



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
SECRETARÍA DE SALUD

INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA HUMANA

ANÁLISIS MOLECULAR DEL GEN *PAX6* CON ALTERACIONES OCULARES COMPATIBLES CON DISGENESIAS DE SEGMENTO ANTERIOR.

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
ESPECIALISTA EN GENÉTICA MÉDICA

PRESENTA:

DRA. KARLA LOURDES ROBLES LÓPEZ

TUTOR DE TESIS:

DRA. ARIADNA GONZÁLEZ DEL ÁNGEL

COTUTOR DE TESIS:

DRA. CRISTINA VILLANUEVA MENDOZA



MÉXICO, D. F.

**Análisis molecular del gen *PAX6* en pacientes con alteraciones
oculares compatibles con disgenesias de segmento anterior.**

TUTOR DE TESIS:	Dra. en C. Ariadna Estela González del Ángel Subdirectora de Investigación Médica
COTUTOR DE TESIS:	Dra. Cristina Villanueva Mendoza Médico Adscrito de Genética. Asociación para Evitar la Ceguera (APEC)
Investigador responsable del proyecto	Dr. en C. Miguel Ángel Alcántara Ortigoza Jefe de Laboratorio de Biología Molecular INP
Investigador del Laboratorio de Biología Molecular INP	M. en C. Rehotbevely Barrientos Ríos
Investigador del Laboratorio de Biología Molecular INP	M. en C. Nancy Leticia Hernández Martínez
Laboratorio de Biología Molecular INP	Técnico Mario Díaz Morales
Tesista para obtener el grado de especialista en Genética Médica	Dra. Karla Lourdes Robles López

Análisis molecular del gen *PAX6* en pacientes con alteraciones
oculares compatibles con disgenesias de segmento anterior



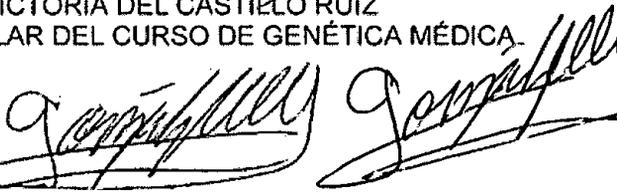
DRA. ROSAURA ROSAS VARGAS
SUBDIRECTORA DE ENSEÑANZA



DRA MIRELLA VÁZQUEZ RIVERA
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PRE Y POSGRADO



DRA. VICTORIA DEL CASTILLO RUIZ
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE GENÉTICA MÉDICA



DRA. ARIADNA E. GONZÁLEZ DEL (ANGEL)
TUTOR DE TESIS



DRA. CRISTINA VILLANUEVA MENDOZA
COTUTOR DE TESIS

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ari por haber sido parte de este gran logro y muchos anteriores a este, por sus enseñanzas, su gran Amistad, su incondicional apoyo y preocupación en cada paso de mi vida profesional, así como por los errores marcados ya que de ellos son de los que más aprendí. Al Dr. Miguel por siempre escucharme y siempre darme el consejo y el apoyo adecuados, por haberme explicado y enseñando durante la realización de este trabajo.

A la Dra. Villanueva por su apoyo tanto teórico como moral durante la realización de este trabajo.

A la Dra. del Castillo por haberse arriesgado y aceptar al 4º mosquetero en la residencia cuando nadie más lo hizo, por haberse preocupado por la formación y bienestar de cada uno de nosotros, por los regaños y las felicitaciones.

Al Dr. Camilo, la Dra. Lieberman y Emiy por siempre estar ahí para todos nosotros enseñarnos lo mejor de sí, tanto en conocimiento como sapiencia.

A la Dra. Sara, Paty y Bertha por ser tan buenas y grandiosas maestras, por sus enseñanzas y su eterna e incondicional disposición... todo un ejemplo a seguir. A Lucesita, Oscar, Sara Pao, Mary Paz, Armando, Chivis, David, Carlitos, Chelo, Vero, Rob, Alex, Pili, Juls, Eunice, Charles, Víctor, Cesy, Arturo, Lety, Sra. Ara, Normita y Mario, por explicarnos, por esperarnos, por aguantarnos, por comprendernos, por divertirnos, por su gran temple y por enseñarnos sin esperar nunca nada a cambio.

A la Dra. Vidal y Olguita por su inigualable Amistad, por su grandioso corazón, por ser grandes ídolos a seguir, por su sencillez y calidez... gracias por el apoyo durante esos difíciles momentos.

A mis adorados compañeros de esta única y gran jornada. David y Rosa desde algún tiempo atrás, nunca pensé encontrar amigos y colegas tan dedicados y comprometidos, siempre apoyando a quien más lo necesitó, simplemente no existen palabras con las que pueda terminar de agradecerles. A Berna, Astrid, Benilde, Paola, Alma, Xime, Lili, Vianey, Majo y Alejandro por su excelente compañía, grandes enseñanzas y por ser perfectos compañeros.

A grandes amigos que hallé en el tramo del camino, gracias Pepillo por haber sido más que un amigo, más que un maestro, más que un compañero, simplemente eres Grandioso!. Nancy: gracias por darme esa seguridad y la chispa adecuada, así por esa peculiar y gran Amistad. Rehot: por todos esos momentos que pasamos de alegría, diversion y de enseñanza una junto a la otra. Chío: mi queridísima maestra, quién me enseñó y seguirá enseñando no solo Genética. Alf, eres simplemente un ser muy especial que llegó a mi vida para quedarse, quien me recuerda cada día que las personas valiosas como tú aún existen, a Ledita por ese apoyo en el último tramo del camino. A Tenshi, Hugo, Eri, Mine, Vic, Lolita, Perla y Jorge por ese último empujón y hacerme ver quién soy y lo mucho que puedo lograr.

A mi grandiosa familia, mi adorados padre y madre, quienes siempre me apoyaron, siempre me acompañaron y se esforzaron por entenderme y facilitarme el largo y duro camino. Mi germanita por ser tan única y especial, ese grado de amor y altruismo que ha demostrado como nadie más, mi Karensita por ser una niña tan sabia, divertida y por quererme siempre, Kari por ser tan lista y amable, a Carlos por haberme impulsado a seguir viviendo y seguir todos mis sueños, a mi hermano Victor, tío Manuel, Margarita, Estela y el resto de mi familia por la confianza y la ayuda.

Gracias a la vida y a todas aquellas personas que confían y procuran día a día perpetuar el arte de la enseñanza y sembrar la semilla del conocimiento en cada uno de sus discípulos que desean mejorar día a día el don del conocimiento otorgado y que pretenden en un futuro aportar nuevas ideas al campo del conocimiento y la sabiduría. Por mis familiares que nunca dejaron de creer en mi, apoyándome y recorfortándome a cada paso y caída. A todos aquellos por su dedicación, paciencia, confianza y perseverancia.

ÍNDICE

RESUMEN ESTRUCTURADO	1
ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO	3
JUSTIFICACIÓN	29
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	30
OBJETIVOS	30
HIPÓTESIS	31
MATERIAL Y MÉTODOS	32
DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO	33
TAMAÑO DE LA MUESTRA	40
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	44
CONSIDERACIONES ÉTICAS	44
RESULTADOS	46
DISCUSIÓN	57
CONCLUSIONES	65
ANEXOS	67
BIBLIOGRAFÍA	81

RESUMEN ESTRUCTURADO

Las disgenesias de cámara anterior son alteraciones del desarrollo ocular las cuales son: glaucoma congénito, aniridia, anomalía de Axenfeld-Rieger y anomalía de Peters. En estas entidades se afectan las estructuras situadas por delante de la cara anterior del vítreo, que incluye: cuerpo ciliar, cristalino, iris y córnea además de que presentan un alto riesgo de presentar glaucoma de ángulo abierto. *PAX6* es un gen del desarrollo temprano, el cual se expresa principalmente en un inicio en el tejido ocular, vesícula óptica en desarrollo y cristalino y posteriormente controlando la diferenciación de epitelio pigmentario retiniano. Se conoce que mutaciones en este gen pueden causar patologías que involucran el segmento anterior y posterior del ojo; así como en sistema nervioso central. En humanos, mutaciones de *PAX6* se asocian a una variedad de anomalías oculares. En el presente trabajo se analizó el gen *PAX6* en pacientes con disgenesia de cámara anterior para identificar la mutación responsable de la patología ocular.

Material y Métodos: Se incluyeron 16 pacientes en quienes se realizó historia clínica con árbol genealógico y exploración física, se obtuvo DNA de sangre periférica por precipitación salina. La búsqueda de mutaciones se realizó mediante amplificación en cadena de la polimerasa de los 13 exones del gen *PAX6*, análisis mediante SSCP y secuenciación automática.

Resultados: En los 16 pacientes la edad promedio de los pacientes al momento del estudio fue de 6.77 años, 8 corresponden al sexo femenino y 8 al sexo masculino. Los casos estudiados se dividieron en 4 grupos: 8 presentaban aniridia, 2 glaucoma congénito, 2 anomalía de Peters y 4 patología combinada, No se capturaron pacientes en el grupo de anomalía de

Axenfeld-Rieger. Del total de casos analizados se revisaron en 8/16 a ambos padres y en 3/16 únicamente a la madre, únicamente se identificó 1 caso familiar. Se identificaron 2 mutaciones patológicas en los exones 6 y 8 responsables de aniridia y 2 polimorfismos en los intrones 2 y 9, todos previamente reportados en la literatura. No se encontraron casos familiares con mutación identificada.

Conclusiones: El gen *PAX6* fue el primer gen candidato responsable del grupo de disgenesias de segmento anterior y el único gen causal relacionado a aniridia ya que se ha observado mutado en un 30% hasta un 80% de los casos, en el presente estudio se identificó la presencia de mutaciones en un 25% de los pacientes con aniridia, similar a lo descrito en literatura en otras series. Una gran proporción de los casos incluidos en el presente trabajo pertenecían al grupo de aniridia (50%), esto pudo deberse al tamaño de la población estudiada y a que el estudio se llevó a cabo en un centro de referencia de tercer nivel. Al analizar el gen *PAX6* sólo se logró caracterizar la mutación causal en 2 casos índices con el fenotipo de aniridia, ya reportadas previamente en otras poblaciones, así como 2 polimorfismos ya descritos en la población mexicana y en otras poblaciones. No se logró identificar mutaciones en *PAX6* en otras disgenesias de segmento anterior como anomalía de Peters, glaucoma congénito y anomalía de Rieger, en los cuales se conocen diversos genes que pudieran ser los causales y que no fueron estudiados en esta serie.

1. ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO

Las disgenesias de segmento anterior son alteraciones del desarrollo ocular que incluyen: glaucoma congénito, aniridia, anomalía de Axenfeld-Rieger y anomalía de Peters. En estas entidades se comprenden todas las estructuras situadas por delante de la cara anterior del vítreo, que incluye: cuerpo ciliar, cristalino, iris y córnea. Estas patologías tienen un alto riesgo de presentar glaucoma de ángulo abierto. *PAX6* es un gen del desarrollo temprano, el cual se expresa principalmente en un inicio en el tejido ocular, vesícula óptica en desarrollo y cristalino, y posteriormente controlando la diferenciación de epitelio pigmentario retiniano. Se conoce que mutaciones en este gen pueden causar patologías que involucran tanto segmento anterior como posterior del ojo; así como en sistema nervioso central.

En humanos, mutaciones de *PAX6* se asocian a una variedad de anomalías oculares. El fenotipo clásico es aniridia, condición que se hereda de manera autosómica dominante. Consistente con el patrón de expresión de *PAX6* en ojo y cerebro en el embrión, la aniridia se acompaña frecuentemente con alteraciones en retina, nervio óptico, córnea, cristalino y glándula pineal.

En 1979, Kupfer y Kaiser-Kupfer sugirieron que un grupo de anomalías oculares de cámara anterior, frecuentemente asociadas con elevación de la presión intraocular y anomalías sistémicas, podrían explicarse por una migración aberrante o una diferenciación anormal de células provenientes de la cresta neural; inicialmente se limitó a anomalía de Axenfeld-Rieger,

iridodisgenesia con o sin hipoplasia de iris y anomalía de Peters, actualmente se incluye también al glaucoma congénito primario (1).

EMBRIOLOGÍA

Es esencial entender el origen embriológico de las estructuras del segmento anterior para comprender la patología. Las células que se derivan de la cresta neural son primordiales para el desarrollo ocular general y del segmento anterior. Dichas células son denominadas células neuroectodérmicas, las cuales migran del tubo neural a partir del día 24 de gestación (2). En la 6a semana de gestación, mediante movimientos morfogenéticos se forma la bicapa de la copa óptica embrionaria proveniente del neuroectodermo del cerebro anterior, la vesícula del cristalino se invagina y separa de la superficie ectodérmica. En esta etapa, el ojo rudimentario se encuentra rodeado por células mesenquimatosas progenitoras provenientes principalmente de la cresta neural (3).

En el segmento anterior en desarrollo, las células migran entre la superficie del ectodermo y la periferia de la copa óptica denominada cámara anterior. Una vez en la cámara anterior, las células neurales forman el endotelio corneal y los queratinocitos, células del estroma del iris y melanocitos, red trabecular y tejido yuxtacanalicular. Para el séptimo mes de gestación, las células de la cresta neural forman una capa continua que se extiende desde la córnea hacia la red trabecular y hacia la superficie anterior del iris formando una membrana continua con la pupila y la túnica vasculosa lentis.

Por medio de estudios con microscopia con laser, se ha sugerido que durante la semana 17-18 de gestación existen espacios intercelulares en el ángulo iridocorneal permitiendo un drenaje acuoso efectivo, que gradualmente incrementa durante el desarrollo (2).

