan et al., 2006). Os números “1”, “2” e “3” devem seguir a sigla geral para representar os glaucomas de ângulo aberto, ângulo estreito e congênito, respectivamente. Finalmente, as letras “A”, “B”, “C” e assim por diante, indicam o primeiro e os subseqüentes loci identificados para determinado tipo de glaucoma.

O GPAA é considerado atualmente uma doença de herança autossômica recessiva, poligênica e multifatorial (OMIM, 137760). O primeiro *locus* identificado como responsável pelo GPAA é conhecido com GLC1A e foi identificado no cromossomo 1q23-24 (Sheffield et al., 1993). Codifica uma proteína chamada miocilina (*trabecular meshwork induced glucocorticoid response protein – TIGR* ou *myocilin – MYOC*) presente na malha trabecular, corpo ciliar, retina e esclera

(Susanna, 1999; Chakrabarti et al., 2005; Kaur et al., 2005). Cerca de 23 *loci* já foram identificados e relacionados ao GPAA sendo que 14 já foram mapeados e nomeados em glaucoma 1A (GLC1A) a glaucoma 1N (GLC1N). A frequência de mutações nesse gene em indivíduos com glaucoma e historia familiar de glaucoma é de aproximadamente de 4,4% (Libby et al., 2005).

Alterações na seqüência do segundo gene de susceptibilidade ao glaucoma (*optineurin* – *OPTN*) identificado no cromossomo 10p15-p14 no *locus* GLC1E, foram observadas em 16,7% dos pacientes com GPAA (Sarfrazi et al., 1998; Rezaie et al., 2002). A proteína codificada por esse gene, parece interagir com outras proteínas durante o processo de apoptose das células ganglionares, particularmente com o fator de necrose tumoral alpha (TNF α). O gene WDR36 (*WD repeat domain 36*) foi mapeado no *locus* GLC1G no cromossomo 5q22.1, parece atuar na ativação do linfócito T, mas não se sabe a sua função principal (Monemi et al., 2005).

Mutações nesses genes têm sido associadas à GPAA, mas juntas, as diferentes mutações encontradas nestes genes, são responsáveis por um percentual pequeno dos casos (Forsman et al. 2003; Libby et al., 2003; Ray et al., 2003; Monemi et al., 2005; Pova et al., 2006).

Gene Supressor de Tumor *p53* e Glaucoma

Alguns estudos sugerem que a morte das células ganglionares da retina pode estar relacionada com doenças do nervo óptico devido ao mecanismo de apoptose (Acharya et al., 2002; Weinreb, 2007). Uma das fases para indução da via apoptótica é a ativação da proteína *p53* no ciclo celular, devido a um estresse sofrido pela célula. Pode haver uma alteração da concentração da *p53*, que resulta na ativação do mecanismo de reparo de mutações ou na eliminação da célula mutante por desencadear a indução a apoptose (Klumb et al., 2002).

O gene supressor de tumor *p53* encontra-se situado no braço curto do cromossomo 17p13.1, e tem como produto de transcrição uma fosfoproteína nuclear de 53 kilodaltons, denominada proteína *p53* em consequência do seu peso molecular (Figura 04). O gene possui 20Kb e é composto por 11 exons apresentando homologia estrutural entre diversas espécies (Almeida et al., 1999).

