

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

**INVESTIGAÇÃO CLÍNICA E GENÉTICA DE UMA FAMÍLIA
BRASILEIRA COM ANIRIDIA CONGÊNITA**

ZULEIDE SILVA FERNANDES LIMA

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Genética e Biologia Molecular**.

Orientadora: Prof^a. Dra. Lavínia Schüler Faccini
Co-Orientadora: Prof^a. Dra. Isabella Lopes Monlleó

Porto Alegre, janeiro de 2014

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética Humana e Evolução do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e contou com o suporte financeiro da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e do INaGeMP (Instituto Nacional de Genética Médica Populacional).

A aluna recebeu bolsa de estudos concedida pela CAPES vinculada ao INaGeMP.

*À memória de Ivan Fernandes Lima,
meu querido avô e meu grande mestre.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Lavínia pelo carinho com o qual me acolheu desde o primeiro momento e a oportunidade de realizar um trabalho tão gratificante.

À minha co-orientadora Isabella pela dedicação em me ajudar de tão longe, pelos conselhos, pela amizade e toda a contribuição para que este trabalho fosse realizado.

À Vanessa, Flavia, Tábita e Virginia pela dedicação com a qual me ajudaram na condução deste projeto e pelos ensinamentos.

À toda a equipe do Projeto Aniridia por todas as contribuições neste trabalho e pelo companheirismo.

À Dânae e Eneida por terem “aberto as portas” para que eu pudesse alcançar os meus objetivos tão almejados.

Aos professores Francisco, Guilherme e Emerson pelo apoio para que eu seguisse este caminho.

Ao Elmo que me orientou e ajudou em todos os momentos que o procurei, sempre com muita disposição e alegria.

Aos meus amigos do laboratório 113: Juliano, Thayne, Gabriela, Marcelo, Andressa, Fernanda, Ana, Clarissa, Nicolle, Caroline, Gustavo, Nádia, Luiza, Pedro, Cristina, Aline, Lucas, Caroline, Alice e professor Nelson, pelo maravilhoso convívio e pelo auxílio sempre que necessário. À Bibiane em especial pela disponibilidade em me acompanhar desde a minha primeira visita ao laboratório.

À Ana Karine, Luciana, Dionéia, Ellen, Rosane, Danusa e Rafael pela amizade que quero ter por toda a vida.

Aos meus pais, Antônio e Maria, e meus irmãos, Pedro e Djalma, pelo amor, pelo carinho, pela dedicação, pela compreensão, pelos conselhos, por compartilharem comigo todas as alegrias e momentos difíceis mesmo estando do outro lado do país, por terem apoiado a minha escolha e me incentivado para seguir adiante.

À minha segunda família, Emanuelle, Emirce, Ederson, Júnior, Marília e André por sempre estarem presente e torcendo por mim.

Aos meus amigos de Maceió, em especial à Élide, Amanda e Cristiane pelos conselhos que me deram força para continuar.

Ao Deus que acredito existir e no qual sempre tive fé para que a minha certeza nunca se tornasse uma dúvida.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas.....	6
Resumo.....	7
Abstract.....	8
Capítulo 1 - Introdução.....	9
1.1. Defeitos congênitos: conceito, epidemiologia e causas.....	10
1.2. Aniridia.....	12
1.3. Mutações ou deleções no gene mestre do desenvolvimento, o <i>PAX6</i> , são as principais causas genéticas da aniridia.....	14
Capítulo 2 - Objetivos.....	19
2.1. Justificativa.....	20
2.2. Objetivos.....	20
2.2.1. Objetivo geral.....	20
2.2.2. Objetivos específicos.....	20
Capítulo 3 - Ocular and craniofacial phenotypes in a large Brazilian family with congenital aniridia.....	21
Capítulo 4 - Discussão.....	28
Referências Bibliográficas.....	35
Recursos Online.....	41
Anexo 1.....	42
Anexo 2.....	44
Anexo 3.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS

A – Adenina

aa – Aminoácidos

C – Citosina

cDNA – DNA complementar (*Complementary DNA*)

CI – Índice cefálico (*Index cephalic*)

CT – Região C-terminal (*C-terminal region*)

DNA – Ácido desoxirribonucléico (*Deoxyribonucleic acid*)

DC – Defeito congênito

FISH – *Fluorescence in situ hybridization*

G – Guanina

HB – *Homeobox*

HD – Homeodomínio (*Homeodomain*)

LNK – Região de ligação (*Linker region*)

mRNA – RNA (Ácido ribonucléico) mensageiro/*messenger RNA (Ribonucleic acid)*

MSX – Muscle segment homeobox

OMIM – Online Mendelian Inheritance in Man

OMS/WHO – Organização Mundial de Saúde/*World Health Organization*

OP – Octapeptídeo

PAX – Paired box gene

PB – Paired box

pb/bp – pares de bases/*base pairs*

PCR – Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase chain reaction*)

PD – Domínio paired (*Paired domain*)

PHT – Homeodomínio *paired-type tail*

PST – Domínio rico em prolina, serina e treonina (*Proline, serine, threonine-rich domain*)

RM – Ressonância magnética

SNC – Sistema nervoso central

T – Timina

WAGR – Tumor de **W**ilms, **A**niridia, Alterações **G**eniturinárias e **R**etardo Mental

RESUMO

Aniridia congênita é um distúrbio raro com uma ampla gama de manifestações clínicas que inclui hipoplasia de íris associada a anormalidades de outras estruturas e tecidos oculares. Normalmente diagnosticada na primeira infância, eventualmente envolve perda total da visão na idade adulta. Em aproximadamente 2/3 dos casos esta condição é herdada como uma característica familiar (autossômica dominante) e no 1/3 restante ocorre como um distúrbio esporádico por uma mutação “*de novo*”. Apesar da grande variabilidade fenotípica, mais de 90% das mutações identificadas ocorrem no gene *PAX6* (*Paired box gene*). O *PAX6* é um fator de transcrição de importância fundamental nos processos de neurogênese e formação dos olhos. O objetivo desse estudo foi investigar uma grande família com aniridia congênita. Nós identificamos 53 indivíduos afetados através de cinco gerações de uma família de 163 indivíduos vivendo em uma área rural do Nordeste do Brasil (Água Branca, Alagoas). O diagnóstico foi estabelecido após exame oftalmológico completo. Amostras biológicas foram obtidas para 60 (31 afetados e 29 controles) membros da família. Utilizando *primers* específicos, o DNA de cinco afetados e dois não-afetados foi amplificado por PCR para 18 regiões cobrindo todos os éxons e parte das regiões adjacentes do gene *PAX6*, um total de 7527pb, em busca da provável mutação. Os produtos de amplificação foram purificados, e sequenciados no equipamento ABI3730XL. Os cromatogramas foram alinhados e sua qualidade e precisão foram checados utilizando o *software CodonCode Aligner*. Todos os cinco indivíduos afetados apresentaram uma mudança em heterozigose de G>A no primeiro nucleotídeo após o éxon na posição 141 (c.141+1G>A). Os dois familiares não-afetados testados não apresentaram a mutação. Os fenótipos observados nos indivíduos afetados variaram desde a ausência completa até leves defeitos da íris. Mutações no sítio de *splice* modificam ou eliminam o processamento correto e maturação do mRNA, podendo ou não abolir completamente a expressão do transcrito normal, o que poderia levar a variação dos fenótipos. Isto poderia explicar a variabilidade fenotípica encontrada nesta família.

ABSTRACT

Congenital aniridia is a rare genetic disorder, with a wide range of clinical manifestations that include several degrees of iris hypoplasia associated with abnormalities of many other ocular structures and tissues. Usually diagnosed in early infancy, it eventually evolves to blindness in the adulthood. In about 2/3 of the cases this condition is inherited as an autosomal dominant trait, in the remaining 1/3 it occurs as a sporadic disorder by “*de novo*” mutation. Despite the wide phenotype variability, more than 90% of the mutations identified are in the *PAX6* (*Paired box gene*). *PAX6* is a transcription factor of critical importance in the neurogenesis and oculoogenesis processes. The aim of this study was to investigate a large Brazilian family with congenital aniridia. We identified 53 subjects across a 5-generation pedigree of a family of 163 individuals living in a rural area of the Northeast of Brazil (Água Branca, Alagoas). Diagnosis was established after complete ophthalmological examination. Biological samples were obtained for 60 (31 affected and 29 controls) family members. Using specific primers, DNA from five affected and two controls were amplified by PCR for 18 regions covering all *PAX6* gene exons, a total of 7527bp, for screening in search of the mutation. The amplicons were purified, and sequenced in the ABI3730XL machine. The chromatograms were aligned and their quality and accuracy were checked using the CodonCode Aligner software. All the five affected individuals sequenced presented a heterozygous G>A change in the first nucleotide after 141 exon position (c.141+1G>A). The two controls tested from this family didn't show the mutation. The phenotype related varies from complete absence to mild iris defects. Splice site mutations modify or eliminate correct processing and maturation of the mRNA, and may or may not abolish the wild-type transcript expression completely, which could lead to variation in the phenotypes. Thus, this mutation in the splice site could explain the phenotype variability found in this family.

CAPÍTULO I
INTRODUÇÃO

1.1. Defeitos congênitos: conceito, epidemiologia e causas

Qualquer anormalidade estrutural e/ou funcional (incluindo o metabolismo) que se apresente a partir do nascimento, decorrente de fator originado antes do mesmo, é conceituada como defeito congênito (DC). Sua detecção pode ocorrer no recém-nascido, na infância ou mesmo em idades avançadas (Christianson *et al.*, 2006; WHO, 2006).

No mundo aproximadamente 5% dos nativos são acometidos por DC. Noventa e quatro por cento dos nascimentos com DC graves ocorrem em países em desenvolvimento, incluindo o Brasil, o que corresponde a 7,4 milhões de crianças por ano (Christianson *et al.*, 2006).

Na América Latina os DCs ocupam a 3ª posição entre as causas de morte no primeiro ano de vida (WHO, 1999a). Entre 1980 e 2006 houve redução proporcional de óbitos devido a doenças infecciosas e respiratórias, passando as malformações congênitas da quinta para a segunda maior causa de mortalidade infantil no Brasil (Horovitz *et al.*, 2013) (Figura 1).

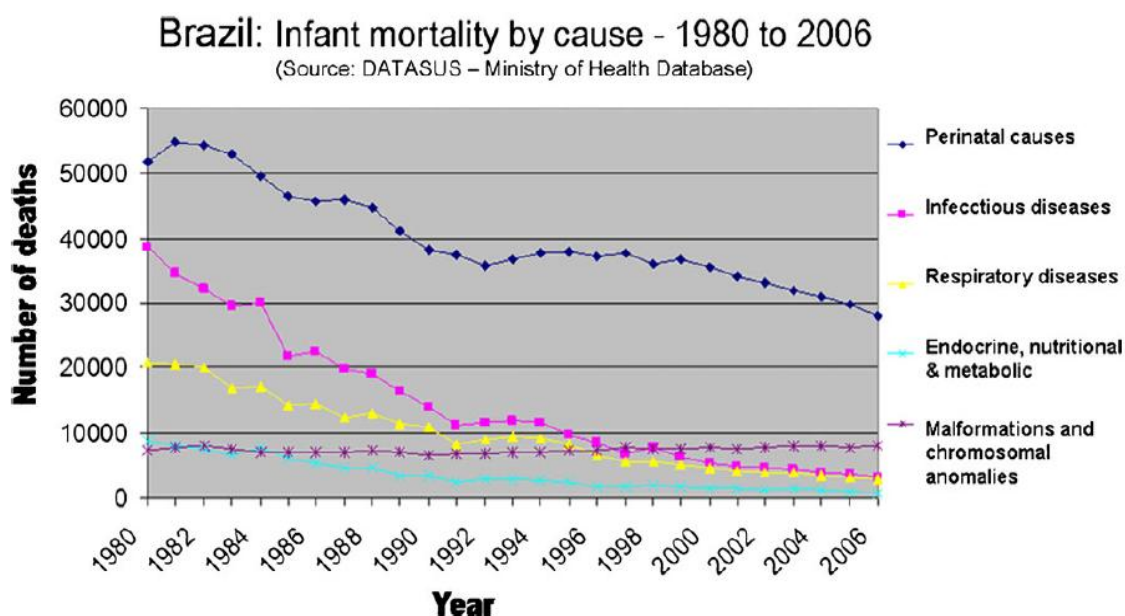


Figura 1. Representação gráfica da evolução da mortalidade infantil proporcional devido às cinco maiores causas de morte entre 1980 e 2006 no Brasil (Retirado de Horovitz *et al.*, 2013).