Al 7º mes de gestación, la red trabecular se separa de la cámara anterior mediante la capa de células de la cresta neural y puede drenar una pequeña cantidad acuosa. (2)

TABLA 1. DERIVADOS EMBRIONARIOS QUE CONTRIBUYEN A LA FORMACIÓN DE SEGMENTO ANTERIOR	
ECTODERMO	
Superficie ectodérmica	Epitelio conjuntival Epitelio corneal Cristalino
Neuroectodermo	Músculos de esfinter y dilatadores de iris Epitelio pigmentado y no pigmentado del iris Zónulas del iris
Células de la cresta neural craneal	Estroma corneal y endotelio Esclera (excepto porción temporal) Red trabecular Canal de Schlemm Ángulo de segmento anterior

	Capa delgada de estroma de iris anterior Músculos ciliares Estroma ciliar Melanocitos epiteliales y uveales
MESODERMO	Porción temporal de la esclera Capa endotelial de vasos sanguíneos

Cuadro clínico

Existen numerosas clasificaciones de las disgenesias de segmento anterior, basadas en sus características clínicas. Dichas clasificaciones permanecen vigentes a la fecha, separando a cada una de las patologías en: (A) glaucoma congénito, (B) iridodisgenesia/aniridia, (C) anomalía de Axenfeld-Rieger, (D) anomalía de Peters, (E) distrofia endotelial hereditaria congénita, (F) esclerocórnea, (G) megalocórnea y (H) sin clasificar. En algunas de estas alteraciones puede existir involucro a nivel sistémico (2, 4). El presente estudio se enfocará en las 4 primeras.

a) Glaucoma congénito infantil

Esta es la forma más común de glaucoma durante la infancia. Ha sido llamado también trabeculodisgenesia o goniodisgenesia aislada para indicar que la córnea y el iris son morfológicamente normales.

Se manifiesta en el período neonatal o en los primeros meses de vida a consecuencia de un defecto congénito en el ángulo del segmento anterior al nivel de la red trabecular, lo que obstruye el flujo del humor acuoso, generando un aumento en la presión intraocular. (2)

De las alteraciones que pueden encontrarse secundarias al aumento de presión intraocular son: opacidad corneal, edema, bupftalmos (ojos grandes), escleras delgadas, rupturas en la membrana de Descemet (estrías de Haab), y excavación del nervio óptico (2).

La prevalencia es variable desde 1 en 2,500 en países de Medio Oriente, hasta 1 en 10,000-30,000 en países del este (4). Se ha descrito en la mayoría de los casos familiares una forma de herencia autosómico recesiva, en la que suele referirse el antecedente de consanguinidad, principalmente en un estudio realizado en familias de origen gitano (Gencik, 1980). Sin embargo un análisis realizado por Morton (1982) sugiere la existencia de heterogeneidad genética (2).

b) Aniridia

La aniridia es una entidad panocular congénita y bilateral con una incidencia de 1:64,000-1:96,000. Esta patología se caracteriza por ausencia completa o parcial del iris. Se puede presentar asociada a otros defectos oculares como: cataratas, glaucoma, pannus corneal, hipoplasia de nervio óptico, ausencia del reflejo macular, ectopia lentis, nistagmo, fotofobia, así como el riesgo de desarrollar glaucoma, todas estas alteraciones condicionan pobre visión (5). Debido a que las formas parciales pueden ser casi imperceptibles, es necesario valorar al paciente mediante gonioscopia para identificar el defecto (6).

En dos tercios de los niños con aniridia se tiene el antecedente de un padre afectado, con modo de herencia autosómico dominante, mientras que un tercio de los casos se deben a mutaciones de *novo*. De estos últimos, un tercio de los casos desarrollan Tumor de Wilms, si además se acompaña de retraso mental y alteraciones genitourinarias, se considera que presentan el síndrome de WAGR (Tumor de Wilms, Aniridia, Retraso Mental y alteraciones urinarias) donde los pacientes generalmente son heterocigotos para la delección constitucional de la región 11p13 (5).

c) Síndrome y anomalía de Axenfeld-Rieger

Los rasgos que componen la anomalía de Axenfeld-Rieger han sido reconocidos desde hace más de 100 años. En 1883, Vorssius describió una niña con defectos bilaterales de iris asociados a anomalías dentales. Axenfeld, para 1920, describe en un paciente una línea blanca periférica en la córnea con adhesiones al iris en el ángulo iridocorneal, cuadro que denominó “embriotoxón posterior de la córnea”, este paciente cursaba también con hipoplasia del estroma de iris y coloboma parcial del iris.

En 1935, Rieger describe el caso de una madre y sus dos hijos con hipoplasia irregular y ectopia del estroma del iris y pupilas, cuadro que denominó “disgenesia mesodérmica de córnea e iris” (6).

La anomalía de Axenfeld-Rieger puede considerarse como una entidad única con expresividad variable o como una serie de condiciones relacionadas. Cuando el borde del iris se desplaza desde el ángulo iridocorneal hacia la red trabecular y existe embriotoxón posterior, se considera anomalía de Axenfeld. Si existe hipoplasia estromal, pupila desplazada (corectopia) o agujeros extra en iris (policoria), entonces se considera anomalía de Rieger (7). Las alteraciones en iris generalmente son estacionarias y rara vez cambian con el tiempo (8).

Las alteraciones oculares que componen a la anomalía de Axenfeld-Rieger se asocian a glaucoma en un 50% de los casos, esto ocurre generalmente durante la niñez tardía o en adultos jóvenes, sin embargo puede presentarse a cualquier edad a partir del nacimiento, por lo que se requiere vigilancia y seguimiento durante toda su vida. El riesgo de desarrollar glaucoma no parece estar relacionado con la severidad del fenotipo (8, 9).

En el síndrome de Axenfeld-Rieger además de las alteraciones oculares existe involucro sistémico con dismorfias características: hipoplasia maxilar, telecantho, hipertelorismo y puente nasal deprimido; anomalías dentales que incluyen hipodoncia y microdoncia, en región umbilical puede existir piel redundante, anomalía pituitaria y retardo del crecimiento. En varones se puede observar hipospadias (7).

d) Anomalía de Peters

La anomalía de Peters consiste en leucoma corneal central, ausencia de estroma corneal posterior y de la membrana de Descemet, así como adherencias del iris y cristalino hacia la superficie posterior de la córnea. Generalmente el aspecto morfológico puede variar desde una pequeña opacidad corneal con algunas adherencias hacia iris y cristalino transparente, hasta una opacidad corneal total, múltiples adherencias iridocorneales y catarata total, que generalmente están presentes desde el nacimiento (2). En algunos casos se pueden realizar injertos corneales de manera muy temprana para dar oportunidad a tener un desarrollo de visión normal (10).

En la anomalía de Peters se presenta una gran variabilidad ya que la opacidad corneal puede ser desde leve (pequeña indentación de la superficie corneal posterior) a muy densa, en este último caso el diagnóstico sólo se realiza por ultrasonido. La opacidad puede ser la única alteración, la cual puede mejorar ligeramente con el tiempo, probablemente debido a las células que rodean el defecto mejorando la función endotelial (2).

GENES CAUSALES

Diferentes genes se conocen como la causa de estas patologías, de ellos los más destacados son: *PAX6*, *PITX2*, *PITX3*, *FOXC1*, *FOXE3*, *EYA1*, *CYP1B1*, *LMX1B* y *MAF*. Se conoce que estos genes no se asocian exclusivamente a fenotipos específicos dentro de las disgenesias de segmento anterior. Explicando así, que un solo gen como *PAX6* puede ser el causal de los diferentes fenotipos en las disgenesias de segmento anterior (4).

En glaucoma congénito se han logrado identificar 3 loci principales, los cuales se han designado: *GLC3A* o *CYP1B1* (11) localizado en 2p21, *GLC3B* (12) en 1p36 y más recientemente *GLC3C* en 14q24.3 (13). Cuando se presenta con otros signos oculares (queratopatía, ptosis, nistagmo, aplasia foveal o microftalmia) se asocia a mutaciones en *PAX6* (14).

En el caso de aniridia el gen responsable en la mayoría de los casos es *PAX6* ubicado en 11p13. Los individuos que portan mutaciones en el gen *PAX6* en estado heterocigoto presentan aniridia, mientras que la condición de homocigocidad se considera que ocasiona letalidad en la embriogénesis temprana (5).

En la anomalía de Axenfeld-Rieger existe una considerable heterogeneidad genética, sugerido por las diversas alteraciones cromosómicas encontradas en pacientes con esta patología. Dentro de ellas se incluyen deleciones en regiones cromosómicas como 4q25 (15) y 13q14 (16); por lo que se cree que

existe una variedad de genes causales donde se han identificado a *PITX2* (17) y *FOXC1* (18) como los principales. Estos genes son factores de transcripción importantes en el desarrollo dental temprano y el último pertenece a una familia de factores de transcripción (forkhead family) importante en la regulación de la embriogénesis así como en la migración y diferenciación celular. *PITX2* se expresa en el mesénquima embrionario periorcular del ratón. El mesénquima periorcular se deriva de la cresta neural, esta migración celular contribuye en gran medida al desarrollo de estructuras del segmento anterior incluyendo iris, córnea y red trabecular, todas ellas de alguna manera alteradas en Axenfeld-Rieger. Otros tejidos que expresan *PITX2* y que pueden explicar las alteraciones sistémicas asociadas son el mesénquima umbilical, el epitelio dental y el corazón entre otros. En otros trabajos se ha demostrado que *PITX2* da una señal en cascada y modula la proliferación celular, diferenciación y morfogénesis importantes en la embriogénesis y en el desarrollo dental temprano (17).

Sólo se ha reportado un caso con anomalía de Axenfeld-Rieger asociado a mutación en *PAX6*, sin embargo, posteriormente se comprobó que dicho paciente no tenía alteración en *PAX6*, sino en *PITX2* (19).

En anomalía de Peters se han descrito diversas etiologías, es decir, hay heterogeneidad genética. Existen diversos reportes donde se han encontrado alteraciones cromosómicas como delección intersticial de 11p, deleciones como 4p- ó 18q-, inversión paracéntrica del cromosoma 4, cromosoma 21 en anillo y translocación balanceada 2;15 (20).

Hanson et al, 1994 describieron una familia donde se logró demostrar la misma mutación en el gen *PAX6*, condicionantes de anomalía de Peters y otras disgenesias complejas de segmento anterior difíciles de clasificar, en diferentes miembros de la misma familia. Honkanen et al. 2003, describieron un caso familiar con mutación de sentido erróneo, F112S, en *FOXC1* y diagnóstico previo de Axenfeld-Rieger, donde en uno de sus integrantes logró demostrarse que cursaba con anomalía de Peters. Doward et al., 1999 identificaron una mutación en *PITX2* en un niño con anomalía de Peters en un ojo y anomalía de Axenfeld Rieger en el otro. Posteriormente, se han realizado estudios (Vincent y cols 2006; Chavarría, 2006) en pacientes con anomalía de Peters y mutaciones en otros genes como *PAX6*, *PITX2*, *MYOC* y *FOXC1*, sin encontrar alteraciones. En 2001 Vincent et al. identificaron mutaciones en estado heterocigoto compuesto en el gen *CYP1B1* en una familia de ascendencia francocanadiense e indios Mohawk nativos. Todo lo anterior sugiere que la anomalía de Peters puede ser el resultado de alteraciones en el desarrollo ocular originadas por diferentes mecanismos, lo que explicaría la expresividad variable de este desorden genético (2).

El presente trabajo se enfocará exclusivamente al análisis del gen *PAX6* en pacientes con alteraciones oculares compatibles con disgenesias de segmento anterior incluyendo: glaucoma congénito, aniridia, anomalía de Axenfeld-Rieger y anomalía de Peters; ya que forma parte de un proyecto en donde se analizarán los genes *CYP1B1*, *PAX6*, *PITX2* y *FOXC1*.

GEN PAX 6

El gen *PAX6* se localiza en 11p13 y pertenece a una familia de genes homeóticos (*PAX*) que codifican para factores de transcripción, importantes en el desarrollo embrionario temprano. Codifica para una proteína de 422 aminoácidos que consiste de 2 dominios de unión a DNA altamente conservados, un dominio pareado bipartito (PRD), un homeodominio (HD) y un dominio terminal rico en prolina-serina-treonina que funcionan como activadores transcripcionales. Este gen se encuentra altamente conservado a través de la evolución. Se describió su función como el gen maestro regulador del desarrollo del ojo en la embriogénesis, ya que cuando se expresaba *PAX6* en ciertos sitios de manera ectópica generaban estructuras oculares. Sin embargo, el término gen maestro selector es más apropiado, debido a que se requiere reclutar un gran número de otros genes para permitir que *PAX6* realice su acción en la proliferación y diferenciación celular de los tejidos oculares (13).

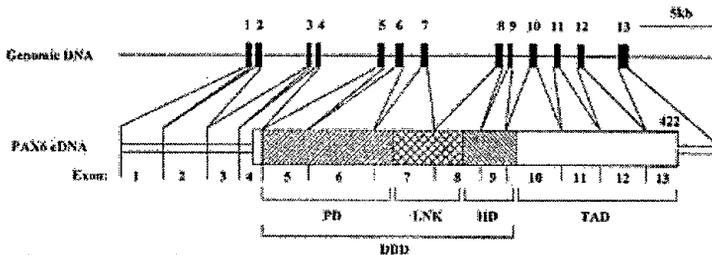


Figura 1. Diagrama de DNA genómico y cDNA del gen *PAX6* humano.

Kokotas and Petersen, 2010.

La línea gruesa indica la región codificante (exones 4-13). DBD, dominio de unión a DNA; PD, dominio pareado; LNK, región de ligamiento; HD, homeodominio; TAD, dominio de transactivación.