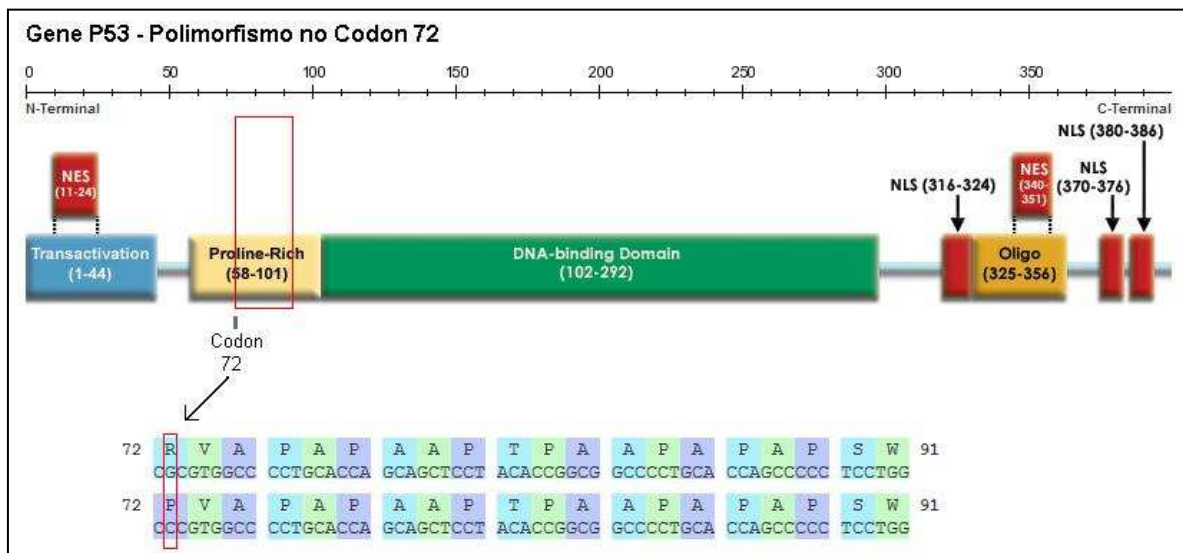


Figura 04. Esquema do gene e da proteína *p53* identificando o codon 72 onde ocorre o polimorfismo entre os aminoácidos prolina e arginina.

Fonte: P53 Knowledgebase

O gene *p53* é considerado um dos mais importantes genes reguladores da apoptose e o termo "guardião do genoma" atribuído à proteína *p53* é decorrente da

sua função como "policia molecular", monitorando a integridade do genoma e impedindo a proliferação de células com DNA mutado (Silva et al., 2003).

Em células normais, a apoptose ocorre através de uma cascata de eventos bioquímicos e morfológicos, podendo ser gerada por danos não reparados ao DNA antes que a célula entre na fase S. Mutações do gene *p53* resultam na transição de células danificadas da fase G1 para S. Se isso ocorrer, o genoma danificado é replicado e poderá ser passado para as células filhas. Várias respostas celulares após a ativação da *p53* têm sido descritas e a escolha da resposta depende de fatores tais como: tipo celular, ambiente celular e outras alterações oncogênicas (Klumb et al., 2002).

A discriminação entre apoptose e interrupção do ciclo celular depende da afinidade dos promotores gênicos e, promotores de genes de interrupção do ciclo celular como o *p21*, possuem sítios de união com a *p53* de alta afinidade, enquanto que promotores de genes apoptóticos como o *BAX*, contém sítios de união a *p53* de baixa afinidade. Isso explica que o aumento do nível ou atividade da *p53* podem levar à apoptose e que *p53* mutantes com conformação alterada ainda retém atividade suficiente para induzir a interrupção do ciclo celular, mas não a apoptose (Dimasi et al., 2005).

O gene *p53* apresenta um polimorfismo que resulta da substituição de um aminoácido arginina (CGC) por um prolina (CCC) na posição do codon 72 no exon 4 (Figura 05). Este polimorfismo ocorre no domínio rico em prolina, necessário para a indução da apoptose. Além disso, observa-se que a variante *p53Arg* induz a apoptose mais eficientemente que *p53Pro*, indicando que as duas variantes são funcionalmente distintas (Dumont et al., 2003).

As formas p53Arg e p53Pro são indutoras de apoptose em níveis iguais, mas p53Arg é considerada mais eficiente por ter uma cinética de morte celular mais rápida. Com relação à ativação transcricional, p53Pro tem ação duas vezes maior que p53Arg, o que pode ser justificado pelos níveis significativamente maiores de união com os fatores de transcrição (Dumont et al., 2003).

Vários estudos demonstraram que as células glanglionares da retina morrem durante o desenvolvimento como resultado de doenças que afetam o nervo óptico induzidas pela via apoptótica (Lin et al., 2002). Alguns trabalhos sugerem que a mudança estrutural da proteína p53 no codon 72, pode estar associada a uma neuropatia glaucomatosa em determinadas populações (Lin et al., 2002; Dimasi et al., 2005).