A etiologia dos defeitos congênitos pode ser genética ou não-genética. Entre 30 e 45% dos defeitos genéticos devem-se as mutações gênicas, anomalias cromossômicas e heranças multifatoriais, isto é, interações anormais entre genes e fatores ambientais. Os defeitos congênitos com herança autossômica dominante correspondem a 41,4% do total, os com herança autossômica recessiva a 43,7%, aqueles com herança ligada ao X abrangem 7,9%, e em 7,1% o mecanismo de herança ainda não foi identificado. Os defeitos não-genéticos abrangem 5 a 10% dos casos e estão relacionados à exposição a agentes teratogênicos, forças mecânicas e ocorrência de acidentes vasculares que venham a interferir no desenvolvimento fetal. Em 50% dos casos de DC, a etiologia é desconhecida (Christianson & Modell, 2004; Christianson *et al.*, 2006; WHO, 2006; Fisher *et al.*, 2008; PHG Foundation, 2013).

Alguns fatores podem contribuir para um aumento da prevalência de DC:

- *Alta taxa de casamentos consanguíneos*: os casamentos entre primos de primeiro grau além de aumentar a prevalência de DC, elevam o risco de mortalidade neonatal e infantil e de deficiência intelectual. De acordo com Snustad & Simmons (2008) esse fato deve-se, em termos genéticos, à maior frequência de homozigotos para alelos recessivos que causam distúrbios;

- *Idade parental*: a idade materna acima de 35 anos eleva o risco de ocorrência de anomalias cromossômicas, particularmente Síndrome de Down. A idade paterna maior que 40 anos pode contribuir para um discreto aumento de distúrbios autossômicos dominantes;

- *Migração*: a migração de indivíduos com genótipos homozigotos e heterozigotos para defeitos monogênicos pode introduzir um gene em novas populações. Se estas pessoas se reproduzem, o gene pode ser incorporado na população anfitriã;

- *Baixa renda*: em países pobres ou em desenvolvimento, as famílias de baixa renda podem apresentar um risco maior de nascimentos com DC. Esse aumento pode estar associado à deficiência de macro e micronutrientes na

alimentação das mães antes e durante a gestação e de aumento da exposição a teratógenos, como álcool e infecções;

- *Estrutura e abrangência do sistema de saúde*: em áreas de baixa e média renda, muitos afetados por DC vão a óbito sem diagnóstico. Onde as condições dos serviços de saúde se aproximam dos países de alta renda, os afetados por DC podem ser tratados e ter uma vida mais longa e produtiva. A prevalência de DC também está associada ao grau de instrução da mãe. Onde há medidas adequadas de cuidados com a saúde, além de uma maior qualidade de vida, há também uma diminuição na taxa de nascimentos de crianças com defeitos congênitos (Christianson *et al.*, 2006; PHG Foundation, 2013).

Considerando o impacto dos DCs, a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda que os programas de saúde incluam e integrem ações específicas em genética desde os seus níveis mais básicos até os mais complexos, sem dissociação entre prevenção e atenção à saúde (WHO, 1999a; Christianson *et al.*, 2006).

1.2. Aniridia

A aniridia (OMIM 106210) é um distúrbio genético raro, caracterizada por grave malformação ocular congênita, bilateral, apresentando vários graus de hipoplasia de íris, associada a anormalidades de outros tecidos e estruturas oculares. Essas anormalidades associadas podem incluir hipoplasia da fóvea, catarata, glaucoma, hipoplasia do nervo óptico, hipoplasia macular, ausência de reflexo macular, subluxação do cristalino, formação de tecido fibrovascular ou granuloso na córnea (*Pannus*), opacificação da córnea, nistagmo, estrabismo, erro de refração, ptose e fotofobia. Como consequência, as pessoas costumam ter problemas de acuidade visual (Nelson *et al.*, 1984; Jordan *et al.*, 1992; López-García *et al.*, 2006; Brauner *et al.*, 2008; Kokotas & Petersen, 2010; Park *et al.*, 2010; Hingorani *et al.*, 2012).

A aniridia afeta aproximadamente 1:64.000 a 1:96.000 nascidos vivos (Trembley *et al.*, 1998). Em cerca de 2/3, é herdada em um padrão autossômico dominante com alta penetrância e expressão variável, e o 1/3 restante são casos esporádicos que ocorrem por mutação “*de novo*” (Shaw *et al.*, 1960; Nelson *et al.*, 1984; Valenzuela & Cline, 2004; Park *et al.*, 2012).

A aniridia pode se apresentar como um distúrbio isolado ou estar associada a outras malformações e síndromes. Miller *et al.* (1964) descreveram uma síndrome caracterizada por aniridia, hemihipertrofia (o crescimento anormal de um lado do corpo, ou partes deste) e tumor de Wilms (OMIM 194070). Mais tarde foram identificados também outros sintomas, genitália ambígua e retardo mental, e a síndrome passou a ser conhecida com WAGR (Tumor de **W**ilms, **A**niridia, **A**lterações **G**eniturinárias e **R**etardo Mental). Atualmente sabe-se que a WAGR trata-se de uma síndrome de deleção de genes contíguos na região 11q (11p13; chr11: 31,000,000-43,500,000; GRCh37/hg19) (OMIM 194072; Anderson *et al.*, 1978; Riccardi *et al.*, 1978).

Outra síndrome associada à aniridia é a Síndrome de Gillespie (OMIM 206700), onde os pacientes apresentam também retardo mental e ataxia cerebelar. Mirkinson & Mirkinson (1975) relataram o estudo de caso de uma família com aniridia e ausência de rótula (OMIM 106220), além de catarata e glaucoma.

A Anomalia de Peters (OMIM 604229) é identificada como uma série de defeitos no sistema visual como leucoma central da córnea, ausência do estroma posterior da córnea, e um grau variável de defeitos de íris, e podem ou não se manifestar associados com a aniridia. Além destes problemas de desenvolvimento citados, existem ainda mais de 20 síndromes em que a aniridia ocorre juntamente com outros diversos problemas congênitos (OMIM: 612469, 206750, 3106230, 136520, 156190, 602482, 180500, 245450, 601224, 115470, 601631, 133701, 614497, 194080, 212500, 602361, 129750, 210350, 148190).

No Brasil poucos casos de aniridia foram estudados. Llerena Jr *et al.* (2000) investigaram uma menina filha de um casal não consanguíneo, que apresentava

uma aparente translocação balanceada “*de novo*” [t(11;13)(p13;q33)] com uma microdeleção envolvendo a região WAGR, detectada por estudo de FISH (*Fluorescence in situ hybridization*). A criança foi diagnosticada com glaucoma e aniridia bilateral, não possuía evidências de déficit cognitivo, nenhuma dismorfia adicional e exames de ultrassom não evidenciaram anormalidades abdominais. Um menino, filho de um casal não consanguíneo, com aniridia, atraso mental e motor, história de ambiguidade genital e dismorfias apresentou no exame de cariótipo uma deleção “*de novo*” no braço curto do cromossomo 11 [46,XY,del(11p)], levando ao diagnóstico de Síndrome de WAGR (Andrade *et al.*, 2008).

Uma família com diagnóstico de aniridia bilateral em duas gerações, mãe e 3 filhos, dois indivíduos do sexo feminino e um do sexo masculino, foi investigada por França (2009). Por meio de estudo molecular foi identificada nesta família uma alteração de C>T na posição g.28892 no éxon 9 do gene *PAX6* (p.R240X), esta mudança leva a uma troca de aminoácido na posição 240 de uma arginina (CGA) para um *stop codon* (TGA). Neste mesmo estudo foram também realizados testes moleculares para dois indivíduos não relacionados entre si ou com a família anteriormente descrita, que apresentavam aniridia parcial bilateral e aniridia bilateral e catarata congênita respectivamente, porém não foram identificadas mutações nestes indivíduos que pudessem ser relacionadas a estes fenótipos (França, 2009).

1.3. Mutações ou deleções no gene mestre do desenvolvimento, o *PAX6*, são as principais causas genéticas da aniridia

A morfogênese dos olhos, tanto em humanos quanto nos outros vertebrados, e também em invertebrados, envolve uma cascata molecular genética conservada evolutivamente. Nesta cascata existem inúmeras interações entre genes do desenvolvimento de maneira altamente organizada durante o período embrionário a fim de formar as estruturas oculares, sensitivas ou

funcionais (Balczarek *et al.*, 1997; Chi & Epstein, 2002). Entre estes genes, o gene *Paired box 6 (PAX6)* tem um papel fundamental. O gene *PAX6* é integrante da família de genes *PAX (Paired box genes)*, com grande importância na codificação de fatores de transcrição essenciais no desenvolvimento de órgãos e tecidos. Inicialmente identificados em *Drosophila (Pax meso)*, foram encontrados também ortólogos em diversos outros animais. Esta família de genes caracteriza-se por compartilhar um domínio conservado, chamado de domínio *paired* que apresenta 128 aminoácidos (aa), com propriedades de ligação a uma região promotora do DNA alvo (Epstein *et al.*, 1994; Balczarek *et al.*, 1997; Chi & Epstein, 2002). As funções desta família estão relacionadas à proliferação, especificação, migração e sobrevivência celular, particularmente durante o período embrionário (Robson *et al.*, 2006).

Nos mamíferos e nos peixes foram encontrados nove genes *PAX*, agrupados em quatro grupos (Breitling & Gerber, 2000; Hetzer-Egger *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 2000). A classificação nos grupos tem como base a presença ou ausência de três outras sequências conservadas: um homeodomínio (HD), um octapeptídeo (OP) e um homeodomínio *paired-type tail* (PHT) (Figura 2).

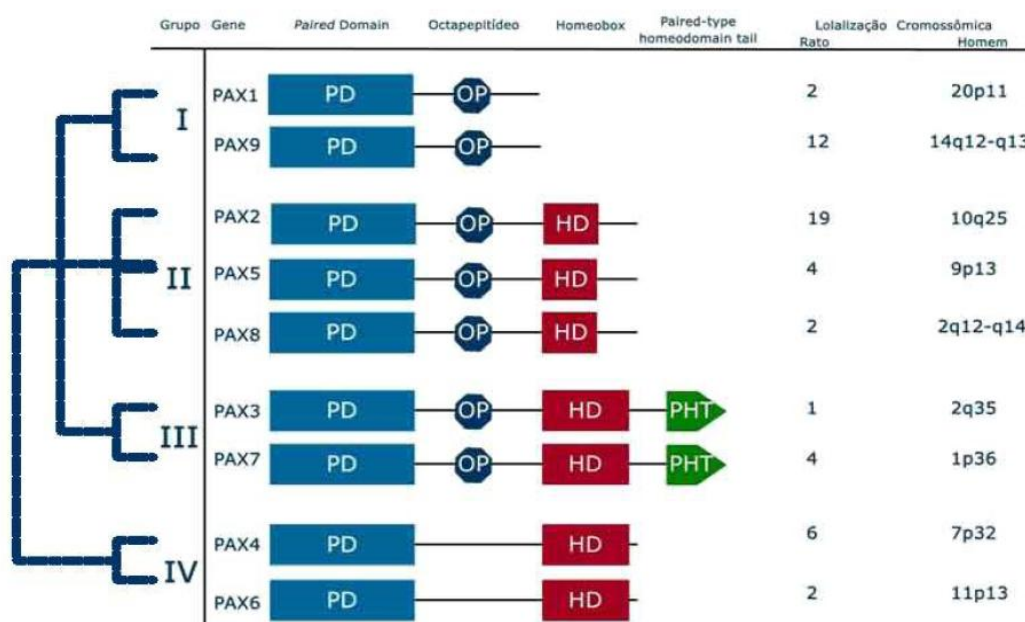


Figura 2. Esquema de classificação das subfamílias *PAX* (Adaptado de Balczarek *et al.*, 1997; Breitling & Gerber, 2000).