FUNCIÓN

Es un factor transcripcional involucrado en el desarrollo ocular y del sistema nervioso central. Aparentemente el gen *PAX6* también está implicado en un mecanismo de retroalimentación con otros genes homeobox, con el fin de controlar el desarrollo ocular, por ejemplo *Pbx1* y *Hoxb1*, aumentando su actividad transcripcional. Se ha demostrado que *PAX6* es necesario para iniciar la diferenciación del cristalino y la retina. La regulación de *PAX6* controla la identidad y diferenciación de las células del epitelio pigmentado retiniano manteniendo la multipotencialidad y la proliferación de las células progenitoras del epitelio retiniano (21).

Se requiere de numerosos procesos en la formación del nervio óptico, para esto *PAX2* junto con *PAX6* deben cooperar u ocasionalmente compartir algunas tareas, como por ejemplo, regular la apertura y el cierre de la fisura embrionaria por lo que mutaciones en alguno de estos dos genes pueden ser causa de cambios fenotípicos similares. Sin embargo, ya que *PAX6* se encuentra involucrado en la formación de otros tejidos, incluyendo sistema nervioso central (SNC), se espera un rango más amplio de fenotipos por mutaciones en *PAX6* que en *PAX2* (22).

MUTACIONES

La asociación con aniridia fue revelada por Lyons et al., mediante el análisis en una familia con aniridia encontrando evidencia de su relación con la región 11p13, localizando el gen *PAX6* mediante la combinación de estudios de ligamiento, mapeo físico y análisis citogenético (5, 14). Debido a que las primeras mutaciones asociadas a aniridia fueron deleciones génicas, se creyó que el fenotipo se originaba exclusivamente por una inactivación de un alelo del gen *PAX6* (haploinsuficiencia). Posteriormente, se logró evidenciar que mutaciones que condicionan un codón de paro prematuro, principalmente afectando a la región codificante del gen *PAX6*, correlacionan con el fenotipo de aniridia clásica en aproximadamente el 99% de las veces, por lo anterior, se consideró que el fenotipo anormal también se puede originar por un efecto mutacional dominante negativo (14).

En el estudio de Hingorani et al. (2009) se encontró que los principales signos oculares asociados a mutaciones en *PAX6* fueron: anomalías de iris (100%), nistagmo (95%), hipoplasia foveal (85%), cataratas (68%) y ametropía (48%) (14).

HAPLOINSUFICIENCIA *PAX6*

Es probable que la proteína mutante no tenga actividad transcripcional y que la copia normal restante de *PAX6* no sea suficiente para producir cantidades adecuadas de la proteína biológicamente activa, lo que genera una reducción de la expresión de 1 ó más genes críticos relacionados a *PAX6*, causal del desarrollo anormal del segmento anterior del ojo (5).

Se ha propuesto que existen algunas mutaciones sin sentido que han resultado en la formación de una proteína *PAX6* trunca, pero que mantiene intactos tanto el dominio pareado como el homeodominio. El mecanismo molecular, que subyace a estos cambios estructurales, parece tratarse de un efecto "dominante negativo", el cual puede resultar en la competencia por el sitio de unión a DNA entre las proteínas de *PAX6* truncas y las normales, evitando la acción de las proteínas normales (5).

MUTACIONES EN *PAX6* CONDICIONANTES DE ANIRIDIA

El espectro de mutaciones en pacientes con aniridia es amplio, cerca de 92% de las mutaciones reportadas se clasifican como: sin sentido, de splicing, inserciones y deleciones, las cuales generan una proteína trunca mientras que sólo 2% son de sentido erróneo. La alta conservación de aminoácidos de la proteína entre vertebrados, sugiere que mutaciones de sentido erróneo patológicas ocurren frecuentemente, sin embargo raramente se ven en pacientes con aniridia. Lo anterior es apoyado por el hecho de que se han establecido diferentes funciones del gen *PAX6* y a que también se expresa en etapas tempranas del desarrollo del sistema nervioso central, epitelio corneal, cristalino y retina, generando diferentes fenotipos oculares lo cual se ha demostrado en diversos estudios en ratones. Se han descrito muy pocos pacientes con aniridia que se presentan con un fenotipo severo (disgenesia cerebral, microftalmia, malformaciones del nervio óptico), en los cuales se logró caracterizar mutaciones en *PAX6* de sentido erróneo localizadas en el dominio pareado del gen, afectando aminoácidos altamente conservados (5).

A la fecha se han reportado un total de 756 polimorfismos y mutaciones en la base de datos "Human *PAX6* allelic database", donde las más frecuentes se encuentran en el exón 5 con un total de 238 (31.48%), en segundo lugar en el exón 6 con un total de 110 (14.55%) y en tercer lugar el exón 9 con 85 (11.24%). Lo anterior se representa en la tabla 1 con las mutaciones más frecuentes por exón/intrón.

Tabla 2. Mutaciones y polimorfismos frecuentes de *PAX6* reportados en aniridia.

Intrón/exón	Polimorfismo	Mutación	Fenotipo
Intrón 2	IVS+9G>A	IVS2-2delA	Aniridia
Intrón 2			Aniridia, microftalmia, nistagmo, catarata, hipoplasia macular, ectopia lentis, microcórnea, hipoplasia de nervio óptico, esclerocórnea parcial, queratitis en banda.
Intrón 3		IVS3+1G>A	Aniridia, catarata, glaucoma, nistagmo, distrofia corneal media.
Exón 4		c.364T>G	Aniridia, aniridia parcial bilateral.
Exón 5		c.468delG	Aniridia, nistagmo, defectos de iris de estroma anterior variable, varias combinaciones de esclerosis nuclear, pannus corneal, hipoplasia de nervio óptico, hipoplasia macular

Exón 5	c.474delC	Aniridia
Exón 5	c.476_483del8	Aniridia
Exón 5	c.478insCC	Aniridia, hipoplasia de iris, nistagmo, hiposmia moderada, comisura cerebral anterior ausente, glándula pineal ausente, hipoplasia hipocampo bilateral, hipermetropía.
Exón 5	c.482C>A	Aniridia, nistagmo, ectopia lentis, opacidad corneal.
Intrón 5	IVS5+1G>A	Aniridia, nistagmo, catarata.
Intrón 5	IVS5+2T>C	Aniridia.
Intrón 5	IVS5-2A>G	Aniridia, nistagmo.
Exón 6	c.561A>T	Aniridia, catarata, nistagmo, pupilas excéntricas y agrandadas.
Exón 6	c.639G>T	Aniridia, catarata.
Exón 6	c.661G>A	Aniridia.
Exón 6	c.663delG	Aniridia, glaucoma, catarata, nistagmo, distrofia corneal, hipoplasia macular, ametropía, ptosis.

Exón 6		c.669C>T	Aniridia, nistagmo, subluxación de cristalino, fenotipo letal, anoftalmia, arrinia y defectos severos de SNC cuando presenta p.Ser353X.
Exón 6		c.687G>T	Aniridia.
Exón 6		c.693insG	Aniridia, catarata, queratopatía, hipoplasia macular.
Exón 6		c.719C>G	Aniridia.
Exón 6		IVS6+1G>A	Aniridia, catarata, glaucoma, nistagmo, ectopia lentis, distrofia corneal leve, leve fotofobia, remanente mínimo de iris, hipoplasia macular.
Exón 6		IVS6+5G>A	Aniridia, hipermetropía moderada, hipertensión ocular, desprendimiento de retina
Intrón 6		IVS6+1G>C	Aniridia, nistagmo, hipoplasia macular, ectopia lentis,

			microcórnea, hipoplasia de nervio óptico.
Intrón 6		IVS6+1G>T	Aniridia.
Intrón 6		IVS6+2insT	Aniridia, hipoplasia parcial de iris, ptosis, cataratas, hipoplasia de nervio óptico, leve hiposmia, ausencia de comisura anterior, hipoplasia pineal.
Intrón 6		IVS6-1G>C	Aniridia.
Exón 7		c.732_735del4	Aniridia, cataratas, pérdida parcial del iris, queratitis corneal severa.
Exón 7		c.735delAG	Aniridia.
Exón 7		c.765C>T	Aniridia, nistagmo vertical, cataratas, queratopatía.
Exón 7		c.768C>T	Aniridia.
Exón 7		c.829delG	Aniridia.
Exón 7		c.830G>A	Aniridia, catarata, glaucoma.
Exón 7		c.851T>G	Aniridia.
Exón 7		c.853delC	Aniridia, catarata, nistagmo, distrofia corneal leve.
Intrón 7		IVS7-2A>G	Aniridia, nistagmo,

Exón 8		c.969C>T	catarata, estrabismo Aniridia, glaucoma, nistagmo, estrabismo, queratopatía, erosión corneal, vascularización corneal, catarata bilateral iris delgados, intolerancia a la glucosa, retraso en maduración macular, hipoplasia macular
Intrón 8		IVS8+2T>A	Aniridia, cataratas, esotropia, hipoplasia foveal, iris atípico, coloboma
Exón 9		c.1080C>T	Aniridia, glaucoma, catarata, nistagmo, queratopatía, pannus corneal, agenesia macular, hipoplasia macular, hipertensión ocular, estrabismo, ptosis
Intrón 9	IVS9-12C>T		Aniridia, glaucoma, nistagmo, catarata congénita, hipoplasia de nervio óptico, hipoplasia

Intrón 9	IVS9-1G>A	macular, queratopatía, queratocono, subluxación de cristalino
Exón 10	c.1143C>T	Aniridia
Exón 10	c.1157G>A	Aniridia, glaucoma, nistagmo intermedio, distrofia corneal, fotofobia, hipoplasia macular, queratopatía, cataratas centrales pequeñas
Intrón 10	IVS10+1G>C	Aniridia, catarata y glaucoma
Exón 11	c.1286delC	Aniridia, nistagmo
Exón 11	c.1311C>T	Aniridia
Intrón 11	IVS11+1G>A	Aniridia, glaucoma, nistagmo, ectopia lentis, hipoplasia macular, miopía, hipermetropía, distrofia corneal leve, leve fotofobia, queratopatía, catarata, hipoplasia de nervio óptico, electroretinograma anormal
Intrón 11	IVS11+1G>A	Aniridia, nistagmo,

Intrón 11	IVS11-2A>G	distrofia corneal severa, fotofobia moderada
Exón 12	c.1399delC	Aniridia, glaucoma,
Exón 13	c.1627A>G	nistagmo, hipoplasia macular
Exón 13	c.1630A>T	Aniridia, subluxación de cristalino leve, nistagmo, extropion uveal, invasión de córnea por epitelia conjuntival, embriotoxón posterior
Exón 13	c.1630A>T	Aniridia, glaucoma, nistagmo, estrabismo, queratopatía corneal, catarata, hipoplasia macular, defectos de margen de iris, placa de superficie anterior del cristalino, pupilas ligeramente irregulares, hipoplasia foveal, corectopia, paraparesia espástica, hiposmia, hipoplasia de comisura

Exón 13		c.1630A>T	anterior cerebral, y de cuerpo calloso, persistencia de cavum septum pellucidum, ectropion de disco, embriotoxón posterior, translucencia anormal de iris Aniridia
---------	--	-----------	---

Kokotas and Petersen, 2010.

MUTACIONES EN *PAX6* CONDICIONANTES DE ANOMALÍA DE PETERS

Mutaciones de sentido erróneo en *PAX6* se han asociado a una variedad de fenotipos incluyendo: aniridia, corectopia, hipoplasia foveal aislada, anomalía de Peters, microftalmia y defectos en nervio óptico. Hanson et al. describieron una familia con anomalía de Peters, en donde algunos de los afectados presentaban anomalía de Rieger, en quienes se demostró mutación en *PAX6*, con lo que se estableció que mutaciones en *PAX6* pueden condicionar fenotipos variables (2). Sin embargo, en general se acepta que las mutaciones en el gen *PAX6* rara vez son causales de la anomalía de Peters, como se ha demostrado en diversos estudios realizados en pacientes con esta patología (23).

MUTACIONES EN *PAX6* EN AXENFELD-RIEGER

Hasta el momento, no existen reportes de asociación de mutaciones de *PAX6* y Axenfeld-Rieger, sin embargo, los genes frecuentemente asociados en esta entidad, han demostrado sólo ser causales en el 40% de los pacientes (24), por lo que se sugiere que aún queda por demostrar la causalidad con otros genes. Lines (2002) propone otro gen llamado *MAF*, involucrado en la señalización de cristalino-córnea, asociado a Axenfeld-Rieger, el cual es regulado y sinergizado por *PAX6* (25).

MUTACIONES EN *PAX6* EN GLAUCOMA

No hay datos específicos de mutaciones en *PAX6* que condicionen glaucoma congénito aislado, sin embargo, existen casos de aniridia con mutaciones en *PAX6* que desde el nacimiento manifiestan glaucoma congénito asociado (4).

Se propone que todas las alteraciones de segmento anterior ocular son parte de un espectro patológico, por lo que mutaciones en un gen como *PAX6* pueden ser causales de varios fenotipos por involucro de un defecto primario de señalización de migración de las células mesenquimales de las estructuras del segmento anterior involucradas (4).

2. JUSTIFICACIÓN

Las disgenesias de segmento anterior: glaucoma congénito, aniridia, anomalías de Axenfeld-Rieger y Peters, son malformaciones poco frecuentes, pero que dan como resultado pérdida importante de la visión. La mayoría de los que la padecen presentan discapacidad visual. Por esto, se requiere de servicios y educación especiales. Así mismo, es frecuente que secundariamente desarrollen glaucoma, requiriendo por lo tanto un control oftalmológico seriado durante toda su vida, por lo que se requieren medidas tempranas para su detección oportuna y así poder dar un tratamiento y seguimiento adecuados.

El identificar las mutaciones del gen *PAX6*, y las frecuencias de éstas, presentes en pacientes mexicanos con disgenesias de segmento anterior, puede ayudar a definir si existe una correlación fenotipo-genotipo al describir las características clínicas y la mutación causal encontrada en los pacientes con alguna de estas disgenesias de segmento anterior, así como la posibilidad de determinar en casos familiares, si se observa expresividad variable o no penetrancia.