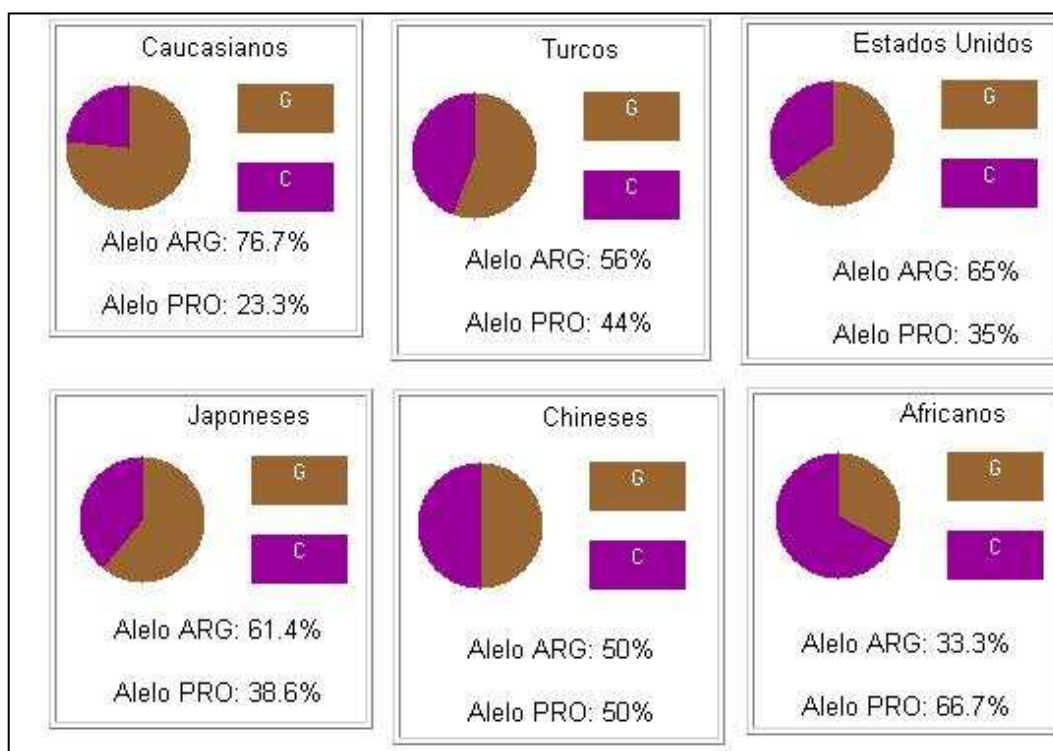


Figura 05. Distribuição do polimorfismo no codon 72 entre diversas populações estudadas.

Fonte: P53 Knowledgebase

2. Justificativa

O Ministério da Saúde ainda não reconhece a genética em sua rede de cobertura e infelizmente, a genética ainda é muito elitizada, já que não está incluída no Sistema Único de Saúde (SUS). O poder público reconhece a importância da saúde ocular e já participou ativamente de ações ligadas à prevenção, mas o diagnóstico precoce diminui o ônus e a responsabilidade do Estado com os anos de tratamento.

Entre os fatores que contribuem para a constatação de números superlativos está a dificuldade na detecção do glaucoma antes de um estágio avançado, já que a doença é assintomática. Quando se percebe, restam poucos passos para a dura realidade da cegueira e a maior preocupação é que como a presença do glaucoma está diretamente ligada à idade, a tendência é de um aumento significativo no número de portadores da doença no país, já que é fato que a população brasileira tem envelhecido mais tardiamente.

Este trabalho tenta esclarecer as possíveis alterações genéticas através da biologia molecular na doença denominada glaucoma primário de ângulo aberto. O esclarecimento do glaucoma em seu nível molecular poderá auxiliar o possível desenvolvimento de novas técnicas diagnósticas e/ou terapêuticas. Com isto poderá influenciar no prognóstico da doença e conseqüentemente evitar um grande impacto sócio econômico na população em geral.

3. Objetivo

Analisar o polimorfismo no codon 72 do gene *p53* em pacientes portadores de glaucoma primário de ângulo aberto atendido em Goiânia – GO.

Objetivos Específicos

- Detectar o polimorfismo do codon 72 do gene *p53* nas amostras analisadas;
- Identificar a frequência alélica do polimorfismo do codon 72 do gene *p53*;
- Relacionar o genótipo do codon 72 do gene *p53* ao glaucoma.

Primary open angle glaucoma was not found to be associated with *p53* codon 72 polymorphism in a Brazilian cohort

R.E. Silva^{1,2*}, J.T. Arruda^{3*}, F.W. Rodrigues^{1,2} and K.K.V.O. Moura^{2,3}

¹Pronto Clínica de Olhos, Goiânia, GO, Brasil

²Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*, Mestrado em Genética, Goiânia, GO, Brasil

³Departamento de Biologia, Universidade Católica de Goiás, Núcleo de Pesquisas Replicon, Goiânia, GO, Brasil

*These authors contributed equally to this study.