Além de ser expresso durante o desenvolvimento dos olhos, o gene *PAX6* é expresso também em outras estruturas, como o pâncreas (Walther & Gruss, 1991; Simpson & Price, 2002). O gene *PAX6*, junto com o *PAX4*, faz parte do grupo IV e apresenta dois elementos de ligação ao DNA: o domínio *paired* e o homeodomínio. Assim como o *PAX6*, o gene *PAX4* também é essencial para o desenvolvimento do pâncreas, e ambos parecem também serem necessários para a diferenciação das células pancreáticas. A proteína *PAX4* é importante para a diferenciação das células beta, enquanto que a proteína *PAX6* é necessária para a maturação das ilhotas alfa.

O gene *PAX6* possui ainda função diferenciada no desenvolvimento do SNC (Sistema nervoso central), nas células do sistema olfativo e na diferenciação das células formadoras dos olhos. Muitos estudos sugerem que na formação de todos os olhos complexos, há o compartilhamento de uma cascata do desenvolvimento, visto que mutações no gene *PAX6* interrompem o desenvolvimento de olhos tanto em mamíferos quanto em insetos. Além disto, *PAX6* clonados de diversos animais podem ativar ectopicamente a diferenciação de células e iniciar o desenvolvimento de olhos, tanto em *Drosophila* (Quiring *et al.*, 1994) quanto em sapos (Chow *et al.*, 1999). Humanos com mutações no gene *PAX6*, assim como camundongos nocaute para este gene, compartilham malformações no sistema nervoso, olfativo e defeitos no desenvolvimento dos olhos (Xu *et al.*, 1999; Kleinjan *et al.*, 2006; Laakso, 2009; Suga *et al.*, 2010).

Nos seres humanos, o *PAX6* está localizado na região do braço curto do cromossomo 11 (11p13; chr11:31806340-31839509; GRCh37/hg19), e foram identificados, pelo menos, 30 possíveis transcritos. O transcrito clássico é composto por 14 éxons, possui 1763 pares de bases e codifica um fator de transcrição de 436 aminoácidos (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG0000007372;r=11:31806340-31839509). Mutações no gene ou deleções e microdeleções nesta região cromossômica provocam uma grande variedade de malformações hereditárias oculares, dentre as quais as já citadas aniridia e a

hipoplasia foveal provavelmente são as mais frequentes. Na figura 3 podem ser observados os esquemas do cDNA do *PAX6* e sua proteína.

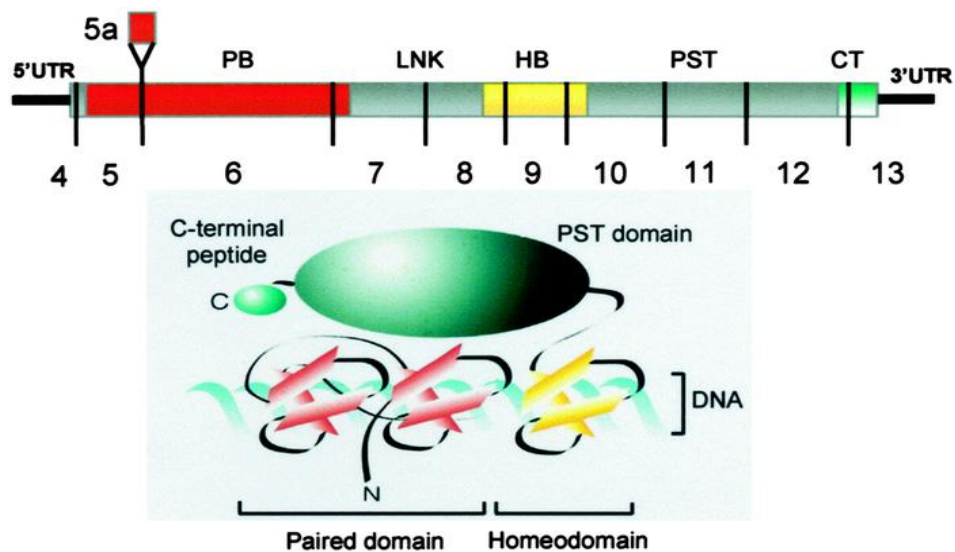


Figura 3. *PAX6* cDNA (acima) e sua proteína (abaixo). As linhas verticais indicam os limites entre os éxons. O *PAX6* possui 10 éxons constitutivos, 4-13, e um éxon com *splice* alternativo, 5a. PB, *paired box* (vermelho); LNK, região de ligação; HB, *homeobox* (amarelo); PST, domínio rico em prolina, serina e treonina; CT, região C-terminal (verde). A representação gráfica da proteína *PAX6* mostra os diferentes domínios da proteína traduzida. O domínio *paired* (vermelho) e o homeodomínio (amarelo) são mostrados em contato com o DNA (Retirado de Hanson, 2003).

Hanson *et al.* (1993), que descreveram quatro diferentes mutações no gene *PAX6*, tanto em casos esporádicos quanto em familiares, já sugeriam que mutações neste gene seriam a principal causa para o fenótipo aniridia. As mutações estão distribuídas ao longo de todo o gene e a grande maioria são mutações sem sentido, de mudança de fase de leitura, ou erros durante o *splicing* que causam o truncamento da proteína *PAX6*, ocorrendo como consequência uma haploinsuficiência. Portanto, na grande maioria dos casos, a aniridia ocorre devido à diminuição da dosagem do gene *PAX6*. Distintas mutações estão associadas à variabilidade fenotípica, incluindo a presença de outras malformações oculares. No catálogo OMIM estão listados 26 alelos variantes do

gene *PAX6* que causam malformações oculares: 13 associados somente à aniridia, e 13 implicados em outras malformações, com ou sem aniridia. O banco de dados interativo LOVD-*PAX6*, (http://lsdb.hgu.mrc.ac.uk/home.php?select_db=PAX6), possui 592 registros de alterações do *PAX6* humano, das quais 357 são variantes únicas, identificadas em uma família ou em um caso esporádico.

Mutações de sentido trocado no *PAX6* em humanos já foram também associadas a fenótipos comportamentais e do desenvolvimento neurológico. Foram identificados indivíduos com mutações no *PAX6* que apresentam aniridia e também déficit cognitivo (Malandrini *et al.*, 2001; Ticho *et al.*, 2006; Graziano *et al.*, 2007). Ressonância magnética (RM) em pacientes com aniridia e sem déficits intelectuais óbvios foi capaz de mostrar desde anormalidades cerebrais sutis até falta de comissura anterior e da glândula pineal (Mitchell *et al.*, 2003).

É possível que algumas variantes do gene *PAX6* apresentem fenótipos específicos ou ainda que na mesma variante possam ser observados diversos fenótipos. Porém o *PAX6* pode ainda interagir com outros genes que contribuam para a variabilidade de malformações oculares, revelando a complexa heterogeneidade genética subjacente ao desenvolvimento ocular (Fantes *et al.*, 2003; Glaser *et al.*, 1994; Hever *et al.*, 2006; Valleix *et al.*, 2006; Danno *et al.*, 2008; Voronina *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2008, França, 2009).

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

2.1. Justificativa

A aniridia é um distúrbio congênito raro, que pode ser herdada de uma forma autossômica dominante, com alta penetrância e expressividade variável. Entre os problemas de saúde pode-se destacar a perda parcial ou total da visão. O estudo de famílias com muitos afetados tanto do ponto de vista clínico quanto molecular, permite não apenas a identificação da mutação patogênica, mas também a identificação de genes modificadores possivelmente envolvidos na manifestação fenotípica desta condição. Esta abordagem também permite um maior conhecimento sobre as vias de genes envolvidos no desenvolvimento ocular.

No Brasil poucas famílias foram investigadas e o conhecimento sobre que tipo de mutação ocorre no nosso meio pode ser importante para o aconselhamento genético.

2.2. Objetivos

2.2.1. Objetivo geral

Investigar uma família com aniridia congênita residente na cidade de Água Branca (Alagoas-Brasil).

2.2.2. Objetivos específicos

- ✓ Caracterizar a manifestação clínica do fenótipo de aniridia e anormalidades associadas;
- ✓ Construir heredograma detalhado para avaliação do modo de herança—penetrância e expressividade;
- ✓ Identificar a mutação patogênica responsável pelo fenótipo de aniridia nesta família;
- ✓ Oferecer aconselhamento genético para os interessados e orientação quanto a possibilidades de tratamento e cuidados dentro do sistema de saúde brasileiro.

CAPÍTULO 3
OCULAR AND CRANIOFACIAL PHENOTYPES IN A LARGE BRAZILIAN
FAMILY WITH CONGENITAL ANIRIDIA

Artigo publicado na revista *Clinical Genetics*



Short Report

Ocular and craniofacial phenotypes in a large Brazilian family with congenital aniridia

Fernandes-Lima Z.S., Paixão-Côrtes V.R., de Andrade A.K.M., Fernandes A.S., Coronado B.N.L., Monte Filho H.P., Santos M.J., de Omena Filho R.L., Biondi F.C., Ruiz-Linares A., Ramallo V., Hünemeier T., Schuler-Faccini L., Monlleó I.L. Ocular and craniofacial phenotypes in a large Brazilian family with congenital aniridia.

Clin Genet 2014. © John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd, 2013

Congenital aniridia is a rare genetic disorder characterized by varying degrees of iris hypoplasia that are associated with additional ocular abnormalities. More than 90% of the causal mutations identified are found in the *PAX6* gene, a transcription factor of critical importance in the process of neurogenesis and ocular development. Here, we investigate clinical, molecular, and craniofacial features of a large Brazilian family with congenital aniridia. Among the 56 eyes evaluated, phenotype variation encompassed bilateral total aniridia to mild iris defects with extensive variation between eyes of the same individual. *PAX6* molecular screening indicated a heterozygous splice mutation (c.141 + 1G>A). Thus, we hypothesize that this splicing event may cause variation in the expression of the wild-type transcript, which may lead to the observed variation in phenotype. Affected individuals were more brachycephalic, even though their face height and cephalic circumference were not significantly different when compared to those of non-affected relatives. From this, we infer that the head shape of affected subjects may also be a result of the *PAX6* splice-site mutation. Our data summarize the clinical variability associated with the ocular phenotype in a large family with aniridia, and help shed light on the role of *PAX6* in neurocranial development.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

**Z.S. Fernandes-Lima^{a,b,†},
V.R. Paixão-Côrtes^{a,†}, A.K.M.
de Andrade^c, A.S. Fernandes^d,
B.N.L. Coronado^d, H.P. Monte
Filho^d, M.J. Santos^d, R.L. de
Omena Filho^e, F.C. Biondi^a,
A. Ruiz-Linares^f, V. Ramallo^a,
T. Hünemeier^a,
L. Schuler-Faccini^{a,b}
and I.L. Monlleó^{c,g}**

^aPrograma de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil, ^bGINAGEMP – Instituto Nacional de Genética Médica Populacional, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, ^cSetor de Genética Médica, Faculdade de Medicina, ^dServiço de Oftalmologia, Hospital Universitário Professor Alberto Antunes, Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Maceió, Brazil, ^eSetor de Genética Médica, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas (UNCISAL), Maceió, Brazil, ^fDepartment of Genetics, Evolution and Environment, University College London, London, UK, and ^gServiço de Genética Clínica Hospital, Hospital Universitário Professor Alberto Antunes, Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Maceió, Brazil

[†]These authors contributed equally to this work.