Por otro lado, una vez que se identifican las mutaciones causales de la patología en los casos índice es importante realizar estudio molecular en los padres, lo que permite definir si se trata de un evento esporádico o familiar, lo cual es relevante para brindar un asesoramiento genético certero.

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Qué proporción de pacientes mexicanos con disgenesias o anomalías oculares de segmento anterior presenta mutaciones en el gen *PAX6*?

¿Cuál es el tipo de mutaciones asociadas a las diferentes patologías oculares de segmento anterior?

¿Existe no penetrancia o expresividad variable por mutaciones en *PAX6*?

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Conocer las características clínicas y genéticas en una muestra de pacientes mexicanos con glaucoma congénito, aniridia, anomalía y síndrome de Axenfeld-Rieger y anomalía de Peters.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Describir las características clínicas oculares de pacientes con aniridia, así como determinar la frecuencia y tipo de mutación causal en el gen *PAX6*.
2. Describir las características clínicas oculares de pacientes con glaucoma congénito, así como determinar la frecuencia y tipo de mutación causal en el gen *PAX6*.

3. Describir las características clínicas oculares de pacientes con anomalía y síndrome de Axenfeld-Rieger, así como determinar la frecuencia y tipo de mutación causal en el gen *PAX 6*.
4. Describir las características clínicas oculares de pacientes con anomalía de Peters, así como determinar la frecuencia y tipo de mutación causal en el gen *PAX 6*.
5. Determinar si son casos esporádicos o familiares mediante estudio clínico y molecular en los padres, al establecer si alguno de los progenitores presenta expresión mínima o no penetrancia.

5. HIPÓTESIS

1. En los pacientes con aniridia se espera encontrar mutaciones en *PAX6* en aproximadamente 30% de los casos.
2. En los pacientes con glaucoma congénito no se espera encontrar mutaciones en *PAX6* o en un porcentaje mínimo.
3. En los pacientes con anomalía y síndrome de Axenfeld-Rieger no se espera encontrar mutaciones en *PAX6* o en un porcentaje mínimo.
4. En los pacientes con anomalía de Peters se espera encontrar mutaciones patológicas en un porcentaje menor al 10% en el gen *PAX6*.
5. Dado la expresividad variable de estas patologías se espera encontrar casos con expresión mínima.

6. MATERIAL Y MÉTODO

CARACTERÍSTICAS DEL ESTUDIO: Estudio observacional, descriptivo, prospectivo y transversal.

POBLACIÓN DE ESTUDIO

Pacientes de nacionalidad mexicana con glaucoma congénito, aniridia, anomalía o síndrome de Axenfeld-Rieger o anomalía de Peters atendidos en el servicio de Oftalmología y Genética del Hospital “Dr. Luis Sánchez Bulnes” de la Asociación para Evitar la Ceguera en México, así como familiares de primer grado. Se realizó el análisis molecular del gen *PAX6* en el Laboratorio de Biología Molecular del INP.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

1. Caso índice de cualquier edad y sexo con diagnóstico confirmado de glaucoma congénito, aniridia, anomalía o síndrome de Axenfeld-Rieger o anomalía de Peters.
2. Cualquier género.
3. Cualquier edad.
4. Familiares de primer grado que firmaron la carta de consentimiento informado.
5. Firma de carta de consentimiento informado para casos índice y familiares.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

1. Padres o hermanos no biológicos del caso índice.
2. Se excluyeron temporalmente pacientes que hayan sido transfundidos en los tres últimos meses.

DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO.

DEFINICIÓN DE VARIABLES

Sexo.	Cualitativa, categorial nominal dicotómica. Denominación que se da al sujeto según sus características fenotípicas y genotípicas: Femenino o masculino. 0= femenino, 1= masculino
Edad.	Cuantitativa numérica discreta. Edad en días, meses o años al momento de la captura de estas variables.
Presión intraocular.	Cuantitativa numérica continua. Fuerza por unidad de superficie (aplicada al ojo). Presión a la que están sometidos todos los tejidos comprendidos dentro de la capa esclerocorneal. Su valor promedio es de 15,5mmHg y es ejercida por el humor acuoso y el vítreo.

Agudeza visual.

Cuantitativa numérica continua.

Proceso complejo para percibir, detectar o identificar objetos espaciales. Una de las pruebas más comunes para medirla es la de Snellen, formada por filas de letras que van del tamaño más grande a más pequeño.

Córnea.

Córnea transparente. Cualitativa nominal dicotómica:
0= transparente; 1= opaca

Embriotoxón posterior. Presencia de una línea de Schwalbe engrosada y con desplazamiento anterior.
Cualitativa nominal dicotómica: 0= No; 1= Sí

Leucoma: opacificación de la córnea, adherente cuando está adherida su capa posterior con la capa anterior del iris, y no adherente cuando no lo está.
Cualitativa nominal dicotómica. 0= No 1= Sí

Megalocórnea: aumento del tamaño de la córnea donde su diámetro es mayor a los 13mm en el diámetro horizontal. Cualitativa nominal dicotómica.
0= No; 1= Sí

Microcórnea disminución del tamaño de la córnea donde su diámetro es menor a 10 mm en el diámetro horizontal. Cualitativa nominal dicotómica. 0= No; 1= Sí

Estrías de Haab. Rupturas de la membrana de Descemet secundarias al incremento rápido de las dimensiones corneales. Cualitativa nominal dicotómica. 0= No; 1= Sí

Buftalmos. Agrandamiento ocular con megalocórnea adquirida, secundario a glaucoma congénito, acompañado de adelgazamiento de la esclera y opacidad corneal. Cualitativa nominal dicotómica. 0= No; 1= Sí

Ángulo

Estructura formada por la córnea y la esclera con el iris. En esta estructura se encuentran el trabéculo y por detrás de este el canal de Schlemm, formando la vía de drenaje del humor acuoso desde el interior del ojo hacia el exterior.

Procesos iridianos largos en el ángulo. Extensiones del iris que sobrepasan el espolon escleral y que en

ocasiones llegan a ser anchos. Cualitativa nominal dicotómica. 0= No; 1= Si

Inserción alta del iris en el ángulo. Cualitativa nominal dicotómica. 0= No; 1= Sí

Segmento anterior

Estructura delimitada por delante por la córnea y en su parte posterior por el iris y el cristalino. Se describe como amplia y formada. Cualitativa nominal dicotómica. 0= Si; 1= No

Iris

Normal: de bordes bien delimitados y definidos. Cualitativa nominal dicotómica. 0= Si; 1= No

Corectopia: anomalía donde la pupila se encuentra situada por fuera del centro del iris. Cualitativa nominal dicotómica. 0= No; 1= Sí

Policoria. Presencia de dos o más orificios semejantes a la pupila en iris. Cualitativa nominal dicotómica. 0= No; 1= Sí

Sinequia anterior. Adherencia del iris hacia la córnea. Cualitativa nominal dicotómica. 0= No; 1= Sí

Sinequia posterior. Adherencia del iris hacia el cristalino. Cualitativa nominal dicotómica. 0= No; 1= Sí

Coloboma sectorial: ausencia de iris en un sector. Cualitativa nominal dicotómica. 0= No; 1= Sí

Hipoplasia iridiana: aspecto de iris anormal, deshilachado, sin criptas. Cualitativa nominal dicotómica. 0= No; 1= Sí

Aniridia subtotal. Ausencia de iris con remanentes en la periferia. Cualitativa nominal dicotómica. 0= No; 1= Sí

Aniridia total: Ausencia de iris total. Cualitativa nominal dicotómica. 0= No; 1= Sí

Cristalino

Catarata: Opacificación total o parcial del cristalino. Cualitativa nominal dicotómica. 0= No; 1= Sí

Subluxación: cristalino desviado de su posición normal. Cualitativa nominal dicotómica. 0= No; 1= Sí

Polo posterior

Hipoplasia macular: pérdida del reflejo luminoso oval que caracteriza a la mácula. Cualitativa nominal dicotómica. 0= No; 1= Sí

Papila: Es la porción intraocular del nervio óptico o segundo par craneal. Tiene una estructura oval, con una depresión o excavación central, sitio por donde pasan las ramas de la arteria y vena centrales de la retina.

Hipoplasia de nervio óptico: disminución de las fibras nerviosas del nervio óptico. Se distingue por la presencia de una papila pequeña rodeada por un halo amarillo (signo del doble anillo). Cualitativa nominal dicotómica. 0= No; 1= Sí

Papila sospechosa glaucomatosa. En condiciones normales la papila presenta una excavación fisiológica. El aumento de esta excavación constituye un dato de sospecha de glaucoma. Cualitativa nominal dicotómica. 0= No; 1= Sí

Otras alteraciones

Nistagmo. Oscilación involuntaria y repetitiva de los ojos. Cualitativa nominal dicotómica. 0= No; 1= Sí

Ptosis. Posición anormalmente baja del párpado superior. Cualitativa nominal dicotómica. 0= No; 1= Sí

Glaucoma. Estado de hipertensión ocular (>21mmHg) con signos y síntomas característicos.

Cualitativa nominal dicotómica. 0= No; 1= Sí

CAPTACIÓN DE CASOS

1. Los pacientes se captaron a través de la consulta externa del servicio de Genética de la Asociación para Evitar la Ceguera APEC. A las familias se les realizó historia clínica completa con árbol genealógico y en ella se realizó revisión oftalmológica y se tomó muestra de sangre. En cada caso se asentaron los datos clínicos de las variables a analizar en la Hoja de Captación de Datos (Anexo 1).

Posterior a brindarle toda la información sobre el protocolo de investigación a los pacientes y la familia, se solicitó la firma de la carta de consentimiento a los pacientes mayores de 18 años (Anexo 2).

En el caso de los menores de edad se solicitó el consentimiento informado a los padres (Anexo 3), así como a los mayores de 10 años pero menores de 18 años se les solicitó la firma de una carta de asentimiento (Anexos 4).

A la mayoría de los familiares de primer grado que aceptaron ingresar al protocolo se les realizó exploración oftalmológica por un Oftalmólogo de la Asociación para Evitar la Ceguera APEC y se asentaron los datos en la hoja de captación de datos del paciente. Se realizó toma de muestra para DNA previa firma de consentimiento informado por los padres, si eran menores de edad, y en el caso de los mayores de 10 años y menores de 18 años, se les solicitó la firma de la carta de asentimiento.

Se realizó la toma de muestra mediante punción directa y se obtuvo un tubo con 3-5ml de sangre periférica con anticoagulante EDTA. Dicha toma fue única identificándose con el mismo número del cuestionario y la carta de consentimiento y/o asentimiento informado.

TAMAÑO DE LA MUESTRA

Dada la frecuencia de las entidades estudiadas, el tamaño de la muestra fue a conveniencia. En este trabajo se analizaron 16 pacientes.

EXTRACCIÓN DE DNA

Se realizó la extracción del DNA a partir de sangre periférica mediante precipitación salina con el kit Puregene™ (Gentra Systems, Minneapolis, MN, USA). Las muestras obtenidas se almacenaron a una temperatura de 4°C hasta su análisis.

CUANTIFICACIÓN DEL DNA

Se diluyeron 2 μl de la muestra de DNA en 498 μl de agua estéril y se registró la densidad óptica a una longitud de onda de 260 nm. Para cuantificar la concentración de DNA se aplicó la siguiente fórmula:

$$(D.O) (F) (\text{dil}) = (\text{DNA}) \mu\text{g/ml}$$

donde:

D.O = densidad óptica a 260 nm

F = constante equivalente a 0.05 (50 ng de DNA = 1 D:O)

Dil = volumen de dilución equivalente a 250 μl

INTEGRIDAD DEL DNA

Se evaluó por medio de electroforesis, mezclando 1 μl de la muestra con 2 μl de colorante azul de bromofenol-xilencianol (0.05%: 0.05%) y 7 μl de agua estéril.

La electroforesis se llevó a cabo durante 20 min. a 100 voltios en un gel de agarosa al 0.7% teñido con bromuro de etidio; posteriormente se observó el DNA por medio de un transiluminador con luz ultravioleta y se tomaron fotografías.

BÚSQUEDA DE MUTACIONES

La búsqueda de mutaciones se realizó mediante amplificación en cadena de la polimerasa, análisis mediante SSCP y secuenciación automática.

- Reacción de la cadena de la polimerasa (PCR)

La mezcla para llevar a cabo la amplificación de los 13 exones contenía 0.5 U de Taq polimerasa, buffer de PCR 1x, 1.5 mM de $MgCl_2$, 200 μ Mol/L de dNTPs, 100 ng de DNA genómico y 60 ng de cada primer. Las secuencias de los primers (Anexo 5) las cuales se obtuvieron del GeneBank.

La reacción se llevó a cabo en el termociclador Applied Biosystems modelo Gene amp PCR System 2720, las condiciones de PCR se establecieron de acuerdo a las características de cada exón a amplificar (Anexo 6).

BÚSQUEDA DE MUTACIONES MEDIANTE SSCP

Para la identificación de mutaciones se realizó la técnica de SSCP (polimorfismo conformacional de DNA de cadena sencilla), que se llevó a cabo mediante la dilución de los productos de PCR en buffer acarreador el cual contiene formamida 98%, EDTA 8mM, azul de bromofenol 0.1%, xilencianol 0.1%, la desnaturalización se llevó a cabo a 95°C de 3-4 min, posteriormente se sumergen en agua con hielo un mínimo de 10 minutos (choque térmico). Posteriormente los productos desnaturalizados fueron cargados en un gel de

matriz MDE al 25% y se corrieron de 5 hrs a 40 wattés, 8mA, con un límite de volts a 850. El revelado de las bandas se realizó con la tinción de plata Kit Biorad.