Corresponding author: K.K.V.O. Moura

E-mail: katiakarinarav@yahoo.com.br; jalsitacon@yahoo.com.br

Genet. Mol. Res. 8 (1): 268-272 (2009)

Received December 23, 2008

Accepted January 6, 2009

Published March 3, 2009

ABSTRACT. Primary open angle glaucoma (POAG) is the most common type of glaucoma. The *p53* codon 72 Arg-Pro (CGC to CCC) polymorphism of exon 4 affects various biological properties; recently, it was reported that this polymorphism affects the ability to induce apoptosis *in vitro*. Various genotypes have been found to be significantly associated with POAG. We examined the distribution of this polymorphism in 104 unrelated POAG patients and in 58 normal healthy individuals without history of POAG at the Pronto Clínica de Olhos in Goiânia, Brazil. The controls were recruited among individuals undergoing ophthalmological examination. Their genomic DNA was analyzed for *p53* gene codon 72 polymorphism by polymerase chain reaction. The Arg72 allele was more common than the Pro72 allele in both groups. There was no significant difference in the distribution of the codon 72 polymorphism between groups ($p= 0.3311$). The genotype distribution in the POAG group was 23.07 Arg homozygote, 75 heterozygote, and 1.93% Pro homozygote, while in the control group it was 31.04 Arg homozygote, 68.96 heterozygote,

Genetics and Molecular Research 8 (1): 268-272 (2009)

©FUNPEC-RP www.funpecrp.com.br

and 0% Pro homozygote. We concluded that the *p53* codon 72 Arg/Pro polymorphism is not associated with glaucoma in Brazilian patients.

Key words: Primary open angle glaucoma;
p53 codon 72 polymorphism

INTRODUCTION

Glaucoma is an optic neurodegenerative disease and is the second leading cause of bilateral blindness worldwide, after cataracts (Povoa et al., 2006). Primary open angle glaucoma (POAG) is the most common type, accounting for over half of all cases (Acharya et al., 2002). It is characterized by progressive excavation of the optic disc, frequently associated with loss of retinal nerve fibers, leading to visual field defects (Weinreb and Khaw, 2004); however, the initial development of this disease is not yet completely understood. It is possible that genetic alterations could be responsible for the initiation of a sequence of events that lead to higher resistance in aqueous humor drainage, as well as higher optic disc head susceptibility to intraocular pressure.

The major risk factors for POAG include a family history of this disease, high intraocular pressure, advanced age, certain ethnic groups, diabetes mellitus, impaired vascular function, and interaction of multiple genes (Morrison et al., 2005). This disease has been identified as one of the most important causes of irreversible vision loss, especially in African-Americans, in whom it is responsible for up to 19% of blindness in adults over 40 years of age (Povoa et al., 2006). Approximately half of POAG patients have a family history of glaucoma; early detection of disease is critical for avoiding glaucomatous damage and for minimizing irreversible vision loss (Vegini et al., 2008).

The tumor suppressor gene *p53* is a single copy gene located on the short arm of chromosome 17p13.1 (Storey et al., 1998). It consists of 11 exons, resulting in a 2629-bp transcript and a 393-amino acid protein. It is considered to be the guardian of the genome and is essential for the preservation of genome integrity. In response to DNA damage, the *p53* gene may arrest cell cycle progression in the late G1 phase, thus allowing the DNA to be repaired before its replication; if the damage is too extensive to be repaired it induces apoptosis by upregulating the pro-apoptotic gene *Bax* and downregulating the expression of the antiapoptotic gene *Bcl-2* (Ressiniotis et al., 2005).

The *p53* codon 72 Arg-Pro (CGC to CCC) polymorphism of exon 4 (National Center for Biotechnology Information single-nucleotide polymorphism identification number rs1042522; Matlashewski et al., 1987) has been shown to affect biological properties; recently, it was found that this polymorphism alters the ability to induce apoptosis *in vitro* (Tsai et al., 2004). It has been proposed that genomic instability of *p53* gene in other disease processes means that it also has a role in glaucomatous neuropathy (Dimasi et al., 2005).

The *p53* gene has been subject to many epidemiological studies that explore the possible association of this polymorphism with risk of different diseases; however, the results have remained inconclusive and the major risk factors for glaucoma are still the ethnicity of the population (Dimasi et al., 2005; Vegini et al., 2008). We examined polymorphism in exon 4 of the *p53* gene in Brazilian POAG patients and in a control group.

MATERIAL AND METHODS

Study population

Blood samples were collected from 104 unrelated Brazilian POAG patients from the Pronto Clínica de Olhos in Goiânia. As a control, 58 normal healthy individuals without history of POAG were chosen among other patients attended at the same clinic. All patients were given an ophthalmologic examination, which included intraocular pressure, visual acuity, automated perimetry, gonioscopy, optic disc examination, and retinal examination. Prior to sample collection, written informed consent was obtained from all individuals. The internal review committee on research using human subjects cleared the project after due deliberations.