Key words: aniridia – autosomal dominant – neurocranium – *PAX6*

Corresponding author: Lavinia Schuler-Faccini, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade

Federal do Rio Grande do Sul, Caixa
 Postal 15053, 91501–970 Porto
 Alegre, RS, Brazil.
 Tel.: +55 51 33089826;
 fax: +55 51 33598010;
 e-mail: lavinia.faccini@ufrgs.br

Received 6 September 2013, revised
 and accepted for publication 22
 November 2013

Congenital aniridia (OMIM #106210) is a rare condition associated with a wide range of clinical manifestations. Although it is usually diagnosed in early infancy, the disease ultimately leads to vision loss during adulthood. While the name ‘aniridia’ indicates defects in the iris, ocular abnormalities associated with this disease encompass multiple ocular structures and tissues, with complete or partial hypoplasia of the iris, corneal opacification, cataract, lens ectopia, glaucoma, and macular and optic nerve hypoplasia characterizing the disease. Refractive errors, strabismus, and ptosis may also be present in the affected eye. Clinical expression is highly variable within and between families, but there appears to be little difference between the eyes of a single patient (1–4).

Approximately two thirds of all congenital aniridia cases have been linked to an inherited autosomal dominant trait that demonstrates near complete penetrance and lacks any known ethnic, geographic, or gender bias. In the remaining one third of cases, the disease occurs as a sporadic disorder, and is frequently associated with Wilms tumor as part of the Wilms tumor–Aniridia–Genital anomalies–Retardation (WAGR) 11p microdeletion syndrome (1–4).

Despite the wide phenotype variability, more than 90% of the mutations leading to congenital aniridia are found in the paired box gene 6 (*PAX6*) locus, located on chromosome 11p13 (chr11:31806340–31839509; GRCh37/hg19). *PAX6*, like all *PAX* family members, is a transcription factor known to play key roles in many aspects of embryonic development and organogenesis, including neurogenesis and ocular development (3, 5). The OMIM catalog use as examples 26 alleles for the *PAX6* gene (OMIM *607108; accessed on October 17, 2013): 13 are solely associated with aniridia, whereas the remaining 13 are also linked to other malformations that occur with or without aniridia. The interactive database Lovd-*PAX6* presents 592 documented variations of the human *PAX6* gene. Notably, 56 of the *PAX6* variants have unknown molecular mechanisms (<http://www.lovd.nl/3.0/home>, accessed on October 17, 2013). Most of causal mutations create codon shift that yields a premature stop codon, leading to truncated, non-functional *PAX6* protein. Loss of *PAX6* function results in altered downstream gene regulation and subsequent changes in cell signaling, which, in most cases, leads to morphological abnormalities.

The aim of this study was to investigate the clinical features in a large Brazilian family with congenital

aniridia and to identify the genetic factors associated with the disease phenotype.

Materials and methods

Subject recruitment and clinical examination

We investigated a family of 163 individuals across a five-generation pedigree, residing in a rural area North-east of Brazil (Água Branca, Alagoas – 09°15′39″S; 37°56′10″W), including 53 subjects presenting phenotypes similar to that of congenital aniridia. Clinical data and biological samples were obtained for 60 family members (31 affected and 29 non-affected). Clinical diagnosis of aniridia was made after a complete ophthalmological examination was performed by four ophthalmologists. Examinations included corneal inspection, measurement of visual acuity, intraocular pressure with applanation tonometry (mmHg), refraction, slit-lamp examination, and dilated funduscopy. Careful physical examination was also performed by two dysmorphologists. The use of human subjects in this study was approved by the Federal University of Rio Grande do Sul Ethics Committee (Protocol # 195.023). Informed consent was obtained from all participants or their guardians.

Craniofacial measurement

Four craniofacial absolute/linear measures – head length (g-op), head breadth (eu-eu), facial length (n-gn) and head circumference – were obtained using sliding and spreading calipers. In order to minimize error, the anthropometric measurements were obtained according to international standards and by the same researcher. The cephalic index (CI = eu-eu × 100/g-op) was calculated based on these absolute measurements. Individuals under 12 years of age were excluded from this analysis.

Molecular tests

DNA was extracted using a standard volume of 2.0 ml Oragene DNA/saliva mixed samples. DNA from seven individuals (5 affected and 2 unaffected) was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using primers specific for 18 regions (6, 7), which covered the entire coding and adjacent *PAX6* gene regions (7527 bp). The amplified products were purified following the Exonuclease I and Alkaline Phosphatase

Ocular and craniofacial phenotypes in a large Brazilian family

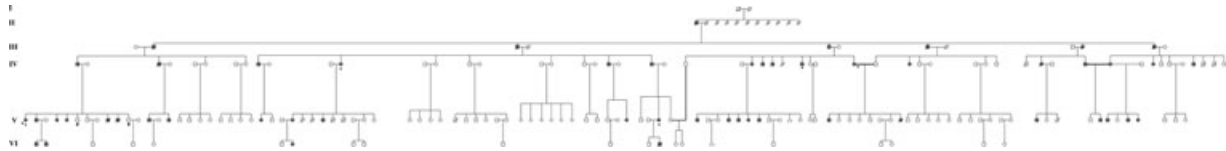


Fig. 1. Family pedigree with 53 identified members diagnosed with aniridia in five generations of the family. Five affected individuals with molecular screening and two unaffected individuals with molecular screening.

(Amersham Biosciences – GE Healthcare, Piscataway, NJ) protocols. Both DNA strands were sequenced using an ABI 3730/3730x Sequence Analyzer (Life Technologies, Carlsbad, CA). Any putative mutations identified were re-amplified and re-sequenced for confirmation.

Sequence data analysis

DNA sequences and chromatograms were aligned and their quality and accuracy were checked using the CODONCODE ALIGNER software (<http://www.codoncode.com/>). All statistical analysis (ANOVA test, bar and regression graphics representing mean indices values) was carried out using XLSTAT software.

Results

Pedigree analysis

The pedigree analysis is concordant with dominant inheritance having complete penetrance (Fig. 1). The ratio of affected to normal subjects in segregating sibships was 0.52/0.48, similar to the expected segregation ratio of 0.5/0.5.

Clinical characteristics

Of the living family members affected with congenital aniridia, we were able to perform clinical examination of 31, ranging from 2 to 72 years of age, 58% of whom were male. Among the 56 eyes (26 right eyes and 30 left eyes) evaluated, the following phenotypes were observed: bilateral total aniridia (38 subjects), unilateral total aniridia (4 subjects), bilateral partial aniridia (4 subjects), unilateral partial aniridia (4 subjects), bilateral misshapen pupils (4 subjects), and unilateral misshapen pupils (2 subjects) (Table 1). Further, nystagmus, cataract, photophobia, strabismus, and corneal changes (opacity, neovascularization, and microcornea) were the most prevalent associated problems (Fig. 2). Intraocular pressure in the aniridia-affected eyes ranged from 7 to 32 mmHg. Other minor facial defects, including synophrys, low set ears, epicanthus, and clinodactyly, were observed in 21 subjects (70%). Two subjects presented motor delay and learning disabilities.

Craniofacial analysis

Affected individuals have significantly higher CI (85.93, SD \pm 4.8) compared to their normal relatives

(82.46, SD \pm 5.12) ($p=0.014$), often presenting a more brachycephalic head shape. In contrast, there was no significant difference in face height or cephalic circumference between affected and non-affected relatives.

PAX6 molecular screening

All five of the affected individuals sequenced for PAX6 (IV-12, IV-31, IV-34, V-1, and V-58) presented a heterozygous G>A change in the first nucleotide following exon position 141 (c.141 + 1G>A). The two normal individuals tested from this family did not show the mutation (V-6 and V-11).

Discussion

The clinical findings presented here corroborate what has been presented in literature regarding the broad spectrum of the ocular phenotype and the extent of intrafamilial and individual variability (1, 2, 4, 8). In the family studied for this investigation, different degrees of iris hypoplasia (from total aniridia to misshapen pupil) were observed within family members and between the eyes of an affected individual, with the analyzed affected individuals presenting severe, progressive loss of vision. Additionally, motor delay and learning disability were verified in two subjects, both of whom suffered from perinatal and postnatal injury, according to their clinical history. Other anatomic sites did not show significant malformation, and the minor defects identified did not follow a consistent pattern. Therefore, we postulate that these insignificant abnormalities are not part of the spectrum of aniridia in this family, and will not be discussed further in this study.

Many PAX6 mutations have been linked to aniridia pathogenesis. In the Brazilian family studied, we found that all five of the affected patients analyzed carried a G>A mutation in the first nucleotide of intron 5 (nucleotide 141 + 1) that was not present in the healthy control samples. This particular mutation (c.141 + 1G>A) was first described by Wang et al. (9) in two related Chinese individuals. They indicate that this mutation likely leads to disruption of one of the splice sites present in exon 5, which contains part of the paired domain, altering the strength of the donor splice site. PAX6 mutations in splice sites, caused by a point mutation, were present in 9% of the records in the PAX6 Allelic Variant Database ([http://lsdb.hgu.mrc.ac.uk/home.php?select db = PAX6](http://lsdb.hgu.mrc.ac.uk/home.php?select%20db=PAX6), accessed on October 17, 2013), and the phenotype related to these mutations varied from complete absence

Table 1. Clinical characteristics of all affected subjects examined

Case (age in years)	Gender	Cornea changes				Lenses				Strabismus	Glaucoma (RE/LE)	Visual acuity (RE/LE)	Other features
		Iris (RE/LE)	Microcornea (RE/LE)	Opacity (RE/LE)	Neovascularization (RE/LE)	Cataract (RE/LE)	Ectopia	Nystagmus	Photophobia				
III-5 (72)	M	IMP/TAN	IMP/No	IMP/Yes	IMP/Yes	IMP/Yes	IMP/Yes	Yes	Yes	IMP	IMP/IMP	NLP/HM	Phthisis bulbi (RE)
IV-1 (63)	M	IMP/IMP	IMP/IMP	Yes/Yes	Yes/Yes	IMP/IMP	IMP/IMP	IMP	IMP	IMP	IMP/IMP	IMP/IMP	Phthisis bulbi (LE)
IV-12 (59)	F	TAN/IMP	Yes/IMP	Yes/Yes	Yes/Yes	IMP/IMP	IMP/IMP	No	IMP	IMP	IMP/IMP	NLP/NLP	Phthisis bulbi (RE)
IV-27 (41)	F	IMP/PAN	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	Macular reflex less
IV-28 (35)	M	TAN/TAN	Yes/Yes	Yes/Yes	Yes/Yes	No/No	No/No	Yes	Yes	Yes	Yes/Yes	FC/FC	
IV-29 (31)	M	PAN/PAN	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	
IV-31 (28)	M	TAN/TAN	No/No	Yes/No	Yes/No	No/No	No/Yes	Yes	No	No	No/Yes	HM/NLP	Macular reflex less (RE)
IV-46 (39)	F	TAN/TAN	Yes/Yes	Yes/Yes	Yes/Yes	No/No	No/No	Yes	Yes	?	No/No	FC/FC	Microphthalmia
V-1 (28)	F	TAN/TAN	No/No	Yes/Yes	Yes/Yes	Yes/Yes	No/No	Yes	Yes	No	IMP/IMP	FC/FC	
V-2 (35)	M	IMP/TAN	Yes/No	Yes/Yes	Yes/Yes	Yes/Yes	IMP/Yes	Yes	Yes	No	IMP/IMP	NLP/NLP	Phthisis bulbi (RE)
V-4 (30)	F	TAN/TAN	No/Yes	Yes/Yes	Yes/Yes	Yes/Yes	No/IMP	Yes	Yes	No	No/IMP	20/400/LP	
V-5 (27)	F	TAN/TAN	No/Yes	No/No	No/No	No/No	IMP/IMP	Yes	No	Yes	No/No	20/400/20/400	
V-12 (43)	M	TAN/TAN	No/No	No/No	No/No	No/No	No/No	Yes	Yes	?	No/No	FC/FC	
V-13 (28)	M	PAN/MP	No/No	No/No	No/No	No/No	No/No	Yes	No	Yes	No/No	FC/FC	
V-15 (30)	M	MP/MP	No/No	No/No	No/No	No/No	No/No	Yes	Yes	Yes	No/No	FC/FC	
V-24 (18)	F	TAN/TAN	No/No	No/No	No/No	No/No	No/No	Yes	Yes	Yes	IMP/IMP	FC/FC	
V-27 (32)	F	TAN/TAN	No/Yes	No/No	No/No	No/No	No/No	Yes	Yes	Yes	IMP/IMP	HM/HM	
V-33 (47)	F	TAN/TAN	No/Yes	Yes/Yes	Yes/Yes	Yes/Yes	No/No	Yes	No	Yes	IMP/IMP	HM/FC	Microphthalmia (LE)
V-59 (33)	F	TAN/TAN	Yes/Yes	No/No	No/No	No/No	Yes/Yes	Yes	Yes	No	IMP/IMP	NLP/NLP	
V-61 (22)	M	TAN/TAN	No/No	Yes/Yes	Yes/Yes	No/No	Yes/Yes	Yes	No	Yes	No/No	FC/FC	Macular reflex less
V-64 (16)	M	TAN/TAN	No/No	No/No	No/No	No/No	No/No	Yes	No	Yes	Yes/Yes	NLP/NLP	
V-65 (20)	M	TAN/PAN	No/No	Yes/Yes	Yes/Yes	No/No	Yes/Yes	Yes	No	No	No/No	FC/FC	
V-66 (12)	F	TAN/TAN	No/No	No/No	No/No	No/No	No/No	Yes	No	No	IMP/No	NLP/NLP	
V-67 (8)	M	TAN/TAN	No/No	No/No	No/No	No/No	No/No	Yes	Yes	Yes	No/No	NLP/NLP	
V-74 (15)	M	MP/PAN	No/Yes	No/No	No/No	No/No	No/No	Yes	Yes	No	No/No	NLP/NLP	Microphthalmia (LE)
V-98 (12)	M	TAN/TAN	No/No	No/No	No/No	No/No	No/No	Yes	No	Yes	No/No	NLP/NLP	Microphthalmia
V-100 (6)	M	TAN/TAN	Yes/Yes	No/No	No/No	No/No	No/No	Yes	No	Yes	Yes/Yes	FC/FC	
V-101 (2)	F	PAN/PAN	Yes/Yes	No/No	No/No	No/No	No/No	Yes	Yes	No	No/No	HM/HM	
VI-1 (5)	M	TAN/TAN	No/No	Yes/No	Yes/No	No/No	No/No	Yes	Yes	No	No/No	HM/HM	
VI-2 (3)	M	TAN/TAN	No/No	No/No	No/No	No/No	No/No	Yes	Yes	Yes	?	FC/FC	
VI-7 (11)	F	MP/MP	No/No	No/No	No/No	No/No	No/No	Yes	Yes	Yes	?	HM/HM	
											No/No	20/60/20/80	Microphthalmia (LE)