SECUENCIACIÓN DEL DNA

Todas las muestras que por la técnica de SSCP presentaron patrones electroforéticos anormales, fueron secuenciadas, para lo cual se amplificó el DNA genómico utilizando el mismo par de primer usado para el SSCP. El producto obtenido de PCR (50 μ l) del exón de interés, se observó en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1%, el amplificado se purificó con el kit comercial de extracción QI Aquick (QIAGEN, Meryland, USA), a través de columna con una serie de hidrataciones con soluciones específicas y centrifugaciones, hasta obtener el producto purificado en 30 μ l de agua. Ambas hebras forward y reverse fueron secuenciadas mediante secuenciación automática.

La secuenciación se realizó en el laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México, con un secuenciador 3100 de Applied Biosystems (Foster City, CA).

Se comparó la secuencia obtenida del electroferograma con la secuencia del gen *PAX6* descrita en la base de datos del GeneBank para determinar el cambio y la posición existente en el paciente. Se buscó el cambio en la base de

datos que contienen todas las mutaciones y polimorfismos encontrados en el gen *PAX6* en el sitio Laiden Open Variation Database (LOVD; Fokkema, den Dunnen & Taschner, 2011: http://lsdb.hgu.mrc.ac.uk/variants.php?select_db=PAX6&action=view_all) para establecer si está descrito previamente como mutación o polimorfismo.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó mediante estadística descriptiva y se presentan los resultados clínicos y moleculares contemplando:

Proporción de casos con mutación y tipos específicos de mutaciones por cada patología.

Casos esporádicos o familiares.

Proporción de familiares con expresión mínima o no penetrancia.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

El presente trabajo fue aprobado por los comités de Investigación y Ética del Instituto Nacional de Pediatría y de Investigación de la Asociación Para Evitar La Ceguera en México, IAP, además se solicitó el consentimiento informado de los padres de los pacientes con el diagnóstico de aniridia, anomalía de Peters, glaucoma congénito y anomalía de Axenfeld-Rieger, que cumplieron con los criterios de inclusión, para la obtención de 3-5ml de sangre venosa periférica, lo que representó un riesgo mínimo para el paciente.

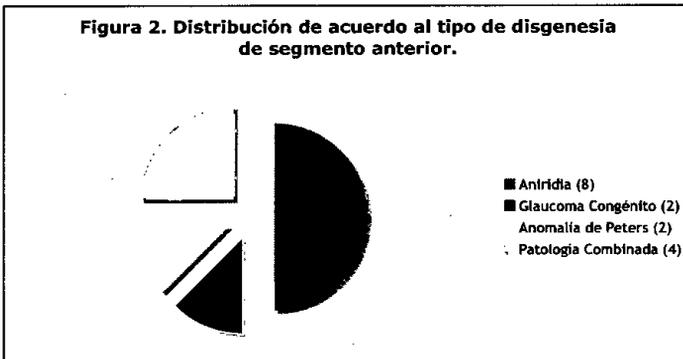
Se solicitó al padre o tutor del paciente que firmara la carta de consentimiento informado del paciente. En caso de mayoría de edad sólo el paciente firmó la carta de consentimiento informado, en el caso de los pacientes mayores de 10 años y menores de 18 años, se solicitó la firma de la carta de asentimiento informado. Así mismo, se solicitó a ambos padres biológicos del paciente, firma del consentimiento informado (Anexo 3) para obtener de cada uno de ellos 3-5 ml. de sangre venosa periférica para la extracción del ADN y así realizar el estudio molecular para definir si el cambio en la secuencia identificado en el paciente con disgenesia de segmento anterior, es heredado u originado como evento *de novo*. La información personal de identidad y del genotipo se manejó de manera confidencial, siguiendo las normas establecidas por la declaración de Helsinki, las Buenas Prácticas Médicas y del ELSI (del inglés "Ethical, Legal and Social Issues"). El asesoramiento genético se brindó en todos los casos de acuerdo a los resultados obtenidos del estudio molecular.

RESULTADOS

Se estudiaron en total 16 casos con diagnóstico de disgenesia de segmento anterior. La edad promedio de los pacientes al momento del estudio fue de 6.77 años, de los 16 casos estudiados 8 corresponden al sexo femenino y 8 al sexo masculino.

Se dividieron de acuerdo a la patología ocular en únicamente 4 grupos, debido a que no obtuvimos pacientes de anomalía de Axenfeld-Rieger, se encuentra ilustrado en la figura 2:

1. Aniridia en el 50% (n=8).
 - Promedio de edad: 8.3 años.
2. Glaucoma congénito en el 12.5% (n=2).
 - Edades: 10 meses y 4 años.
3. Anomalía de Peters en el 12.5% (n=2).
 - Edades: 4 meses y 3 años.
4. Patología combinada en el 25% (n=4).
 - Promedio de edad: 7.5 años.



Del total de los casos estudiados, se revisaron en 8/16 a ambos padres, en 3/16 únicamente a la madre, en 5/16 a ninguno de los padres y en ninguno de estos casos se realizó revisión clínica a hermanos. Al realizar la recopilación de los antecedentes familiares en todos los pacientes, mediante la construcción de la genealogía familiar y al realizar la revisión oftalmológica en los familiares sólo se reportó 1 caso familiar, en el grupo de aniridia, con antecedente de madre y 1 hijo varón afectados, lo cual representa el 6.25% del total de casos.

Al llevar a cabo el análisis por PCR de todos los casos índices y el SSCP de los 11 exones del gen PAX6, se encontraron cambios al amplificar los bordes exón/intrón y secuencias de los exones 2, 6, 8, y 10, como se muestra en la Tabla 3. Al realizar la secuenciación se estableció que 2 eran mutaciones (en el exón 6 y el exón 8) y 2 son polimorfismos localizados en el intrón 2 y el intrón 9, en estado heterocigoto.

De estos cambios, el observado en el exón 8 y el intrón 2 pertenecen al mismo paciente y los cuatro cambios se observaron en pacientes con diagnóstico de aniridia y glaucoma congénito.

TABLA 4. Resultados obtenidos de los 16 pacientes con un corrimiento anormal, analizando los 13 exones y bordes exón-intrón del gen PAX6 mediante la técnica SSCP.

EXÓN	TOTAL DE CAMBIOS
Exón 2	1
Exón 6	1
Exón 8	1
Exón 10	1

TABLA 5. Mutaciones identificadas en 2 de los 16 pacientes con disgenesia de segmento anterior analizando el gen PAX6 por la técnica SSCP y secuenciación automática.

Caso	Exón	Mutación	Dx	Familiar/Único	Descrito en la literatura
AN142	6	c.307C>T p.Arg103X	Aniridia	Único	Si
AN119	8	c.607C>T p.Arg203X	Aniridia	Único	Si

TABLA 6. Polimorfismos identificados en 2 de los 16 pacientes con Disgenesia de segmento anterior analizando el gen PAX6 por la técnica SSCP y secuenciación automática.

Caso	Intrón	Polimorfismo	Dx caso	Familiar/Único	Descrito en la literatura
AN119	Intrón 2	c.-129+9G>A	Aniridia	Único	Si
Glau 21	Intrón 9	c.766-12C>T rs667773	Glaucoma congénito	Único	Si

MUTACIONES Y POLIMORFISMOS CARACTERIZADOS

CASO 1

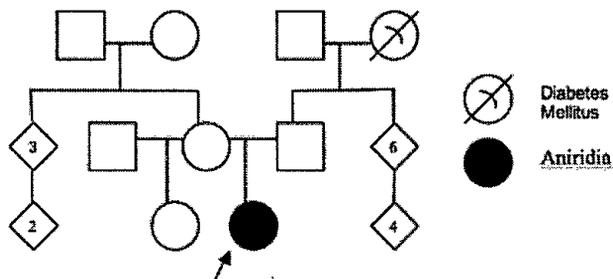


Figura 3. Genealogía del caso AN119

Paciente femenina de 6 meses de edad. Caso único en la familia, ambos padres fueron revisados oftalmológicamente reportándose sanos y no se refieren antecedentes en la familia. Acude a consulta por presentar aniridia bilateral, glaucoma bilateral secundario, cataratas bilaterales y nistagmo, sin otra afección a nivel sistémico.

Diagnóstico molecular. Al analizar los 13 exones mediante SSCP se visualizó un cambio en el corrimiento en el exón 8. Se realizó secuenciación de este exón en el caso índice y en el electroferograma de la secuenciación se definió un cambio puntual que condiciona una mutación sin sentido (c.607C>T/p.Arg203X) que da como resultado una proteína trunca.

El análisis de la secuencia muestra una transición C por T que ocurre en el nucleótido 969 en la región de unión (LNK) rica en glicina del gen *PAX6* y condiciona el cambio de un codón de Arginina (CGA) por un codón de paro (UGA), que resulta en una proteína trunca. Por el momento queda pendiente el análisis molecular en los padres.

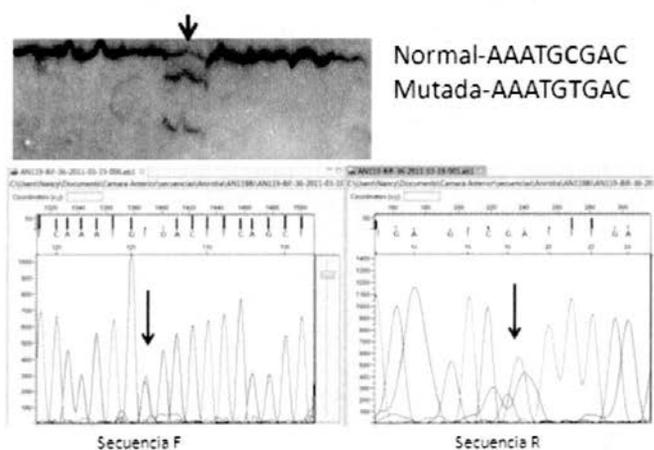


Figura 3. SSCP y electroferograma donde se señala la mutación en estado heterocigoto c.607C>T en el exón 8. El SSCP (arriba) muestra la alteración en el patrón de migración de la muestra con el cambio en el carril señalado con la flecha, el resto de los carriles corresponde a muestras de pacientes sin la alteración en el exón 8. El electroferograma muestra la mutación en estado heterocigoto (flechas).

CASO 2

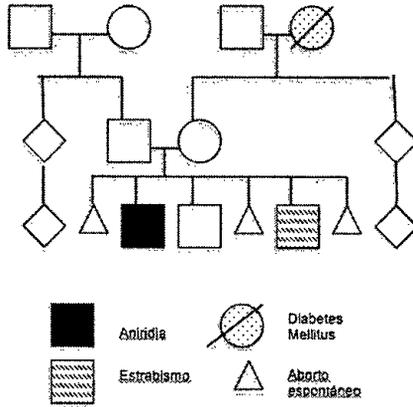


Figura 4. Genealogía del caso AN142

Paciente femenina de 12 años de edad, sin antecedentes familiares de patología ocular, ambos padres fueron revisados clínicamente y se reportaron como sanos. Acudió a consulta por presentar aniridia subtotal bilateral, glaucoma bilateral, subluxación bilateral de cristalino y nistagmo. No presenta alteración en otro órgano o sistema.

Diagnóstico molecular. Al analizar, únicamente en el caso índice, los 13 exones del gen *PAX6* mediante SSCP se visualizó un cambio en el corrimiento en el exón 6. Se realizó secuenciación de este exón en el caso índice y en el electroferograma de la secuenciación se definió un cambio puntual que condiciona una mutación sin sentido en el exón 6 (c.307C>T/p.Arg103X) que resulta en una proteína trunca.

El análisis de la secuencia muestra una transición C>T en el nucleótido 669, dentro la región C-terminal del dominio pareado del gen *PAX6*, lo que ocasiona un cambio del codón de Arginina (CGA) por un codón de paro (TGA) que a su vez resulta en una proteína trunca de 102 aminoácidos. El estudio molecular queda pendiente aún en los padres.

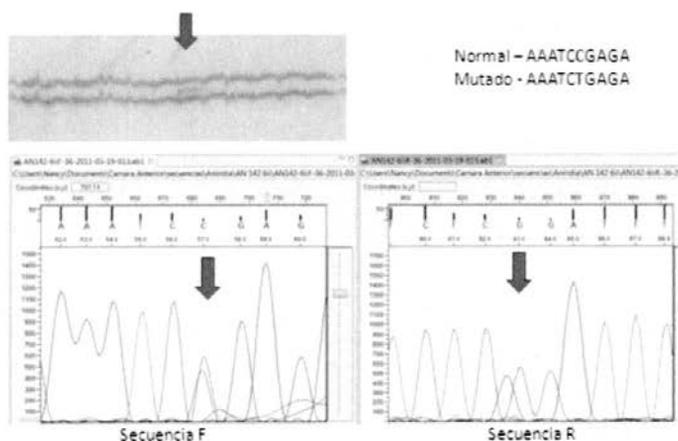


Figura 5. SSCP y electroferograma de la mutación en estado heterocigoto c.307C>T en el exón 6. El SSCP muestra la alteración en el patrón de migración anormal con el cambio en el carril señalado con la flecha, el resto de los carriles corresponde a muestras de pacientes sin alteración en el exón 6. El electroferograma muestra la mutación en estado heterocigoto (flechas).

POLIMORFISMOS

POLIMORFISMO 1

Se encontró un polimorfismo al estudiar a los 16 casos índices con cambio electroforético en el SSCP en el exón 2 del gen *PAX6* en 1 paciente. Con la secuenciación se determinó un cambio de un nucleótido a nivel intrónico en la posición c.-129+9G>A.

Se realizó búsqueda en la base de datos de LOVD del gen *PAX6* y se encontró que ha sido reportado en 2 ocasiones. Villarroel et al., en un estudio realizado en 103 controles mexicanos sanos, encontró 19 con el polimorfismo en estado heterocigoto y 2 en estado homocigoto; mediante análisis *in silico* utilizando el programa SIFT y NetGene Server este autor determinó que el cambio no afecta ninguna señal de splicing ni modifica secuencias reguladoras de splicing.