Molecular analysis

The genomic DNA was extracted from peripheral blood with the IllustratTM Blood Genomic DNA kit (GE HealthCare, USA). In the analysis of the *p53* gene codon 72 polymorphism, the primer Pro-72 (F-5' GCC AGA GGC TGC TCC CCC -3' and R-5' ATC TAC AGT CCC CCT TGC CG -3') was designed for *p53* codon 72 in the proline form and Arg-72 (F-5' CTG GTG CAG GGG CCA CGC -3' and R-5' CGT GCA AGT CAC AGA CTT -3') in the arginine form, according to the procedure described by Storey et al. (1998). PCR were carried out based on Lin et al. (2002). The PCR products were loaded on 2% agarose gel containing ethidium bromide for electrophoresis. After electrophoresis, the gels were stained with ethidium bromide and photographed under UV light (Figure 1).

Statistical analysis for the relative risk of *p53* codon 72 in control and POAG groups was compared using the χ^2 test. Results were considered to be significant when the probability of findings occurring by chance was less than 5% ($p < 0.05$).

Figure 1. Detection of the *p53* codon 72 polymorphism on a 2% agarose gel with ethidium bromide after polymerase chain reaction amplification. M = molecular weight marker, 50-bp DNA ladder (Invitrogen). Lane 1 = Arg-Arg homozygote; lane 2 = Arg-Pro heterozygote, and lane 3 = Pro-Pro homozygote. The Arg allele: 141 bp and the Pro allele: 177 bp. **271** ©FUNPEC-RP www.funpecrp.com.br Genetics and Molecular Research 8 (1): 268-272 (2009) *p53* codon 72 polymorphism in glaucoma

RESULTS

The 104 POAG patients ranged in age from 13 to 87 years (mean 60.23 years old) and were unrelated. There were 50 females and 54 males. The 58 volunteers ranged in age from 18 to 77 years (mean age 44.95 years old) and were free from any ophthalmic diseases. There were 36 females and 22 males.

The Arg72 allele was more common than the Pro72 allele in each group (Table 1). The distribution of the codon 72 polymorphism was not significantly different between groups ($p=0.3311$).

DISCUSSION

One of the most well-studied *p53* gene polymorphisms is *Arg72Pro*, which affects the structure of the protein. The *p53* gene plays an important role in cell cycle control and can act as a transcription factor by binding to a *p53*-specific DNA consensus sequence in responsive genes (Tsai et al., 2004). The mutant or inactivated *p53* protein fails to initiate the apoptotic process; consequently the cells proliferate in an uncontrolled manner (Weishaupt et al., 2003). In contrast, in neurodegenerative processes (Funayama et al., 2004) and toxic neuronal injury, the *p53* gene is up-regulated in response to cellular stress, thereby promoting cell death through apoptosis. This raises the possibility that functional genetic variants of *p53* protein influence the rate of neuronal cell loss in a number of neurodegenerative disorders, including POAG (Levkovitch-Verbin et al., 2006).

These two variant protein forms may behave differently. The Pro allele is associated with increased transcription of *p53* target genes via greater binding to transcriptional machinery and thus shows higher rates of G_1 arrest than the Arg allele (Pim and Banks, 2004). In contrast, the Pro allele is less efficient in suppressing transformation (likely due to reduced apoptotic potential) than the Arg allele (Dumont et al., 2003). The Arg allele increases the ability of *p53* to locate to mitochondria and induces cellular death, whereas the Pro allele exhibits a lower apoptotic potential and increases cellular arrest at G_1 of the cell cycle (Bergamaschi et al., 2006).

We did not observe any significant difference in the distribution of the *p53* codon 72 polymorphism between the control group and POAG patients. Lin et al. (2002) analyzed 58 Chinese patients with POAG and found that the Pro72 polymorphism was significantly more common in patients than in controls ($p=0.00782$). In 67 cases of POAG in India, Acharya et al. (2002) found no association with glaucoma with codon 72 or intron 3 16-bp duplication polymorphisms ($p=0.5627$). Ressiniotis et al. (2004) studied these same polymorphisms in 140 British POAG patients; they observed a significant difference in the *p53* haplotype distribution ($p<0.0001$). Arginine at codon 72 was significantly more common in patients than controls.

Table 1. Genotype distribution and allelic frequencies of *p53* codon 72 polymorphism in primary open angle glaucoma patients (POAG) and controls.