?, unavailable; FC, finger count; HM, hand motion; IMP, impracticable; LE, left eye; LP, light perception; MP, misshapen pupil; NLP, no light perception; PAN, partial aniridia; RE, right eye; TAN, total aniridia.

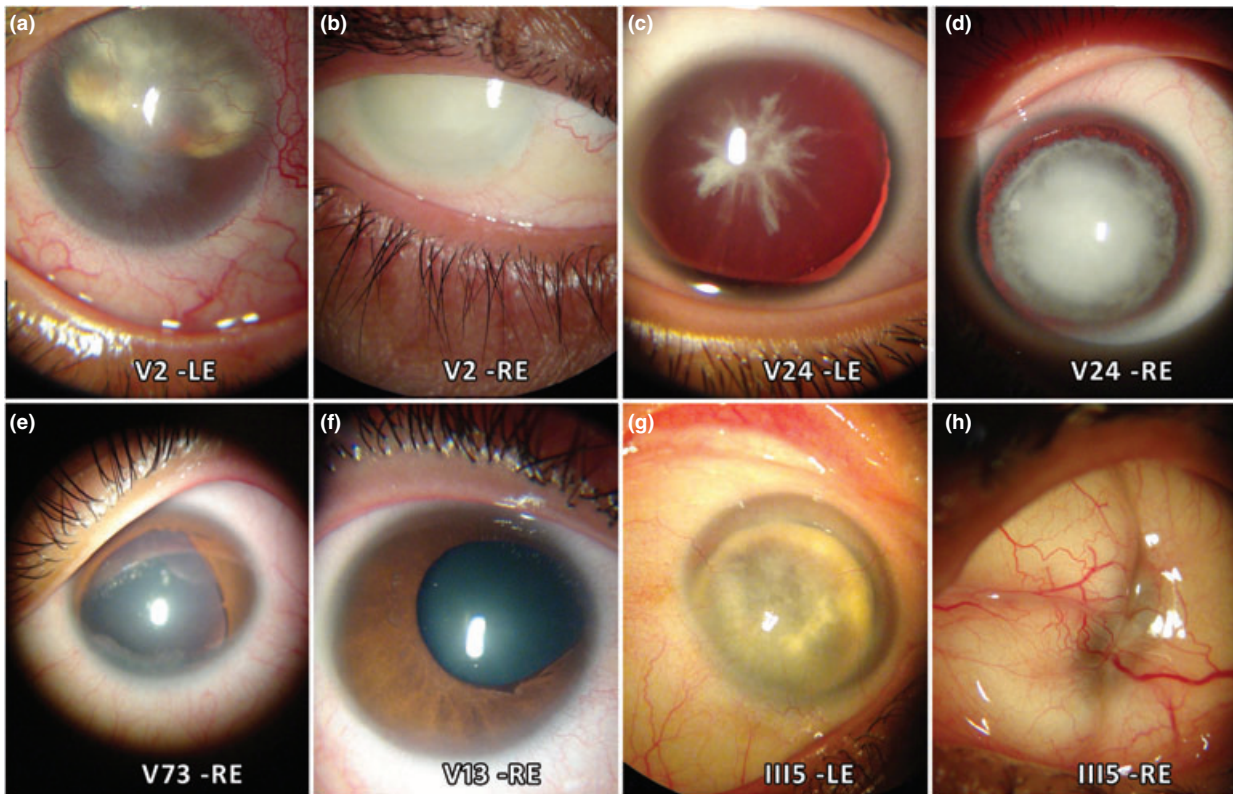


Fig. 2. Clinical features of affected subjects. (a) Subject V-2 left eye = total aniridia, cataract, and corneal opacity and vascularization; (b) Subject V-2 right eye = full corneal opacity; (c) Subject V-24 left eye = total aniridia and star-shaped cataract; (d) Subject V-24 right eye = total aniridia and full cataract; (e) Subject V-74 right eye = partial aniridia; (f) Subject V-13 right eye = misshapen pupil; (g) Subject III-5 left eye = total aniridia, full cataract, corneal vascularization, and subluxed lenses; (h) Subject III-5 right eye = Phthisis bulbi.

of the iris to mild iris defects. Splice site mutations modify or terminate mRNA processing and maturation, and can result in the complete skipping of one or more exons, retention of introns, pseudo-exons, or activation of cryptic splice sites within an exon or an intron. These splice-site mutations may or may not completely abolish expression of the wild-type *PAX6* transcript, which may lead to variation in the morphological phenotype (10–13).

In addition to congenital anomalies, clinical progression of the disorder involves gradual loss of vision combined with a variety of early-onset age-related ocular diseases, which were detected in the majority of the affected subjects in this family. This susceptibility to early-onset eye diseases can be attributed to the anti-apoptotic and multipotent switch functions *PAX6* plays in adult tissues (14), whereby the malfunction of *PAX6* prevents proper cellular maintenance and regeneration in many ocular tissues.

PAX6 is a pleiotropic gene that functions in multiple tissues during development. Homozygous mutations in the human *PAX6* gene result in an absence of nasal bones and defects in parietal bones, in addition to aniridia and other ocular abnormalities (15). Further, previous work in the field identified a subject with a compound heterozygous *PAX6* mutation that presented with severe bilateral microphthalmia and extreme microcephaly (16). Jami et al. (17) found that

pax6 was expressed exclusively in the calvaria and long bone tissues during mouse development. These results indicate that *PAX6* might play a central role in stimulating the differentiation of mature osteoblasts to osteocytes in calvaria bones. Furthermore, this function is likely accomplished through the inhibition of canonical WNT signaling as *PAX6* stimulates the expression of Sclerostin (*SOST*), a WNT pathway inhibitor, by binding to its promoter.

Considering this, our findings regarding the shape of the neurocranium, particularly the marked differences in CI and prominent brachycephalic head shape, may be associated with the severity of the ocular phenotype presented by these individuals. The affected individuals showed half of the correlation ($R^2 = 0.0522$) between face height and CI that their non-affected relatives did ($R^2 = 0.1069$). These results seem to be consistent with the role of *PAX6* in the spatial expression of neurocranial osteocytes, but not facial osteocytes, found in other studies (17). Together, this evidence suggests that the more brachycephalic head shape observed in affected individuals may be a result of the *PAX6* splice-site mutation.

In conclusion, this clinical study reports a large Brazilian family with congenital aniridia, summarizing the clinical variability of ocular phenotypes, related to a particular *PAX6* mutation (c.141 + 1G>A). Moreover,

we have shed light on the role of *PAX6* in the development of the neurocranium. Further research on genetic and environmental factors is needed to better understand the intricate developmental pathways involved in the phenotypic spectrum of congenital aniridia.

Acknowledgements

The authors express their thanks to the patients and family members for their participation in this study. We also wish to thank the Agua Branca Health Department and Municipality for local support, with special thanks to Mrs Cristiany Maria Brandão Dantas for helping us find and assisting with patients' needs. We also thank J. Gómez-Valdés for valuable comments and assistance in the craniofacial analysis. This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and InaGEMP.

References

1. López-García JS, García-Lozano I, Rivas L et al. Congenital aniridia keratopathy treatment. *Arch Soc Esp Ophthalmol* 2006; 81 (8): 435–444.
2. Brauner SC, Walton DS, Chen TC. Aniridia. *Int Ophthalmol Clin* 2008; 48 (2): 79–85.
3. Kokotas H, Petersen MB. Clinical and molecular aspects of aniridia. *Clin Genet* 2010; 77 (5): 409–420.
4. Hingorani M, Hanson I, van Heyningen V. Aniridia. *Eur J Hum Genet* 2012; 20 (10): 1011–1017.
5. Lang D, Powell SK, Plummer RS et al. PAX genes: roles in development, pathophysiology, and cancer. *Biochem Pharmacol* 2007; 73 (1): 1–14.
6. Guerra-Junior G, Spinola-Castro AM, Siviero-Miachon A et al. Absence of mutations in PAX6 gene in three cases of morning glory syndrome associated with isolated growth hormone deficiency. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2008; 52 (8): 1221–1227.
7. França ESS. Mutations and polymorphisms analysis in PAX6 gene of patients with aniridia and morning glory syndrome. Master's thesis, Campinas, 2009, from <http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=000468879>. Accessed on August 10, 2012.
8. Park SH, Park YG, Lee MY et al. Clinical features of Korean patients with congenital aniridia. *Korean J Ophthalmol* 2010; 24 (5): 291–296.
9. Wang P, Guo X, Jia X et al. Novel mutations of the PAX6 gene identified in Chinese patients with aniridia. *Mol Vis* 2006; 12: 644–648.
10. Hubner CA, Senning A, Orth U et al. Mild Pelizaeus-Merzbacher disease caused by a point mutation affecting correct splicing of PLP1 mRNA. *Neuroscience* 2005; 132 (3): 697–701.
11. Noordzij JG, de Bruin-Versteeg S, Hartwig NG et al. XLA patients with BTK splice-site mutations produce low levels of wild-type BTK transcripts. *J Clin Immunol* 2002; 22 (5): 306–318.
12. Varon R, Dutrannoy V, Weikert G et al. Mild Nijmegen breakage syndrome phenotype due to alternative splicing. *Hum Mol Genet* 2006; 15 (5): 679–689.
13. Skjørringe T, Tümer Z, Møller LB. Splice site mutations in the ATP7A gene. *PLoS One* 2011; 6 (4): e18599.
14. Thompson JA, Ziman M. Pax genes during neural development and their potential role in neuroregeneration. *Prog Neurobiol* 2011; 95 (3): 334–351.
15. Hodgson SV, Saunders KE. A probable case of the homozygous condition of the aniridia gene. *J Med Genet* 1980; 17 (6): 478–480.
16. Solomon BD, Pineda-Alvarez DE, Balog JZ et al. Compound heterozygosity for mutations in PAX6 in a patient with complex brain anomaly, neonatal diabetes mellitus, and microphthalmia. *Am J Med Genet A* 2009; 149A (11): 2543–2546.
17. Jami A, Gadi J, Lee MJ et al. Pax6 expressed in osteocytes inhibits canonical Wnt signaling. *Mol Cells* 2013; 35 (4): 305–312.