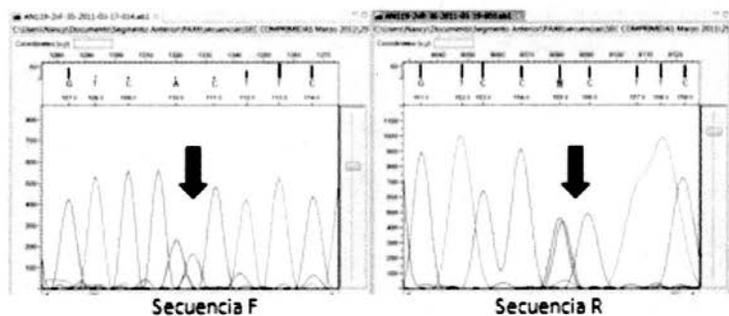


Figura 6. Electroferograma del polimorfismo previamente reportado a nivel intrónico c.-129+9G>A en el intrón 2. El electroferograma muestra el cambio en estado heterocigoto.

POLIMORFISMO 2

Al analizar a los 16 pacientes por SSCP del exón 10, en 1 paciente se detectó un cambio en el patrón electroforético. En el análisis del electroferograma de la secuenciación se encontró un cambio de un solo nucleótido en estado heterocigoto a nivel del intrón 9 en la posición c.766-12C>T.

El polimorfismo citado se encuentra ya reportado en la base de datos de SNPs del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/snp/>) con un rs667773 y en la base de datos LOVD del gen *PAX6* como IVS9-12C>T, donde ha sido reportado en 8 ocasiones y se ha citado que dicho cambio no produce ningún efecto sobre la proteína.

Tabla 7. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo IVS9-12C>T del gen *PAX6* reportadas en la base de datos de SNP del NCBI.

Población	Grupo poblacional	Alelos		Genotipo		
		C	T	C/C	C/T	T/T
Hap-Map-CEU	Europeos	0.947	0.053	0.903	0.088	0.009
Hap-Map-HCB	Asiáticos	0.791	0.209	0.628	0.326	0.047
Hap-Map-JPT	Asiáticos	0.890	0.110	0.791	0.198	0.012
Hap-Map-YRI	Africanos	0.956	0.044	0.912	0.088	-
Hap-Map-CHB	Asiáticos	0.841	0.159	0.732	0.270	0.049
Hap-Map-MEX	Mexicano	0.830	0.170	0.660	0.340	-

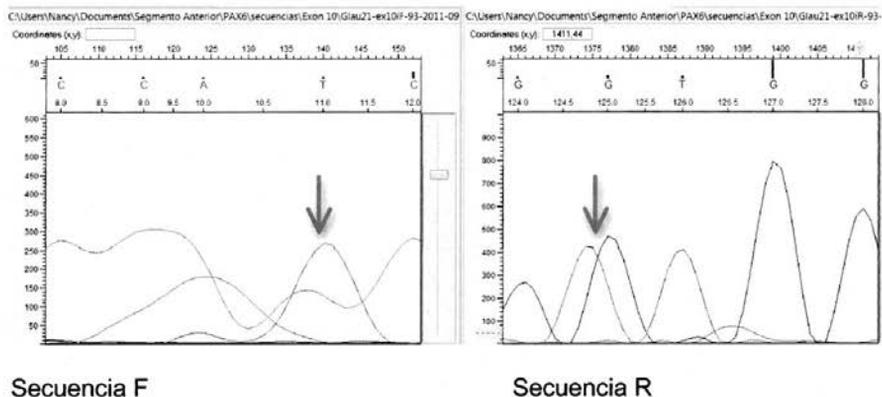


Figura 7. Electroferograma del polimorfismo previamente reportado a nivel intrónico c.766-12C>T en el intrón 9 del gen *PAX6*. 5a. El SSCP muestra la alteración en el patrón de migración anormal con el cambio en el carril (flecha). 5b. El electroferograma muestra un cambio en la secuencia en borde del intrón 9/exón 10 en estado heterocigoto.

DISCUSIÓN

Las disgenesias de segmento anterior son un grupo de patologías que involucran diversos tejidos a nivel ocular (iris, córnea y cristalino) generando diferentes patologías con un defecto primario común.

El presente estudio tuvo como principal objetivo caracterizar las mutaciones y polimorfismos en el gen *PAX6* en una muestra de pacientes mexicanos con diagnóstico de aniridia, glaucoma congénito, anomalía de Peters, anomalía de Axenfeld-Rieger o patología combinada.

Se analizó un total de 16 pacientes que se clasificaron en 4 grupos principales, en mayor frecuencia se encuentra el grupo de aniridia (50%), seguido del grupo de patología combinada (25%) y en último lugar se encuentran el grupo de glaucoma congénito y anomalía de Peters (12.5%). No se capturaron pacientes en el grupo de anomalía de Axenfeld-Rieger.

En todos los casos se obtuvieron datos mediante interrogatorio, pero sólo en la mitad de los casos se logró revisión oftalmológica en ambos progenitores, en 3 sólo en uno y en 5 en ninguno, esto podría significar un sesgo debido a que podría omitirse algún caso familiar debido a la presencia de un fenotipo patológico leve en alguno de los parientes de primer grado. Sólo en 1 caso índice se reportó de manera clara el antecedente familiar con el diagnóstico de Aniridia en el paciente y en la madre, sin embargo no se logró identificar mutaciones en este paciente; hasta el momento *PAX6* es el único gen causal

asociado a aniridia descrito en la mayoría de los pacientes con esta patología, sin embargo, aún queda una proporción de pacientes en quienes se estudió *PAX6* y no se encontró mutación en este gen. Lo anterior podría explicarse por diferentes razones: a) las mutaciones pudieran localizarse fuera de la región genómica estudiada, en enhancers o silenciadores, en la región promotora o en secuencias intrónicas distantes, b) deleciones grandes que no se detectan por la técnica de secuenciación, metodología molecular utilizada en este estudio, por lo que para analizar esta posibilidad se requiere realizar otras técnicas como: Southern blot, PCR genómico cuantitativo, RT-PCR con RNA total extraído de líneas celulares linfoblastoides o de linfocitos, c) mutación en otro gen causal: existen casos publicados con fenotipos similares a aniridia en los que se considera la posibilidad de ser condicionados por otros genes desconocidos (27).

Respecto a las edades, se encontró la mayor edad en aniridia con 8.3 años y la menor en Peters con 4 meses. Debido a la limitación del tamaño pequeño de muestra, no es posible establecer un promedio de edad.

El gen *PAX6* fue el primero en ser descrito como gen candidato en el grupo de patologías oculares con disgenesias del segmento anterior, dada su expresión principalmente en iris, cristalino, epitelio corneal y retina del ojo en desarrollo y a su participación en establecer los ejes oculares. El espectro de mutaciones en este gen causan diferentes fenotipos oculares (coloboma de nervio óptico, hipoplasia de nervio óptico y diversas malformaciones de éste, nistagmo congénito, ectopia pupilar debido a su expresión en los diferentes tejidos del

ojo, sin embargo el mayor porcentaje de éstas se han reportado en aniridia (5, 29). En el análisis realizado en el presente estudio, en cuanto al porcentaje de detección de mutaciones, este fue bajo, ya que sólo se detectaron 2 mutaciones (12.5%) en estado heterocigoto y dos polimorfismos en 2 pacientes (12.5%), del total de pacientes con disgenesias de segmento anterior. Las mutaciones se encontraron en el grupo de aniridia 2/8 (25%). Lo anterior se encuentra acorde con el estudio realizado por Villarroel et. al (2008) en 30 pacientes con aniridia en población mexicana, donde se encontró un porcentaje del 30% de mutaciones en el gen *PAX6*. Sin embargo existen series con reportes que van desde un 55% hasta un 80% (Gronskov et al, 2001; Vincent et al, 2003). Estos resultados apoyan el hecho de que las mutaciones en el gen *PAX6* son una causa frecuente de aniridia; sin embargo existe aún un gran porcentaje de casos sin mutación caracterizada hasta en un 40% (Glaser et al., 1992), una posible explicación a ellos es que la técnica SSCP y secuenciación empleada no puede detectar rearrreglos genómicos grandes como deleciones. En este trabajo otra de las limitantes fue que contamos con un número reducido de pacientes en comparación a otras series (28).

En el grupo de anomalía de Peters, glaucoma congénito y patología combinada no se logró identificar ninguna mutación en *PAX6*, así mismo no obtuvimos pacientes con diagnóstico de anomalía de Axenfeld-Rieger. Lo anterior se encuentra acorde a nuestra hipótesis de estudio donde se propuso que en el caso de anomalía de Peters se esperaba encontrar mutaciones en un porcentaje inferior al 10%, ya que este grupo de disgenesias son debidos en la mayoría de los casos a mutaciones en otros genes de los cuales destacan

PITX2, *FOXC3* y *CYP1B1*; así mismo no se esperaba encontrar mutaciones en *PAX6* en glaucoma congénito, donde la mayoría de los casos son debidos a mutaciones en el gen *CYP1B1*, otra explicación por la que no observamos mutaciones en anomalía de Peters o glaucoma congénito sería al tamaño pequeño de muestra analizada.

En el caso de anomalía de Rieger aún no se han reportado mutaciones en este gen, sin embargo, se propone la posibilidad de ser el gen causal en un porcentaje mínimo (29).

La mutación sin sentido c.607C>T (p.R203X) en el exón 8, donde ocurre un cambio de un codón de arginina (CGA) por un codón de paro (UGA), es una de las mutaciones más comunes en aniridia. Esta mutación ha sido reportada previamente en la literatura en 24 ocasiones, de los cuales 9 son familiares (Martha A ,et al., 1995; Axton R, et al., 1997; Love J, et al, 1998; Chao LY, et. al, 2000; Kondo-Saltah A, et al., 2000; Yasuda T, et al., 2002; Gronskov K, et al., 2001; Chao LY, Strong IC y Saunders GF, 2003); 11 casos únicos (Vincent MC, Olivier D y Calvas P, 2003; Chao LY, Strong IC y Saunders GF, 2003; Chavarria-Soley G, et al., 2006; Atchaneeyasakul LO, et al., 2006; Hever AM, Williamson KA y van Heynigen V, 2006; Villarroel CE, et al., 2008; Hingorani, 2009) y en 4 donde no se define el modo de herencia (Wolf MT et. Al 1998; Hever AM, Williamson KA y van Heynigen V, 2006; Brémond-Gignac D, et al., 2010).

Esto refleja que se trata de una de las mutaciones más frecuentes en el gen *PAX6* y podría explicarse por la prevalencia de dinucleótidos CpG en la región que tienden a ser metilados y que consecuentemente al sufrir una deaminación espontánea de los residuos de citosina, favorecen las sustituciones C>T. Lo anterior, en esta mutación, genera un codón de paro prematuro y por lo tanto, falla en la síntesis proteica (28). En cuanto al fenotipo de los 24 pacientes reportados con esta mutación, 19 se reportaron como aniridia aislada, mientras que en el resto se reportaron diversas anomalías oculares como catarata, glaucoma, nistagmo e hipoplasia foveal, y otras afecciones sistémicas como intolerancia a la glucosa en 2 casos. Con relación a esto último recientemente se ha propuesto una relación con alteraciones pancreáticas y mutaciones en *PAX6*.

En diversos estudios llevados a cabo en ratones con alteraciones pancreáticas, se logró demostrar que el gen *PAX6* se encuentra involucrado al ser un factor de transcripción regulador en la diferenciación del páncreas endócrino. Yasuda et al., 2002 llevaron a cabo un estudio donde se analizaron 5 pacientes con aniridia con intolerancia a la glucosa para tratar de identificar mutaciones en *PAX6* relacionadas; sin embargo no observó mutaciones en ninguno de estos pacientes. Los casos reportados desarrollan la intolerancia a la glucosa entre los 28 y 54 años de edad, esto sugiere que mutaciones en *PAX6* por si solas, no son suficientes para inducir diabetes o intolerancia a la glucosa, sino que el fenotipo podría ser el resultado de la suma de otros factores como la dieta. Para poder establecer una relación causal se requiere el estudio de un mayor número de pacientes y familias con diagnóstico de aniridia y alteraciones pancreáticas.

Algunos autores recomiendan vigilar y evaluar dirigidamente en pacientes con aniridia, la presencia de alguna alteración en Sistema Nervioso Central y/o pancreático (30).

En cuanto el fenotipo de nuestro caso detectado con la mutación c.607C>T, presentaba aniridia, nistagmo, glaucoma y catarata bilateral, lo cual se encuentra dentro de lo previamente reportado. En este paciente no se descarta la posibilidad de que curse con intolerancia a la glucosa a lo largo de su vida, al momento de su ingreso a este estudio tenía 6 meses de edad por lo que no se buscó intencionadamente la posibilidad de que cursará con intolerancia a la glucosa ya que la edad de inicio reportada en la literatura se refiere más tardíamente entre los 30-50 años. Se trata de un caso aislado, donde los padres se encontraban, por exploración oftalmológica, clínicamente sanos; aunque queda pendiente el estudio molecular en ellos.

Respecto a la mutación sin sentido c.307C>T (p.Arg103X) en el exón 6, que produce un cambio del codón de Arginina (CGA) por un codón de paro (UGA), se traduce en la generación de una proteína trunca. Esta mutación ha sido descrita previamente en la literatura en 4 ocasiones, de los cuales 3 son familiares (Glaser T, Jepeal L, et al., 1994; Saunder and Chao, 1998; Wildhardt G) y 1 no refiere modo de herencia (Chavarria-Soley G, et al., 2006), en 2 de ellos se describe únicamente aniridia, en otro caso con antecedente de subluxación de cristalino en la madre del caso índice y en otro se reportó un fenotipo severo en el cual el caso índice presentaba malformaciones severas como microftalmia, arrinia y malformaciones severas de SNC.