Group Genotype Allele frequency

Arg-Arg Arg-Pro Pro-Pro Number of individuals ARG PRO Number of alleles

POAG 23.1% 75% 1.9% 104 60.5% 39.5% 208

Control 31% 69% 0% 58 65.5% 34.5% 116

272 ©FUNPEC-RP www.funpecrp.com.br Genetics and Molecular Research 8 (1): 268-272 (2009) R.E. Silva et al.

Dimasi et al. (2005) analyzed 345 Australians with POAG for the same polymorphisms and found no evidence for Hardy-Weinberg disequilibrium of *p53* gene haplotypes between groups ($p=0.35$). These different findings may be due to racial variation or may reflect sample bias.

The *p53* codon 72 Arg/Pro polymorphism was not found to be associated with glaucoma in Brazilian patients.

Acknowledgments

Research supported by Universidade Católica de Goiás, Goiânia, Brazil (UCG/PROPE/MGene). We are grateful to the Pronto Clínica de Olhos for allowing us to conduct this research and for support. J.T. Arruda was the recipient of a Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) fellowship.

REFERENCES

- Acharya M, Mitra S, Mukhopadhyay A, Khan M, et al. (2002). Distribution of *p53* codon 72 polymorphism in Indian primary open angle glaucoma patients. *Mol. Vis.* 8: 367-371.
- Bergamaschi D, Samuels Y, Sullivan A, Zvelebil M, et al. (2006). iASPP preferentially binds *p53* proline-rich region and modulates apoptotic function of codon 72-polymorphic *p53*. *Nat. Genet.* 38: 1133-1141.
- Dimasi DP, Hewitt AW, Green CM, Mackey DA, et al. (2005). Lack of association of *p53* polymorphisms and haplotypes in high and normal tension open angle glaucoma. *J. Med. Genet.* 42: e55.
- Dumont P, Leu JI, Della PA III, George DL, et al. (2003). The codon 72 polymorphic variants of *p53* have markedly different apoptotic potential. *Nat. Genet.* 33: 357-365.
- Funayama T, Ishikawa K, Ohtake Y, Tanino T, et al. (2004). Variants in optineurin gene and their association with tumor necrosis factor- α polymorphisms in Japanese patients with glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45: 4359-4367.
- Levkovitch-Verbin H, Dardik R, Vander S, Nisgav Y, et al. (2006). Experimental glaucoma and optic nerve transection induce simultaneous upregulation of proapoptotic and prosurvival genes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47: 2491-2497.
- Lin HJ, Chen WC, Tsai FJ and Tsai SW (2002). Distributions of *p53* codon 72 polymorphism in primary open angle glaucoma. *Br. J. Ophthalmol.* 86: 767-770.
- Matlashewski GJ, Tuck S, Pim D, Lamb P, et al. (1987). Primary structure polymorphism at amino acid residue 72 of human *p53*. *Mol. Cell Biol.* 7: 961-963.
- Morrison JC, Johnson EC, Cepurna W and Jia L (2005). Understanding mechanisms of pressure-induced optic nerve damage. *Prog. Retin. Eye Res.* 24: 217-240.
- Pim D and Banks L (2004). *p53* polymorphic variants at codon 72 exert different effects on cell cycle progression. *Int. J. Cancer* 108: 196-199.
- Povoa CA, Malta RF, Rezende MM, de Melo KF, et al. (2006). Correlation between genotype and phenotype in primary open angle glaucoma of Brazilian families with mutations in exon 3 of the TIGR/MYOC gene. *Arq. Bras. Oftalmol.* 69: 289-297.
- Ressiniotis T, Griffiths PG, Birch M, Keers S, et al. (2004). Primary open angle glaucoma is associated with a specific *p53* gene haplotype. *J. Med. Genet.* 41: 296-298.
- Ressiniotis T, Griffiths PG, Keers SM, Chinnery PF, et al. (2005). A polymorphism at codon 31 of gene *p21* is not associated with primary open angle glaucoma in Caucasians. *BMC Ophthalmol.* 5: 5.
- Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, et al. (1998). Role of a *p53* polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature* 393: 229-234.
- Tsai FJ, Lin HJ, Chen WC, Tsai CH, et al. (2004). A codon 31ser-arg polymorphism of the WAF-1/CIP-1/*p21*/tumour suppressor gene in Chinese primary open-angle glaucoma. *Acta Ophthalmol. Scand.* 82: 76-80.
- Vegini F, Figueiroa FN, Lenci RF, Garcia ND, et al. (2008). Prevalence of open angle glaucoma in accompanying first degree relatives of patients with glaucoma. *Clinics* 63: 329-332.
- Weinreb RN and Khaw PT (2004). Primary open-angle glaucoma. *Lancet* 363: 1711-1720.
- Weishaupt JH, Diem R, Kermer P, Krajewski S, et al. (2003). Contribution of caspase-8 to apoptosis of axotomized rat retinal ganglion cells *in vivo*. *Neurobiol. Dis.* 13: 124-135.