CAPÍTULO 4
DISCUSSÃO

No artigo apresentado no capítulo anterior descrevemos os resultados do estudo que teve como objetivo investigar uma grande família diagnosticada com aniridia congênita, residente no sertão de Alagoas. Entre aqueles indivíduos afetados observamos uma grande variabilidade fenotípica, desde a aniridia total até a malformação da pupila, outras alterações oculares também foram identificadas, concordando com casos já descritos na literatura (López-García *et al.*, 2006; Brauner *et al.*, 2008; Kokotas & Petersen, 2010; Park *et al.*, 2010). A mesma mutação (c.141+1G>A) foi identificada nos cinco indivíduos afetados testados inicialmente, não sendo observada nos dois controles.

Para complementar este estudo foi feito o sequenciamento do éxon 5 e regiões adjacentes para a detecção da possível mutação causal nos produtos de amplificação da amostra dos outros 26 afetados e nos 27 controles restantes. A mesma mutação foi identificada em todos os indivíduos afetados e ausente em não-afetados. Com os dados moleculares obtidos e a análise do heredograma concluímos que o padrão de herança desta característica na família é autossômico dominante, com provável penetrância completa e expressividade variável. Em 1961 Grove e colaboradores estudaram uma família canadense com 77 indivíduos afetados, através de cinco gerações, descendentes de uma única mulher também afetada, nascida em 1824 (Grove *et al.*, 1961), identificando herança autossômica dominante e penetrância completa.

A mutação identificada em todos os indivíduos afetados desta família é uma mudança de G>A no primeiro nucleotídeo do íntron 5 (c.141+1G>A). Esta mutação foi primeiro descrita por Wang *et al.* (2006) e segundo os autores provavelmente leva a uma alteração no *donor splice site* do éxon 5, que contém o *paired domain*. Um estudo através de ensaios de transfecção tem mostrado um mecanismo dominante-negativo quando foram co-expressas proteínas PAX6 normais e proteínas PAX6 com a região C-terminal parcialmente truncada. As proteínas mutantes que perderam o domínio de ativação (PST) e que ainda conservaram os domínios de ligação (PD e HD) mantiveram a capacidade de ligação ao DNA, mas perderam a capacidade de ativar a transcrição, agindo como repressores (Singh *et al.*, 1998). Mutações na região C-terminal e que

preservaram o *paired domain* e o *homeodomain* já foram associadas ao fenótipo com aniridia total, enquanto que mutações com perda do *homeodomain* e com ou sem perda do *paired domain* já foram por sua vez relacionadas ao fenótipo de indivíduos com aniridia parcial (Vincent *et al.*, 2002; Atchaneeyasakul *et al.*, 2006).

A expressividade variável encontrada nos sujeitos afetados desta família pode ocorrer em consequência do tipo de mutação encontrada e pelo fato de o gene *PAX6* possuir diversas isoformas, sendo duas mais estudadas, a forma canônica, uma proteína de 422 aminoácidos, e uma segunda proteína derivada de um *splice* alternativo que possui uma pequena inserção (+ éxon 5a) no *paired domain*. Uma mutação associada à aniridia congênita e catarata que afeta o *acceptor splice site* do íntron 5 poderia levar a uma perturbação no *splice* alternativo do éxon 5a, resultando em uma taxa desbalanceada dos dois transcritos. Taxas reduzidas dos transcritos poderiam estar associadas a fenótipos menos graves, maior variabilidade fenotípica ou ainda fenótipos relacionados à aniridia (Glaser *et al.*, 1994; Prosser & Heyningen, 1998).

Os indivíduos afetados possuem maior índice cefálico (CI) quando comparados aos seus parentes normais e apresentam uma maior frequência de braquicefalia. Podemos sugerir que este fenótipo pode ocorrer como consequência da mutação c.141+1G>A já que o gene *PAX6* tem um efeito pleiotrópico, e camundongos nocauteados para este gene geralmente tem além de malformações oculares, malformações craniofaciais (Xu *et al.*, 1999; Kleinjan *et al.*, 2006; Laakso, 2009, Suga *et al.*, 2010). Além disso, Jami *et al.* (2013) encontraram evidências de que *PAX6* é expresso somente na calvária durante o desenvolvimento do crânio em camundongos. Estes autores sugeriram que o gene *PAX6* pode ter um papel central no estímulo para a diferenciação e maturação de osteoblastos através da inibição da sinalização canônica da rota de sinalização Wnt.

Outra alternativa para a participação do gene *PAX6* durante o desenvolvimento craniofacial seria via interação MSX-PAX. Os genes *MSH*

Homeobox (MSX1 e MSX2) têm um importante papel nas estruturas craniofaciais, camundongos nocauteados para ambos os genes exibem defeitos na ossificação das suturas calvárias (Alappat *et al.*, 2003; Ogawa *et al.*, 2005; Fleischmannova *et al.*, 2008; Finnerty *et al.*, 2009). MSX e PAX interagem e são simultaneamente expressos em vários tecidos durante o desenvolvimento. PAX6/MSX1/MSX2 são expressos juntos nos eventos iniciais da morfogênese craniofacial e do tubo neural/somitos, além dos olhos (Foerst-Potts & Sadler, 1997). Existe evidência de uma relação funcional entre PAXs e MSXs, com interações em dois níveis, os fatores de transcrição PAXs ligam-se diretamente ao promotor dos genes *MSXs*, e proteínas PAXs/MSXs podem formar complexos heterodiméricos (Bang *et al.*, 1999; Ogawa *et al.*, 2005, 2006).

Por meio da análise do heredograma foi possível identificar a existência de um indivíduo afetado fruto de uma união consanguínea entre primos de primeiro grau, ambos também afetados. Na literatura já foram descritos raros casos de possíveis homozigotos. Um casamento entre primos de segundo grau resultou em seis gestações, a primeira uma menina com aniridia bilateral, falecida com 11 meses com suspeita de meningite, três meninos que faleceram com menos de 24 horas por dificuldade respiratória, porém sem relato a respeito dos olhos, um aborto espontâneo após três meses de gestação e um feto morto removido por meio de uma histerectomia, sem a realização de exames para identificação de possíveis defeitos congênitos ou a causa da morte (Grove *et al.*, 1961). Outro estudo relata um possível caso de homozigoto (heterozigoto composto) entre indivíduos não aparentados que resultou em uma menina natimorta com 37 semanas de gestação. Foi observada a ausência de olhos, fissura palpebral, ossos nasais, pequena cavidade nasal entre outros achados clínicos. Não foram detectadas anormalidades nos sistemas digestório, cardiovascular e respiratório (Hodgson & Saunders, 1980).

Em um terceiro estudo, uma menina, nascida de parto cesáreo com 43 semanas, apresentava microcefalia, atresia coanal e anoftalmia com fusão das pálpebras, malformações cerebrais entre outros achados clínicos. Foram realizados testes moleculares nos pais e na criança para identificação da

mutação. No pai foi encontrada uma mutação no éxon 12 e na mãe uma mutação no éxon 6, ambas são resultantes da substituição de um único par de bases gerando um *stop codon* e aparecem em heterozigose, a criança herdou as duas mutações, sendo portanto um heterozigoto composto (Glaser *et al.*, 1994).

O fenótipo apresentado pela presença de mutações nos dois alelos *PAX6* é muito grave, e na literatura está descrito um único caso em que um indivíduo sobreviveu: um menino de 4 anos, diagnosticado também com trissomia do 21, que herdou do pai uma mutação *missense* no *paired domain* (c.112C>T) e da mãe uma mutação *nonsense* no *homeodomain* (c.718C>T). Esta criança apresentava hipopituitarismo, *diabetes mellitus* e anormalidades cerebrais e oftalmológicas. Este é um raro caso de sobrevivência neonatal de um heterozigoto composto para o *PAX6* (Solomon *et al.*, 2009). Por esta razão acreditamos que o indivíduo, filho de dois afetados consanguíneos, identificado na família de Água Branca não seja um homozigoto, porém será necessária a análise molecular para confirmação do genótipo.

Os indivíduos afetados aparentemente apresentam um *fitness* reprodutivo maior quando comparados aos seus parentes não-afetados, o que não seria esperado considerando que a mutação é patogênica. Fazendo uma comparação entre os núcleos familiares com indivíduos afetados e núcleos familiares com indivíduos não-afetados na geração IV, foi mostrada que a taxa de fecundidade nos indivíduos afetados foi 32% mais alta e eles tiveram uma média de 4,66 filhos enquanto seus parentes não-afetados tiveram em média 3,98 filhos. Foram identificadas tendências similares na família canadense, porém o gene para aniridia provavelmente não contribui, sozinho, para o aumento na fertilidade (Grove *et al.*, 1961).

A família deste estudo habita o município de Água Branca no Estado de Alagoas, esta cidade se localiza no sertão, uma região semiárida do Nordeste do Brasil. Esta área é uma das áreas mais vulneráveis socialmente e ambientalmente do país, com um índice Gini de 0,40 e uma incidência de pobreza de 57,62%. Condições sanitárias inadequadas afetam 37,9% dos domicílios. O

valor do índice Gini para o Estado de Alagoas é de 0,47, valor próximo ao calculado para todo o país (0,50), porém ainda possui uma maior incidência de pobreza (59,54%) na região Nordeste (IBGE, 2010).

As condições sociais da maior parte da família são precárias. Muitas crianças não frequentam a escola, pois não possuem visão adequada suficiente para acompanhar a rotina escolar, além do fato de não existir na região escolas e profissionais capacitados. Alguns jovens ainda possuem visão suficiente para a realização de alguns trabalhos, mas a exemplo de outros indivíduos da família, a visão é perdida progressivamente, ocorrendo em seguida o abandono da ocupação. Há ainda relatos de casos de alcoolismo e indivíduos ainda muito jovens com perda quase total da visão impedindo-os de trabalhar ou estudar e vivendo exclusivamente, ou quase, de auxílios governamentais, assim como muitos outros integrantes da família. É possível que estas condições afetem a saúde como um todo e a gravidade da aniridia nesta família. Dados muito similares foram observados na família descrita por Grove *et al.* (1961), que vive em uma área subdesenvolvida da região oriental do Canadá. Infelizmente não há na literatura estudos mais recentes documentados envolvendo grandes famílias com várias gerações de afetados, o que não nos permite no momento avaliar o significado biológico destes resultados.

Dois indivíduos apresentaram atraso no desenvolvimento e déficit de aprendizagem, porém ambos possuem histórico de interferências de fatores ambientais pré e pós-natais. De modo geral existe uma forte correspondência entre os padrões de defeitos congênitos no sistema nervoso central (SNC) e a distribuição dos transcritos do *PAX6*, onde são expressos altos níveis da proteína *PAX6* durante o desenvolvimento e estão ausentes ou fortemente reduzidos tanto em humanos quanto em camundongos com mutações no *PAX6*. É provável que o sistema de desenvolvimento do SNC seja sensível à diminuição na dosagem da proteína *PAX6* e pode estar sujeito a uma atenuação ao longo de uma cadeia de propagação (Glaser *et al.*, 1994; Stoykova & Gruss, 1994).

Importante salientar que é possível que fatores ambientais estejam relacionados às questões aqui discutidas, porém ainda buscamos por potenciais fatores genéticos que poderiam contribuir para o alto nível de variabilidade nos indivíduos afetados desta família, focando nas mutações no gene *PAX6*.