Cabe puntualizar que este último caso heredó 2 mutaciones patológicas por parte de ambos padres, además de la mutación aquí descrita presentaba la mutación que genera una proteína trunca (p.Ser353X) explicando la severidad del fenotipo del paciente, esta mutación provenía del padre, quien presentaba únicamente cataratas congénitas. Mediante un estudio realizado por Glaser et al., 1994 se evidenció la relación directa entre el desarrollo adecuado de las estructuras del Sistema Nervioso Central y la cantidad de transcritos de *PAX6* presentes en el embrión. Se ha demostrado una alta expresión de los niveles de *PAX6* durante el desarrollo del ojo, bulbo olfatorio, epitelio nasal y techo de la neocorteza; por lo que en este paciente al heredar dos mutaciones patológicas se sugiere presenta un efecto de dosis que resulta en una mayor severidad del fenotipo (5, 7). En cuanto a nuestro paciente, se trata de un caso esporádico, ya que ambos padres se reportaron por revisión oftalmológica como sanos sin embargo queda pendiente el estudio molecular en ellos, por lo que no se descarta no penetrancia o expresión mínima.

En cuanto al polimorfismo c.-129+9G>A (IVS2+9G>A) en el intrón 2, en el mismo paciente con la mutación c.607C>T (p.R203X) en el exón 8, había sido reportado previamente como probablemente patogénica (Dansault et al., 2007) debido a que fue descrito en un caso esporádico que cursaba con microftalmia y otras anomalías oculares (5, 27). Sin embargo esto no logró demostrarse en un estudio realizado en 200 individuos sanos además los estudios *in silico* de esta variante predicen que la capacidad de unión del sitio donador no se vería afectada.

Villarroel et al. 2008, en un estudio en 103 recién nacidos sanos mexicanos, encontraron esta variante en estado heterocigoto en 19 individuos y en estado homocigoto en 2 (28). Por lo anterior se infirió que la variante IVS2+9G>A funciona como un polimorfismo neutral y por lo tanto no es responsable del fenotipo patológico.

El segundo polimorfismo c.766-12C>T (IVS9-12C>T), ocurre en el dominio pareado del gen *PAX6* y ya ha sido reportado previamente en 8 ocasiones y se ha descrito que no tiene efecto alguno sobre la proteína. Tiene asignado un número de referencia y está reportado en diferentes poblaciones variando las frecuencias genotípicas donde prevalece el genotipo homocigoto del alelo mayor C/C y el genotipo heterocigoto C/T en todas las poblaciones estudiadas. En nuestro estudio solamente encontramos 1 paciente con el genotipo C/T y ninguno con el genotipo T/T, lo cual se encuentra similar a lo reportado en otras poblaciones descritas en la tabla 7, de acuerdo a las frecuencias genotípicas y alélicas encontradas en la base de datos de SNP del NCBI (28).

CONCLUSIONES

Al realizar el estudio de disgenesias de segmento anterior, una gran proporción pertenecía al grupo de aniridia (50%), esto pudo deberse al tamaño de la población estudiada y a que el estudio se llevó a cabo en un centro de referencia de tercer nivel.

Al analizar el gen *PAX6* sólo se logró caracterizar la mutación causal en 2 casos índices en el grupo de aniridia, ya reportadas previamente en otras poblaciones, así como 2 polimorfismos ya descritos en la población mexicana y en otras poblaciones.

El fenotipo en ambos casos con mutación caracterizada fue acorde a las características ya descritas en los reportes previos que se encuentran publicados en el sitio Laiden Open Variation Database.

No se logró identificar mutaciones en *PAX6* en otras disgenesias de segmento anterior como anomalía de Peters, glaucoma congénito y anomalía de Rieger.

Se conocen diversos genes que son causales de las diferentes disgenesias de segmento anterior, entre ellos *PITX2*, *FOXE3*, *CYP1B1*, *PITX3* y *MAF* principalmente, los cuales podrían ser los causales de las disgenesias de segmento anterior observadas en los pacientes que se incluyeron en este estudio en donde no se caracterizó mutación en *PAX6*.

La técnica SSCP no puede detectar rearrreglos genómicos grandes, lo que explicaría los casos, principalmente de aniridia, en los que no se encontró mutación en *PAX6*, por lo que se podría aumentar el índice de detección de mutaciones usando diferentes técnicas: Southern blot, PCR genómico cuantitativo, RT-PCR con RNA total.

ANEXOS

ANEXO 1

Dx

HOJA DE CAPTACIÓN

1. Ficha de Identificación:

Nombre: _____

Edad: _____ Sexo: _____ Expediente: _____ Folio: _____

Nombre del

Padre: _____

Nombre de la

Madre: _____

Dirección: _____

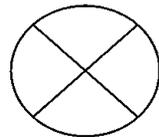
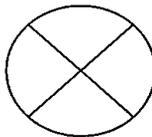
Teléfono: _____

-

2. Árbol Genealógico

3. Exploración Física

	OD	OI
AV		
CV		
PIO		



ANGULO	OD		OI	
	SI	NO	SI	NO
Procesos Iridianos largos				
Sinéquias Anteriores				

Otras alteraciones (especificar)				
----------------------------------	--	--	--	--

CORNEA	OD		OI	
	SI	NO	SI	NO
Medidas (vertical y horizontal)				
Transparente				
Embriotoxón Posterior				
Leucoma no adherente				
Leucoma adherente				
Megalocórnea				
Estrías de Haab				
Buftalmos				

CAMARA ANTERIOR	OD		OI	
	SI	NO	SI	NO
Amplia y Formada				

IRIS	OD		OI	
	SI	NO	SI	NO
Regular				
Reactivo				
Corectopia				
Policoria				
Sinequias Anteriores				
Sinequias Posteriores				
Hipoplasia Iridiana				
Aniridia Total				
Aniridia Subtotal				

CRISTALINO	OD		OI	
	SI	NO	SI	NO
Transparente				
Catarata (especificar tipo)				

OD	POLO POST.	OI
	Papila	
	Mácula	
	Retina	
	Otros	

OTRAS ALTERACIONES OCULARES

OTRAS ALTERACIONES SISTÉMICAS

Nombre de quien

realizó: _____ Fecha: _____

ANEXO 2

"ANÁLISIS MOLECULAR DE LOS GENES CYP1B1, PAX6, PITX2 Y FOXC1 EN PACIENTES MEXICANOS CON ANOMALÍAS DEL SEGMENTO ANTERIOR INCLUYENDO: GLAUCOMA CONGÉNITO, ANIRIDIA, ANOMALÍA Y SÍNDROME DE AXENFELD-RIEGER Y ANOMALÍA DE PETERS"

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PACIENTE

México, D.F., a ____ de _____ del 20__

Por medio de la presente hago constar que estoy de acuerdo en que mi hija (o) _____ participe en el proyecto "Análisis molecular de los genes CYP1B1, PAX6, PITX2 Y FOXC1 en pacientes mexicanos con anomalías del segmento anterior incluyendo: Glaucoma congénito, Aniridia, Anomalia y Síndrome de Axenfeld-Rieger y Anomalia de Peters", que se lleva a cabo en el Instituto Nacional de Pediatría, Hospital General de México y en Asociación para evitar la Ceguera en México, I.A.P.

Se me ha explicado que para la realización del estudio, se requiere una muestra de sangre periférica de 5-10 ml. tomada por personal calificado y bajo todas las medidas de seguridad, como son el uso de equipo estéril y desechable, así como el uso de guantes. Se me ha explicado que por la toma de la muestra ocasionalmente se presenta leve molestia al momento de la venopunción y de manera infrecuente, hematoma (moretón) e inflamación local que resuelve a los pocos días.

De igual forma, me han informado que de esta muestra se obtendrá el material genético (DNA) de mi hijo el cual determina sus características físicas y de éste se analizarán regiones que pueden ser las responsables de la enfermedad ocular que presenta. Se me ha explicado, que el presente estudio busca conocer las causas genéticas de la enfermedad y la probabilidad de que esta se repita en mi familia.

Entiendo que los datos personales de mi hijo en el estudio serán mantenidos en estricta confidencialidad y no será compartida con terceros como empleadores, aseguradoras, escuelas, otros familiares, etc., si no es con mi autorización expresa y por escrito. Sin embargo, autorizo que la información necesaria para el análisis de los resultados, pueda ser evaluada y revisada por los médicos e investigadores del presente Proyecto. De igual forma, se me ha asegurado que toda la información clínica e impresa de mi hijo recabada para el presente proyecto, quedará resguardada bajo llave y los datos clínicos y genéticos en archivos electrónicos quedarán encriptados. Sólo los investigadores responsables del proyecto tendrán la llave y la clave de acceso a esta información para preservar la confidencialidad.

Se me ha informado que la muestra de DNA de mi hijo quedará codificada bajo una clave que no incluya mi nombre y datos clínicos en el contenedor de dicha muestra, y ésta quedará bajo el resguardo del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Pediatría, de la Secretaría de Salud por un periodo indefinido y acepto que esta muestra sea empleada para futuros estudios de investigación encaminados al estudio de alteraciones oculares de cámara anterior hasta que mi hijo cumpla la mayoría de edad y preservando siempre la confidencialidad de la información derivada. Además, en el entendido que la participación de mi hijo es total y absolutamente voluntaria,

podemos abandonar el estudio y retirar el consentimiento informado en cualquier momento sin que esto tenga ningún tipo de repercusión en la atención de mi hijo en cualquier servicio de la Institución.

DECLARACION DE CONSENTIMIENTO

Declaro que en forma libre y sin que nadie me presione decido que mi hijo participe en este estudio, una vez que he leído cuidadosamente esta forma y se me ha explicado en forma clara en que consiste este estudio. Así mismo entiendo que nuestra participación no conlleva ningún tipo de compensación económica. Finalmente hago constar que se me ha informado que ninguno de los estudios derivados del presente proyecto de investigación, tendrán un costo para mí.

Atentamente,

_____	_____	_____
Padre, Madre o tutor	Firma	Fecha

_____	_____	_____
Nombre Testigo	Dirección	Fecha y Firma

_____	_____	_____
Nombre Testigo	Dirección	Fecha y Firma

Obtuvo el consentimiento: _____

Nombre	Fecha
--------	-------

Investigador responsable: Dra. Ariadna Estela González del Angel. Laboratorio de Biología Molecular, 9º Piso de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría, S.S. Tel. 10840900 ext. 1306.

Presidente del Comité de Ética: Dr. Marco Antonio Yamazaki. Tel. 10 84 09 00 ext. 1581.

ANEXO 3

"ANÁLISIS MOLECULAR DE LOS GENES CYP1B1, PAX6, PITX2 Y FOXC1 EN PACIENTES MEXICANOS CON ANOMALÍAS DEL SEGMENTO ANTERIOR INCLUYENDO: GLAUCOMA CONGÉNITO, ANIRIDIA, ANOMALÍA Y SÍNDROME DE AXENFELD-RIEGER Y ANOMALÍA DE PETERS"

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO FAMILIARES

México, D.F., a ____ de _____ del 20__

Por medio de la presente hago constar que yo _____,

padre (madre u otro parentesco) _____ del paciente

_____ estoy de acuerdo en participar en el proyecto "Análisis molecular de los genes CYP1B1, PAX6, PITX2 Y FOXC1 en pacientes mexicanos con anomalías del segmento anterior incluyendo: Glaucoma congénito, Aniridia, Anomalia y Síndrome de Axenfeld-Rieger y Anomalia de Peters", que se lleva a cabo en el Instituto Nacional de Pediatría, Hospital General de México y en Asociación para evitar la Ceguera en México, I.A.P.

Se me ha explicado que para la realización del estudio, se requiere una muestra de sangre periférica de 5-10 ml. tomada por personal calificado y bajo todas las medidas de seguridad, como son el uso de equipo estéril y desechable, así como el uso de guantes. Se me ha explicado que por la toma de la muestra ocasionalmente se presenta leve molestia al momento de la venopunción y de manera infrecuente, hematoma (moretón) e inflamación local que resuelve a los pocos días.

De igual forma, me han informado que de esta muestra se obtendrá mi material genético (DNA) el cual determina mis características físicas y de éste se analizarán regiones que pueden ser las responsables de la enfermedad ocular que presenta mi hijo(a). Se me ha explicado, que el presente estudio busca conocer las causas genéticas de la enfermedad y la probabilidad de que esta se repita en mi familia.

Entiendo que mis datos personales serán mantenidos en estricta confidencialidad y no será compartida con terceros como empleadores, aseguradoras, escuelas, otros familiares, etc., si no es con mi autorización expresa y por escrito. Sin embargo, autorizo que la información necesaria para el análisis de los resultados, pueda ser evaluada y revisada por los médicos e investigadores del presente Proyecto. De igual forma, se me ha asegurado que toda la información clínica e impresa de mi hijo recabada para el presente proyecto, quedará resguardada bajo llave y los datos clínicos y genéticos en archivos electrónicos quedarán encriptados. Sólo los investigadores responsables del proyecto tendrán la llave y la clave de acceso a esta información para preservar la confidencialidad.