4. Conclusão

Não foi observada nenhuma correlação estatisticamente significativa entre o polimorfismo do codon 72 no gene *p53*.

Nos dois únicos casos de genótipo homocigoto Pro-Pro, observou-se uma maior agressividade do glaucoma.

5. Referências Bibliográficas

1. Acharya M, Mitra S, Mukhopadhyay A, Khanet M, et al. (2002). Distribution of codon 72 polymorphism in Indian primary open angle glaucoma patients. *Mol Vis.* 8: 367-371.
2. Almeida JD, Moraes E, Carvalho YR, Arisawa EAL. (1999). Expressão do gene p53 no carcinoma bucal. *Rev Facul Odontol.* 2(2).
3. Biblioteca virtual em saúde. Disponível em: <http://www.hosb.com.br/especial/glaucoma002.jpg> Acesso em: 22/11/2008.
4. BioEstat. Software de BioEstatística versão 5. (2008). Disponível em <http://www.mamiraua.org.br/download/>. Acesso em 02/10/2008.
5. Chakrabarti S, Kaur K, Komatireddy S, Acharya M, et al. (2005). Gln48His is the prevalent myocilin mutation in primary open angle and primary congenital glaucoma phenotypes in India. *Mol Vis.* 11: 111-113
6. Dias JFP, Almeida HG. Glaucoma. (2007). 2ª edição. Ed. Cultura médica, Rio de Janeiro.
7. Dielemans I, Vingerling JR, Wolfs RC, Hofman A, et al. (1994). The prevalence of primary open-angle glaucoma in a population-based study in The Netherlands. The Rotterdam Study. *Ophthalmology.* 101(11): 1851-1855.

8. Dimasi DP, Hewitt AW, Green CM, Mackey DA, et al. (2005). Lack of association of p53 polymorphisms and haplotypes in high and normal tension open angle. *J Med Genetics*. 42: e55.
9. Dumont P, Leu JI, Della Pietra AC III, George DL, et al. (2003). The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat. Genet*. 33: 357-365.
10. Fan BJ, Wang DY, Lam DS, Pang CP. (2006). Gene mapping for primary open angle glaucoma. *Clin Biochem*. 39(3): 249-258.
11. Forsman E, Lemmelä S, Varilo T, Kristo P, et al. (2003). The role of TIGR and OPTN in finnish glaucoma families: a clinical and molecular genetic study. *Mol Vis*. 9: 217-222.
12. Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, et al. (2006). Genética e diferenciação celular, In: Introdução à genética. Ed. Guanabara Koogan, 8ª edição, Rio de Janeiro, 179-309.
13. Kaur K, Reddy AB, Mukhopadhyay A, Mandal AK, et al. (2005). Myocilin gene implicated in primary congenital glaucoma. *Clin Genet*. 67(4): 335-340.
14. Klein BEK, Klein R, Meuer SM, Goetz LA. (1993). Migraine headache and its association with open-angle glaucoma: the Beaver Dam Eye Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 34(10): 3024-3027.
15. Klumb CE, Cavalcanti Júnior GB. (2002). Avaliação dos métodos de detecção das alterações do gene e proteína p53 nas neoplasias linfóides. *Rev Bras Hematol Hemot*. 24(2): 111-115.

- 16.** Libby RT, Gould DB, Anderson MG, John SWM. (2005). Complex Genetics of Glaucoma Susceptibility. *Annug Rev Genomics Hum Genet.* 6: 15-44.
- 17.** Libby RT, Smith RS, Savinova OV, Zabaleta A, et al. (2003). Modification of ocular defects in mouse developmental glaucoma models by tyrosinase. *Science.* 299(5612): 1527-1528.
- 18.** Lin HJ, Chen WC, Tsai FJ, Tsai SW. (2002). Distributions of p53 codon 72 polymorphism in primary open angle glaucoma. *Br J Ophthalmol.* 86: 767-770.
- 19.** Manual Merck. Disponível em: <http://www.manualmerck.net> Acesso em: 21/11/2008.
- 20.** Mello PAA, Mandia Júnior C. (2005). Segundo Consenso Brasileiro de Glaucoma Primário de ângulo Aberto. Ed. PlanMark.
- 21.** Monemi S, Spaeth G, DaSilva A, Popinchalk S, et al. (2005). Identification of a novel adult-onset primary open-angle glaucoma (POAG) gene on 5q22.1. *Hum Mol Genet.* 14(6): 725-33.
- 22.** Nilson. Disponível em: www.drnilson.com.br/upload/6obd7p2fty_glau3.gif Acesso em: 22/11/2008.
- 23.** OMIM, 137760. Disponível em: http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?omim+137760 Acesso em: 24/11/2008.
- 24.** Optical Unettes. Disponível em: <http://www.opticalunettes.com.br/imagens/glaucoma1.jpg&imgrefurl> Acesso em: 20/11/2008.