Nossas visitas à cidade de Água Branca para investigação da família causaram um impacto considerável, mobilizando autoridades do setor público e chamando a atenção da população para esta característica rara. Esperamos deste modo que além do conhecimento científico proporcionado por este estudo, a família possa ser cada vez mais beneficiada, recebendo a atenção adequada para uma melhor qualidade de vida. Uma equipe multidisciplinar vem sendo edificada ao longo do estudo, abrangendo a área clínica, oftalmológica, genética e social, dando-nos suporte para compreender os vários achados nesta família.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alappat S, Zhang ZY, Chen YP (2003) Msx homeobox gene family and craniofacial development. *Cell Res* 13(6):429-42.

Anderson SR, Geertinger P, Larsen HW, Mikkelsen M, Parving A, Vestermark S, Warburg M (1978) Aniridia, cataract and gonadoblastoma in a mentally retarded girl with deletion of chromosome 11: a clinicopathological case report. *Ophthalmologica* 176(3):171-77.

Andrade JGR, Guaragna MS, Soardi FC, Guerra-Júnior G, Mello MP, Maciel-Guerra AT (2008) Clinical and genetics findings of five patients with WT1-related disorders. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 52(8):1236-43.

Atchaneeyasakul LO, Trinavarat A, Dulayajinda D, Kumpornsin K, Thongnoppakhun W, Yenchitsomanus PT, Limwongse C (2006) Novel and de-novo truncating *PAX6* mutations and ocular phenotypes in Thai aniridia patients. *Ophthalmic Genet* 27(1):21-7.

Balczarek KA, Lai ZC, Kumar S (1997) Evolution of functional diversification of the paired box (Pax) DNA-binding domains. *Mol Biol Evol* 14(8):829-42.

Bang AG, Papalopulu N, Goulding MD, Kintner C (1999) Expression of Pax-3 in the lateral neural plate is dependent on a Wnt-mediated signal from posterior nonaxial mesoderm. *Dev Biol* 212(2):366-80.

Brauner SC, Walton DS, Chen TC (2008) Aniridia. *Int Ophthalmol Clin* 48(2): 79-85.

Breitling R, Gerber JK (2000) Origin of the paired domain. *Dev Genes Evol* 210(12):644-50.

Chi N, Epstein JA (2002) Getting your Pax straight: Pax proteins in development and disease. *Trends Genet* 18(1):41-47.

Chow RL, Altmann CR, Lang RA, Hemmati-Brivanlou A (1999) Pax6 induces ectopic eyes in a vertebrate. *Development* 126(19):4213-22.

Christianson A, Howson CP, Modell B (2006) March of Dimes Birth. Global Report on Birth Defects. The hidden toll of dying and disabled children. March of Dimes Birth Defects Foundation, New York, 85 pp.

Christianson A, Modell B (2004) Medical genetics in developing countries. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 5:219-65.

Danno H, Michiue T, Hitachi K, Yukita A, Ishiura S, Asashima M (2008) Molecular links among the causative genes for ocular malformation: Otx2 and Sox2 coregulate Rax expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(14):5408-13.

Epstein J, Cai J, Glaser T, Jepeal L, Maas R (1994) Identification of a Pax paired domain recognition sequence and evidence for DNA-dependent conformational changes. *Journal Bio Chem* 269(11):8355-61.

Fantes J, Ragge NK, Lynch SA, McGill NI, Collin JR, Howard-Peebles PN, Hayward C, Vivian AJ, Williamson K, van Heyningen V, FitzPatrick DR (2003) Mutations in SOX2 cause anophthalmia. *Nat Genet* 33(4):461-63.

Fisher B, Rose NC, Carey JC (2008) Principles and practice of teratology for the obstetrician. *Clin Obstet Gynecol* 51(1):106-118.

Finnerty JR, Mazza ME, Jezewski PA (2009) Domain duplication, divergence, and loss events in vertebrate Msx paralogs reveal phylogenomically informed disease markers. *BMC Evol Biol* 9:18.

Fleischmannova J, Matalova E, Tucker AS, Sharpe PT (2008) Mouse models of tooth abnormalities. *Eur J Oral Sci* 116(1):1-10.

Foerst-Potts L, Sadler TW (1997) Disruption of Msx-1 and Msx-2 reveals roles for these genes in craniofacial, eye, and axial development. *Dev Dyn* 209(1):70-84.

França ESS (2009) Mutations and polymorphisms analysis in *PAX6* gene of patients with Aniridia and Morning Glory Syndrome. Master's thesis. Campinas. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=000468879>. Acesso em: Agosto 2012.

Glaser T, Jepeal L, Edwards JG, Young SR, Favor J, Maas RL (1994) *PAX6* gene dosage effect in a family with congenital cataracts, aniridia, anophthalmia and central nervous system defects. *Nat Genet* 7(4):463-471.

Graziano C, D'Elia AV, Mazzanti L, Moscano F, Guidi SG, Scarano E, Turchetti D, Franzoni E, Romeo G, Damante G, Seri M (2007) A de novo nonsense mutation of *PAX6* gene in a patient with aniridia, ataxia, and mental retardation. *Am J Med Genet A* 143A(15):1802-05.

Grove JH, Shaw MW, Bourque G (1961) A family study of aniridia. *Arch Ophthalmol* 65:81-94.

Hanson IM, Seawright A, Hardman K, Hodgson S, Zaletayev D, Fekete G, van Heyningen V (1993) *PAX6* mutations in aniridia. *Hum Mol Genet* 2(7):915-20.

Hanson IM (2003) *PAX6* and congenital eye malformations. *Pediatr Res* 54(6):791-96.

Hever AM, Williamson KA, van Heyningen V (2006) Developmental malformations of the eye: the role of *PAX6*, *SOX2* and *OTX2*. *Clin Genet* 69(6):459-70.

Hetzer-Egger C, Schorpp M, Boehm T (2000) Evolutionary conservation of gene structures of the Pax1/9 gene family. *Biochim Biophys Acta* 1492(2-3): 517–21.

Hodgson SV, Saunders KE (1980) A probable case of the homozygous condition of the aniridia gene. *J Med Genet* 17(6):478-80.

Horovitz DDG, Ferraz VEF, Dain S, Marques-de-Faria AP (2013) Genetic services and testing in Brazil. *J Community Genet* 4(3):355-75.

Jami A, Gadi J, Lee MJ, Kim EJ, Lee MJ, Jung HS, Kim HH, Lim SK (2013) Pax6 expressed in osteocytes inhibits canonical Wnt signaling. *Mol Cells* 35(4): 305-12.

Jordan T, Hanson I, Zaletayev D, Hodgson S, Prosser J, Seawright A, Hastie N, van Heyningen V (1992) The human *PAX6* gene is mutated in two patients with aniridia. *Nat Genet* 1(5):328-32.

Kleinjan DA, Seawright A, Mella S, Carr CB, Tyas DA, Simpson TI, Mason JO, Price DJ, van Heyningen V (2006) Long-range downstream enhancers are essential for Pax6 expression. *Dev Biol* 299(2):563–81.

Kokotas H, Petersen MB (2010) Clinical and molecular aspects of aniridia. *Clin Genet* 77(5): 409–20.

Laakso M (2009) Not for the eyes only: PAX6 and glucose metabolism. *Diabetologia* 52(3):381-84.

Llerena Jr JC, Cabral de Almeida JC, Bastos E, Crolla JA (2000) FISH studies in a girl with sporadic aniridia and a apparently balanced *de novo* t(11;13)(p13;q33) translocation detect a microdeletion involving the WAGR region. *Genet Mol Biol* 23(3):535-39.

López-García JS, García-Lozano I, Rivas L, Martínez-Garchitorena J (2006) Congenital aniridia keratopathy treatment. *Arch Soc Esp Oftalmol* 81(8):435-44.

Malandrini A, Mari F, Palmeri S, Gambelli S, Berti G, Bruttini M, Bardelli AM, Williamson K, van Heyningen V, Renieri A (2001) *PAX6* mutation in a family with aniridia, congenital ptosis, and mental retardation. *Clin Genet* 60(2):151-54.

Miller RW, Fraumeni JF Jr, Manning MD (1964) Association of Wilms' tumor with aniridia, hemihypertrophy and other congenital malformations. *N Engl J Med* 270:922-27.

Mirkinson AE, Mirkinson NK (1975) A familial syndrome of aniridia and absence of the patella. *Birth Defects Orig Art Ser* 11(5):129-31.

Mitchell TN, Free SL, Williamson KA, Stevens JM, Churchill AJ, Hanson IM, Shorvon SD, Moore AT, van Heyningen V, Sisodiya SM. (2003) Polymicrogyria and absence of pineal gland due to *PAX6* mutation. *Ann Neurol* 53(5):658-63.

Nelson LB, Spaeth GL, Nowinski TS, Margo CE, Jackson L (1984) Aniridia. A review. *Surv Ophthalmol* 28(6):621-42.

Ogawa T, Kapadia H, Wang B, D'Souza RN (2005) Studies on Pax9-Msx1 protein interactions. *Arch Oral Biol* (2):141-45.

Ogawa T, Kapadia H, Feng JQ, Raghov R, Peters H, D'Souza RN (2006) Functional consequences of interactions between Pax9 and Msx1 genes in normal and abnormal tooth development. *J Biol Chem* 281(27):18363-69.

Park SH, Park YG, Lee MY, Kim MS (2010) Clinical Features of Korean Patients with Congenital Aniridia. *Korean J Ophthalmol* 24(5): 291-96.

Park SH, Kim, MS, Chae H, Kim Y, Kim M (2012) Molecular analysis of the *PAX6* gene for congenital aniridia in the Korean population: Identification of four novel mutations. *Mol Vis* 18:488-494.

Prosser J, van Heyningen V (1998) PAX 6 mutations reviewed. *Hum Mutat* 11(2):93-108.

Quiring R, Walldorf U, Kloter U, Gehring WJ (1994) Homology of the eyeless gene of *Drosophila* to the Small eye gene in mice and Aniridia in humans. *Science* 265(5173):785-89.

Riccardi VM, Sujansky E, Smith AC, Francke, U (1978) Chromosomal imbalance in the aniridia-Wilms' tumor association: 11p interstitial deletion. *Pediatrics* 61(4):604-10.

Robson EJD, He SJ, Eccles MR (2006) A PANorama of PAX genes in cancer and development. *Nat Rev Cancer* 6(1):52-62.

Shaw MW, Falls HF, Neel JV (1960) Congenital aniridia. *Am J Hum Genet* 12(4 Pt 1):389-415.

Singh S, Tang HK, Lee JY, Saunders GF (1998) Truncation mutations in the transactivation region of *PAX6* result in dominant-negative mutants. *J Biol Chem* 273(34):21531-41.

Simpson TI, Price DJ (2002) *Pax6*; a pleiotropic player in development. *Bioessays* 24(11):1041-51.

Snustad DP, Simmos MJ (2008) Herança de Características Complexas. In: Fundamentos de Genética. 4ª edição. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp 756-758.

Solomon BD, Pineda-Alvarez DE, Balog JZ, Hadley D, Gropman AL, Nandagopal R, Han JC, Hahn JS, Blain D, Brooks B *et al.* (2009) Compound heterozygosity for mutations in *PAX6* in a patient with complex brain anomaly, neonatal diabetes mellitus, and microphthalmia. *Am J Med Genet A* 149A(11): 2543-46.

Stoykova A, Gruss P (1994) Roles of Pax-genes in developing and adult brain as suggested by expression patterns. *J Neurosci* 14(3 Pt 2):1395-412.

Suga H, Tschopp P, Graziussi DF, Stierwald M, Schmid V, Gehring WJ (2010) Flexibly deployed Pax genes in eye development at the early evolution of animals demonstrated by studies on a hydrozoan jellyfish. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(32):14263-68.

Ticho BH, Hilchie-Schmidt C, Egel RT, Traboulsi EI, Howarth RJ, Robinson D (2006) Ocular findings in Gillepsie-like syndrome: association with a new *PAX6* mutation. *Ophthalmic Genet* 27(4):145-49.

Tremblay F, Gupta SK, De Becker I (1998) Effects of *PAX6* mutations on retinal function: an electroretinographic study. *Am J Ophthalmol* 126(2):211-18.

Valenzuela A, Cline RA (2004) Ocular and nonocular findings in patients with aniridia. *Can J Ophthalmol* 39(6):632-38.