Se me ha informado que mi muestra de DNA quedará codificada bajo una clave que no incluya mi nombre y datos clínicos en el contenedor de dicha muestra, y ésta quedará bajo el resguardo del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Pediatría, de la Secretaría de Salud por un periodo indefinido y acepto que esta muestra sea empleada para futuros estudios de investigación encaminados al estudio de alteraciones oculares de cámara anterior. Además, en el entendido que mi participación

ANEXO 4

“ANÁLISIS MOLECULAR DE LOS GENES CYP1B1, PAX6, PITX2 Y FOXC1 EN PACIENTES MEXICANOS CON ANOMALÍAS DEL SEGMENTO ANTERIOR INCLUYENDO: GLAUCOMA CONGÉNITO, ANIRIDIA, ANOMALÍA Y SÍNDROME DE AXENFELD-RIEGER Y ANOMALÍA DE PETERS”

CARTA DE ASENTIMIENTO INFORMADO PACIENTE

México, D.F., a ____ de _____ del 20 ____

Por medio de la presente hago constar que yo _____, estoy de acuerdo en participar en el proyecto “Análisis molecular de los genes CYP1B1, PAX6, PITX2 Y FOXC1 en pacientes mexicanos con anomalías del segmento anterior incluyendo: Glaucoma congénito, Aniridia, Anomalía y Síndrome de Axenfeld-Rieger y Anomalía de Peters”, que se lleva a cabo en el Instituto Nacional de Pediatría, Hospital General de México y en Asociación para evitar la Ceguera en México, I.A.P.

Se me ha explicado que para la realización del estudio, se requiere una muestra de sangre periférica de 5-10 ml. tomada por personal calificado y bajo todas las medidas de seguridad, como son el uso de equipo estéril y desechable, así como el uso de guantes. Se me ha explicado que por la toma de la muestra ocasionalmente se presenta leve molestia al momento de la venopunción y de manera infrecuente, hematoma (moretón) e inflamación local que resuelve a los pocos días.

De igual forma, me han informado que de esta muestra se obtendrá mi material genético (DNA) el cual determina mis características físicas y de éste se analizarán regiones que pueden ser las responsables de la enfermedad ocular que presento. Se me ha explicado, que el presente estudio busca conocer las causas genéticas de la enfermedad y la probabilidad de que esta se repita en mi familia.

Entiendo que mis datos personales en el estudio serán mantenidos en estricta confidencialidad y no será compartida con otras personas. Sin embargo, autorizo que la información necesaria para el análisis de los resultados, pueda ser evaluada y revisada por los médicos e investigadores del presente Proyecto. De igual forma, se me ha asegurado que toda mi información clínica e impresa quedará resguardada bajo llave y los datos clínicos y genéticos en archivos electrónicos cerrados. Sólo los investigadores responsables del proyecto tendrán la llave y la clave de acceso a esta información para preservar la confidencialidad.

Se me ha informado que mi muestra de DNA quedará registrada bajo una clave que no incluya mi nombre y datos clínicos en el contenedor de dicha muestra, y ésta quedará bajo el resguardo del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Pediatría, de la Secretaría de Salud por un periodo indefinido y acepto que esta muestra sea empleada para futuros estudios de investigación encaminados al estudio de alteraciones oculares de cámara anterior hasta que yo cumpla la mayoría de edad y preservando siempre la confidencialidad de la información derivada. Además, en el entendido que mi participación es total y absolutamente voluntaria, puedo abandonar el estudio y retirar el consentimiento informado en cualquier momento sin que esto tenga ningún tipo de repercusión en mi atención hijo en cualquier servicio de la Institución.

ANEXO 5

Secuencia de pares de primers (Love J, 1998) para amplificación por PCR de los 13 exones y los bordes exón-intrón del gen *PAX6*.

Exón	Primer	Secuencia (5',3')	Amplificación (pb)
1	1F	AGGGAACCGTGGCTCGGC	207
	1R	GGGTGAGGGAAGTGGCTGC	
2	2iF	TTATCTCTCACTCTCCAGCC	178
	2iR	CTGTTGTTGCTTGAAGACCAC	
	2iiF	AAACTCTCACCAGCAACTCC	
	2iiR	GGAGACCTGTCTGAATATTGC	
3	3F	TCAGAGAGCCCATDGACGTATT	193
	3R	CTGTTTGTGGGTTTTGAGCC	
4	4F	TTGGGAGTTCAGGCCTACCT	153
	4R	GAAGTCCCAGAAAGACCAGA	
5	5iF	CTCTTCTCCTCTTCACTCTG	163
	5iR	CGCTGTGAGCTAGCTCTAC	
	5iiF	CGGTGGTGTCTTTCTCAACG	
	5iiR	AGAGGGCGTTGAGAGTGG	
5a	5aF	CTCTACAGTAAGTTCTCATACC	173
	5aR	GGAAGTGGACAGAAAACCAC	

	6iF	TGGTTTTCTGTCCACTTCCC	
			167
6	6lr	GCACTCCCGCTTATACTGG	
	6iiF	CCGAGAGTAGCGACTCCAG	184
	6iiR	AGGAGAGAGCATTGGGCTTA	
	7iF	GTGAGCTGAGATGGGTGA	175
7	7iR	CTTCCGGTCTGCCCGTTC	
	7iiF	ATGGGCGCACGACGGCATG	171
	7iiR	GACAGGCAAAGGGATGCAC	
	8iF	CCCTTTTGGAGGCTCCAAG	185
8	8lr	GATGTTCTATTTCTTTGCAGC	
	8iIF	TCCAACGGAGAAGATTCAG	176
	8iIR	TCTTTGTAAGATGTGGC	
	9F	GTAGTTCTGGCACAATATGG	206
9	9R	GTAAGTCTGTACAAGCACCTC	
	10iF	CTCGACGTAGACACAGTGC	175
10	10iR	AATTGGTTGGTAGACACTGG	
	10iiF	TCAGAGAAGACAGGCCAGC	153
	10iiR	CCCGGAGCAAACAGGTTTAA	
	11F	TAAACCTGTTTGCTCCGGG	208
11	11R	TTATGCAGGCCACCACCAGC	
	12iF	GCTGTGTGATGTGTTCTCA	168
12	12iR	GATGTTTCATGTGTGTCTGC	
	12iiF	CTGCATGCTGCCACCAG	163
	12iiR	AAGAGAGATCGCCTCTGTGC	

13

13F

CATGCTGTTTCTCAAAGG

202

13R

CCATAGTCACTGACTGAATTAACAC

ANEXO 6

CONDICIONES PARA AMPLIFICACIÓN DE LOS 13 EXONES Y LOS BORDES EXÓN-INTRÓN DEL GEN PAX6 EN EL TERMOCICLADOR APPLIED BIOSYSTEMS MODELO GENE AMP PCR SYSTEM 2720				
Exón	Desnaturalización	Alineación	Extensión	Ciclos
1	95°C (20 seg)	66°C (20 seg)	72°C (15 seg)	35
2i	95°C (20 seg)	55° C (20 seg)	72°C (35 seg)	35
2ii	95°C (20 seg)	55° C (20 seg)	72°C (35 seg)	35
3	95°C (20 seg)	54°C (20 seg)	72°C (35 seg)	35
4	95°C (20 seg)	56°C (20 seg)	72°C (35 seg)	35
5a	95°C (20 seg)	56°C (20 seg)	72°C (35 seg)	35
5i	95°C (20 seg)	55°C (20 seg)	72°C (35 seg)	35
5ii	95°C (20 seg)	55°C (20 seg)	72°C (35 seg)	35
6i	95°C (20 seg)	55°C (20 seg)	72°C (35 seg)	35
6ii	95°C (20 seg)	55°C (20 seg)	72°C (35 seg)	35
7i	95°C (20 seg)	66°C (20 seg)	72°C (12 seg)	35
7ii	95°C (20 seg)	66°C (20 seg)	72°C (35 seg)	35
8i	95°C (20 seg)	54°C (20 seg)	72°C (35 seg)	35
8ii	95°C (20 seg)	55°C (20 seg)	72°C (35 seg)	35

9	95°C (20 seg)	55°C (20 seg)	72°C (35 seg)	35
10i	95°C (20 seg)	55°C (20 seg)	72°C (35 seg)	35
10ii	95°C (20 seg)	56°C (20 seg)	72°C (35 seg)	35
11	95°C (20 seg)	57°C (20 seg)	72°C (35 seg)	35
12i	95°C (20 seg)	55°C (20 seg)	72°C (35 seg)	35
12ii	95°C (20 seg)	56°C (20 seg)	72°C (35 seg)	35
13	95°C (20 seg)	55°C (20 seg)	72°C (35 seg)	35

BIBLIOGRAFÍA

1. Kupfer C and Kaiser-Kupfer MI. Observations on the development of the anterior chamber angle with reference to the pathogenesis of congenital glaucomas. *Am J Ophthalmol.* 1979 Sep;88(3 Pt 1):424-6
2. Faisal Idrees, Vaideanu D, Fraser SG, Sowden JC, Khaw PT. A review of Anterior Segment Dysgeneses. *Surv Ophthalmol* 51 (3) May--June 2006.
3. Sowden J. Molecular and developmental mechanisms of anterior segment dysgenesis. *Eye* (2007) 21, 1310–1318
4. Gould D and John S. Anterior segment dysgenesis and developmental glaucomas are complex traits. *Hum Mol Gen*, 2002, 11 (10); 1185-1193.
5. Kokotas H, Petersen MB. Clinical and Molecular aspects of aniridia. *Clin Genet* 2010; 77: 409–420
6. Martha A, Ferrell RE, Mintz-Hittner H et al. Paired box mutations in familial and sporadic aniridia predicts truncated aniridia proteins. *Am J Hum Genet* 1994; 54 (5): 801–811.
7. Alward W. Axenfeld-Rieger Syndrome in the Age of Molecular Genetics. *Am J Ophthalmol* 2000;130:107–115.
8. Shields MB. Axenfeld-Rieger syndrome: a theory of mechanism and distinctions from the iridocorneal endothelial syndrome. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1983;81:736 –784.
9. Fitch N, Kaback M. The Axenfeld syndrome and the Rieger syndrome. *J Med Genet* 1978;15:30 –34.
10. Hanson I, et al. Mutations at the PAX6 locus are found in heterogenous anterior segment malformations including Peter’s anomaly. *Nat Genet.* 6: 168-

173. 1994

11. Sarfarazi M, Akarsu AN, Hossain A, et al: Assignment of a locus (GLC3A) for primary congenital glaucoma (Buphthalmos) to 2p21 and evidence for genetic heterogeneity. *Genomics* 30:171--7, 1995

12. Akarsu AN, Turacli ME, Aktan SG, et al: A second locus (GLC3B) for primary congenital glaucoma (Buphthalmos) maps to the 1p36 region. *Hum Mol Genet* 5:1199--203,1996

13. Stoilov I: The Third Genetic Locus [GLC3C] for Primary Congenital Glaucoma [PCG] Maps to Chromosome 14q24.3. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43: 3015, 2002).

14. Hingorani M, Williamson K, Moore A and van Heyningen. Detailed Ophthalmologic Evaluation of 43 Individuals with *PAX6* Mutations. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50:2581--2590

15. Flomen RH, Vatcheva R, Gorman PA, et al: Construction and analysis of a sequence-ready map in 4q25: Rieger syndrome can be caused by haploinsufficiency of *RIEG*, but also by chromosome breaks approximately 90 kb upstream of this gene. *Genomics* 47:409--13, 1998

16. Stathacopoulos RA, Bateman JB, Sparkes RS, Hepler RS. The Rieger syndrome and a chromosome 13 deletion. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 24:198--203, 1987

17. Semina, E. V. et al. Cloning and characterization of a novel bicoid-related homeobox transcription factor gene, *RIEG*, involved in Rieger syndrome. *Nature Genetics*, 14, 392--399. 1996

18. Nishimura, D. Y. et al. A spectrum of *FOXC1* mutations suggests gene dosage as a mechanism for developmental defects of the anterior chamber of

the eye. *American Journal of Human Genetics*, 68, 364–372

19. Riise R, D'haene B, De Baere E, Grønsvov K, Brøndum-Nielsen K. Rieger syndrome is not associated with PAX6 deletion: a correction to *Acta Ophthalmol Scand* 2001; 79: 201-203. *Acta Ophthalmol.* 2009 Nov;87(8):923.

20. Neilan E, Pikman Y, Kimonis VE. Peters anomaly in association with multiple midline anomalies and a familial chromosome 4 inversion. *Ophthalmic Genet* 2006, 27: 63-65.

22. Ashery-Padan R and Gruss P. Pax6 lights-up the way for eye development. *Current Opinion in Cell Biology* 2001, 13:706–714

21. Azuma N, et al. Mutations of the PAX6 Gene Detected in Patients with a Variety of Optic-Nerve Malformations *Am. J. Hum. Genet.* 72:1565–1570, 2003

22. Churchill AJ, Booth AP, Anwar R, Markham AF. PAX6 is normal in most cases of Peters' anomaly. *Eye* 1998; 12: 299-303.

23. Turner Z., Bach-Holm D. Axenfeld-Rieger syndrome and spectrum of PITX2 and FOXC1 mutations. *Eur J Hum Genet.* 2009 Dec;17(12):1527-39.

24. Lines M, Kowlozski K and Walter M. Molecular Genetics of Axenfeld-Rieger malformations. *Hum Mol Gen*, 2002, Vol. 11, No. 10.

25. Dansault et al. Three new PAX6 mutations including one causing an unusual ophthalmic phenotype associated with neurodevelopmental abnormalities. *Mol Vision*, 2007; 13:511-523.

26. Villarroel et al. Molecular analysis of the PAX6 gene in Mexican patients with congenital aniridia: report of four novel mutations. *Mol Vision*, 2008; 14:1650-1658.

27. Reis L and Semina E. Genetics of anterior segment dysgenesis disorders. *Curr Opin Ophthalmol* 22: 314–324.

28. Yasuda T, et al. *PAX6* Mutation as a Genetic Factor Common to Aniridia and Glucose Intolerante. *Diabetes*, 2002, Vol. 51: 224-230,
29. Glaser T, et al. *PAX6* gene dosage effect in a family with congenital cataracts, aniridia, anophthalmia and central nervous system defects. *Nat Gen*, 1994, 7: 463-471.
30. Neethirajan G, et al. *PAX6* gene variations associated with aniridia in south India. *BMC Med Genet*. 2004; 5: 9