- 25.** P53 Knowledgebase. Disponível em: <http://p53.bii.a-star.edu.sg/aboutp53/snps/snpdetail.php?geneid=X54156&snppos=12139>
Acesso em: 24/11/2008.
- 26.** Pova CA, Malta RFS, Rezende MM, Melo KFS, et al. (2006). Correlation between genotype and phenotype in primary open glaucoma of Brazilian families with mutations in exon 3 of the TIGR/MYOC gene. *Arq Bras Oftalmol.* 69(3): 289-297.
- 27.** Quigley HA, Broman AT. (2006). The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br J Ophthalmol.* 90: 262-267.
- 28.** Quigley HA. (1996). Number of people with glaucoma worldwide. *Br J Ophthalmol.* 80: 389-393.
- 29.** Ray K, Mukhopadhyay A, Acharya M. (2003). Recent advances in molecular genetics of glaucoma. *Mol Cell Biochem.* 253(1-2): 223-231.
- 30.** Raymond V. (1997). Molecular genetics of the glaucomas: mapping of first five "GLC" loci. *Am J Hum Genet.* 60(2): 272-277.
- 31.** Ressiniotis T, Griffiths PG, Birch M, Kerrs S, et al. (2004). Primary open angle glaucoma is associated with a specific p53 gene haplotype. *J Med Genet.* 41: 296-298.
- 32.** Ressiniotis T, Griffiths PG, Keers SM, Chinnery PF, et al. (2005). A polymorphism at codon 31 of gene p21 is not associated within primary open angle glaucoma in Caucasians. *BMC ophthalmol.* ; 5(5): 01-04 .

- 33.**Rezaie T, Child A, Hitchings R, Brice G, et al. (2002). Adult-onset primary open-angle glaucoma caused by mutations in optineurin. *Science*. 295: 1077-1079.
- 34.**Rim PHH, Magna LA, Ramalho AS. (2006). Genetics and prevention of blindness. *Arq Bras oftalmol*. 69(4): 481-485.
- 35.**Sakata K, Scapucin L, Sakata LM, Carvalho ACA, et al. (2000). Projeto glaucoma – resultados parciais 2000 na região de Piraquara – PR. *Arq Bras Oftalmol*. 63(3): 333-337.
- 36.**Sarfarazi M, Child A, Stoilova D, Brice G, et al. (1998). Localization of the fourth locus (GLC1E) for adult-onset primary open-angle glaucoma to the 10p15-p14 region. *Am J Hum Genet*. 62: 641-52.
- 37.**Sheffield VC, Stone EM, Alward WL, Drack AV, et al. (1993). Genetic linkage of familial open angle glaucoma to chromosome 1q21-q31. *Nat Genet*. 4(1): 47-50.
- 38.**Silva AMTC, Amaral MVT, da Cruz AD. (2003). HPV e Câncer: O Papel do Papiloma Vírus Humano na Carcinogênese. *Biotec Ciên Desenvol*. (29): 48-54.
- 39.**Stamper LR, Lieberman MF, Drake MV. (1999). Diagnosis and therapy of the glaucomas. Ed. Mosby 7 edition, 01-191.
- 40.**Stoilov IR, Costa VP, Vasconcellos JP, Melo MB, et al. (2002). Molecular genetics of primary congenital glaucoma in Brazil. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 43: 1820-1827.

41. Susanna Júnior R. (1999). Glaucoma – Conselho Brasileiro de Oftalmologia. Ed. Cultura Médica, 01-29.
42. Thylefors B, Negrel AD. (1994). The global impact of glaucoma. *Bull World Health Organ.* 72(3): 323-326.
43. Universo Visual. Disponível em: www.universovisual.com.br/publisher/0107/img/glaucoma/0416_0417.jpg&imgrefure Acesso em: 23/11/2008.
44. Weinreb RN. (2007). Glaucoma neuroprotection: What is it? Why is it? *Can J Ophthalmol.* 42: 396-398.
45. Wiggs JL. (2007). Genetics etiologies of glaucoma. *Arch Ophthalmol.* 125(1): 30-37.