Valleix S, Niel F, Nedelec B, Algros MP, Schwartz C, Delbosc B, Delpech M, Kantelip B (2006) Homozygous nonsense mutation in the *FOXE3* gene as a cause of congenital primary aphakia in humans. *Am J Hum Genet* 79(2):358-64.

Vincent MC, Pujo AL, Olivier D, Calvas P (2003) Screening for *PAX6* gene mutations is consistent with haploinsufficiency as the main mechanism leading to various ocular defects. *Eur J Hum Genet* 11(2):163-69.

Voronina VA, Kozhemyakina EA, O'Kernick CM, Kahn ND, Wenger SL, Linberg JV, Schneider AS, Mathers PH (2004). Mutations in the human *RAX* homeobox gene in a patient with anophthalmia and sclerocornea. *Hum Mol Genet* 13(3):315-22.

Wang P, Guo X, Jia X, Li S, Xiao X, Zhang Q (2006) Novel mutations of the *PAX6* gene identified in Chinese patients with aniridia. *Mol Vis* 12: 644-48.

Walther C, Gruss P (1991) Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development* 113(4):1435-49.

World Health Organization (1999a) Services for the prevention and management of genetic disorders and birth defects in developing countries. Report of a joint WHO/WAOPBD meeting. WHO, The Hague, 95 pp.

World Health Organization (2006) Management of Birth Defects and Haemoglobin Disorders. WHO, Geneva, 27 pp.

Xu P, Zhang X, Heaney S, Yoon A, Michelson A, Maas R (1999) Regulation of PAX6 expression is conserved between mice and flies. *Development* 126(2):383-95.

Zhou J, Kherani F, Bardakjian TM, Katowitz J, Hughes N, Schimmenti LA, Schneider A, Young TL (2008) Identification of novel mutations and sequence variants in the SOX2 and CHX10 genes in patients with anophthalmia/microphthalmia. *Mol Vis* 14:583-592.

RECURSOS ONLINE

E!Ensembl

<http://www.ensembl.org/index.html> (Novembro 30, 2013)

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE),

<http://www.ibge.gov.br/english/> (Novembro 17, 2013)

Leiden Open Variation Database (LOVD)

http://lsdb.hgu.mrc.ac.uk/home.php?select_db=PAX6 (Novembro 30, 2013)

Overview document to the PHG Foundation toolkit for assessing health needs in relation to congenital disorders (PHG Foundation),

<http://toolkit.phgfoundation.org/overview.pdf> (Novembro 17, 2013)

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM),

<http://www.omim.org/> (Dezembro 02, 2013)

ANEXO 1

FIGURA 1 DO ARTIGO “OCULAR AND CRANIOFACIAL PHENOTYPES IN A LARGE BRAZILIAN FAMILY WITH CONGENITAL ANIRIDIA” AMPLIADA

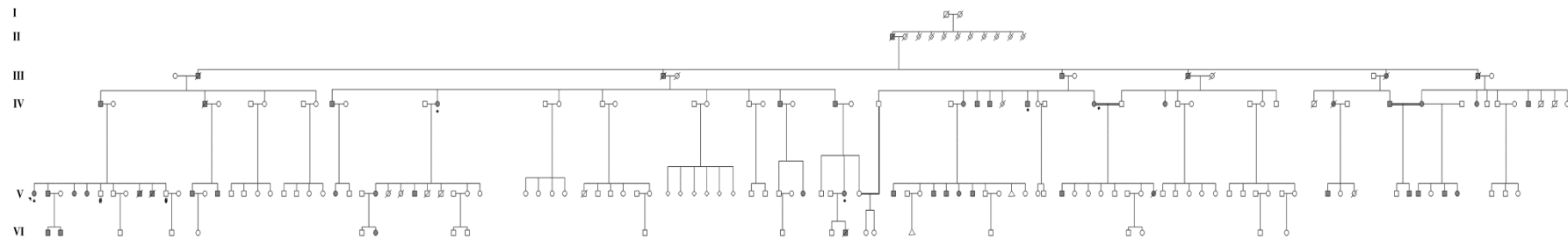


Figure 1. Family pedigree with 53 identified members diagnosed with aniridia in five generations of the family. 5 affected individuals with molecular screening; 2 unaffected individuals with molecular screening.

ANEXO 2

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação clínica e genética em famílias com aniridia congênita

Pesquisador: LAVINIA SCHULER FACCINI

Área Temática: Área 1. Genética Humana.

(Trata-se de pesquisa envolvendo genética humana não contemplada acima.);

Versão: 2

CAAE: 10131012.6.0000.5347

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL/COMITÊ DE ÉTICA EM

Patrocinador Principal: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico ((CNPq))

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 195.023

Data da Relatoria: 07/02/2013

Apresentação do Projeto:

O estudo pretende avaliar uma comunidade localizada em Água Branca, Alagoas, onde várias pessoas são afetadas pela aniridia. A aniridia é uma condição genética rara, com uma forma de herança autossômica dominante, com alta penetrância e expressividade variável. Entre os problemas de saúde, destaca-se a perda parcial ou total da visão. O estudo de famílias com muitos afetados tanto do ponto de vista clínico como molecular, permite não apenas a identificação da mutação patogênica, mas também a identificação de genes modificadores possivelmente envolvidos na manifestação fenotípica desta condição.

Em março de 2012, uma senhora de 29 anos com diagnóstico de aniridia foi atendida no Serviço de Genética Clínica do Hospital Universitário da UFAL para aconselhamento genético. Durante a consulta, foi relatada a presença de diversos outros afetados, todos residentes no município de Água Branca. Um contato inicial com esta família indicou o interesse de participação em uma investigação mais ampla dos afetados e seus familiares com vistas ao aconselhamento genético e orientações para cuidado e tratamento.

Objetivo da Pesquisa:

Investigar famílias com aniridia congênita na população brasileira. Na primeira etapa da pesquisa será realizada a investigação de indivíduos com aniridia e seus familiares, residentes em Água

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - 2º andar do Prédio da Reitoria - Campus Centro

Bairro: Farroupilha

CEP: 90.040-060

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3308-3738

Fax: (51)3308-4085

E-mail: etica@propesq.ufrgs.br

Branca, Alagoas. Num segundo momento amostras de saliva serão coletadas para que a investigação em nível de DNA possa ser realizada. Os autores pretendem identificar a(s) mutação (ões) envolvida(s) na patologia que acomete os pacientes de Água Branca, e deste modo, contribuir para o diagnóstico e aconselhamento genético dos envolvidos. Além disso, o estudo também pretende gerar conhecimento sobre as rotas de genes envolvidos no desenvolvimento ocular.

Visto este ser um projeto conectado a outros, vale lembrar que os pacientes que participarão do presente estudo serão acompanhados por uma equipe multidisciplinar, incluindo médicos oftalmologistas, de modo que entre os objetivos da proposta está o acompanhamento e tratamento dos afetados e familiares.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Adequadamente apresentados após cumprimento das diligências.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto apresenta relevância científica e social, sendo que a presente versão atendeu as diligências solicitadas pelo CEP-UFRGS.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequado.

Recomendações:

Aprovar.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Atendido todos as diligências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto apresenta relevância científica e social, sendo que a presente versão atendeu as diligências solicitadas pelo CEP-UFRGS.

Encaminha-se



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO GRANDE DO SUL / PRÓ-
REITORIA DE PESQUISA -



PORTO ALEGRE, 07 de Fevereiro de 2013

Assinador por:
MARIA DA GRAÇA CORSO DA MOTTA
(Coordenador)

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - 2º andar do Prédio da Reitoria - Campus Centro

Bairro: Farroupilha

CEP: 90.040-060

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3308-3738

Fax: (51)3308-4085

E-mail: etica@propesq.ufrgs.br

ANEXO 3

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Adulto)

Projeto: Avaliação clínica e genética em famílias com aniridia congênita

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estamos estudando fatores genéticos que podem estar relacionados a um defeito de nascença da íris que se chama aniridia, e que pode levar à cegueira. Para isso, vamos analisar histórias das famílias com aniridia, onde são importantes informações tanto dos afetados, como dos seus familiares sem aniridia. Precisaremos realizar uma entrevista com perguntas sobre a história da sua família, fazer um exame clínico e oftalmológico em você e seus filhos (se tiver), coletar amostras de saliva sua e de seus filhos e realizar fotografias do seu rosto e de seus filhos. Além disso, se você autorizar, iremos consultar seus registros médicos e de seus filhos em hospitais ou postos de saúde para obter informações complementares.

Gostaríamos de pedir a sua autorização para realizar estes procedimentos. Algumas pessoas podem preferir participar de apenas uma etapa da pesquisa e não de outras, sem que isso seja um impedimento. O material coletado será utilizado única e exclusivamente para fins do projeto de pesquisa, isto é, para a pesquisa de fatores envolvidos na aniridia, sendo garantido o sigilo das informações obtidas. As análises dos fatores genéticos serão feitas no Departamento de Genética na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

A coleta de saliva é um procedimento indolor e será realizada por pessoal devidamente treinado utilizando um recipiente descartável e individual. O contato da boca é com a parte esterilizada do recipiente, portanto não há risco de contaminação.

Você terá direito ao acesso aos resultados da investigação genética. Se tiver interesse, vamos lhe entregar estes resultados através de uma consulta médica que se chama aconselhamento genético. Nesta consulta explicaremos o que estes resultados significam para sua saúde e de seus filhos. Poderemos lhe explicar também quais são as chances que você tem de ter filhos com aniridia e que tipos de tratamento são disponíveis para melhorar a sua saúde.

Os pesquisadores responsáveis pelo projeto são os médicos geneticistas, Profa. Lavinia Schuler-Faccini, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (51 3308-9826) e a Profa. Isabella Monlleo (82 3202-3774) e o Prof. Reinaldo Luna (82 3315-6711) que poderão ser contatados em caso de dúvidas, assim como o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (51 3308-3629).

Ao participar deste projeto você tem o direito de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida a cerca da pesquisa. Também tem liberdade de não participar do estudo ou de mudar de ideia mesmo depois de ter concordado.

A. Consentimentos dados pelo participante com idade adulta legal

Coleta de dados familiares e de saúde (entrevista)

- Concordo em fornecer informações sobre mim e minha família, relacionadas ao nascimento de pessoas com aniridia e outros dados de saúde.
- Não concordo em fornecer informações sobre mim e minha família, relacionadas ao nascimento de pessoas com aniridia e outros dados de saúde.

Exame físico e oftalmológico

- Concordo em ser examinado por médicos geneticistas e oftalmologistas.
- Não concordo em ser examinado por médicos geneticistas e oftalmologistas.

Coleta de material biológico (saliva)

- Concordo em fornecer amostra de saliva para extração de DNA para análise de fatores genéticos envolvidos com aniridia.
- Não concordo em fornecer amostra de saliva para extração de DNA para análise de fatores genéticos envolvidos com aniridia.

Coleta de fotografias

- Autorizo a realização de fotografias de meu rosto.
- Não autorizo a realização de fotografias de meu rosto.

Autorização para acesso de informações de prontuários

- Autorizo a consulta de dados dos meus prontuários médicos.
- Não autorizo a consulta de dados dos meus prontuários médicos.

Declaro que li ou me foi lido este termo e que minhas dúvidas foram esclarecidas antes da concordância na participação. Declaro ainda que uma cópia deste termo me foi fornecida.

Nome do participante: _____

Assinatura ou impressão digital: _____

Testemunha no caso de participante não alfabetizado: _____

Data: _____

Nome do pesquisador: _____

Assinatura: _____

Data: _____

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Criança e Adolescente)

Projeto: Avaliação clínica e genética em famílias com aniridia congênita

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estamos estudando fatores genéticos que podem estar relacionados a um defeito de nascença da íris que se chama aniridia, e que pode levar à cegueira. Para isso, vamos analisar histórias das famílias com aniridia, onde são importantes informações tanto dos afetados, como dos seus familiares sem aniridia. Precisaremos realizar uma entrevista com perguntas sobre a história da sua família, fazer um exame clínico e oftalmológico em você e seus filhos (se tiver), coletar amostras de saliva sua e de seus filhos e realizar fotografias do seu rosto e de seus filhos. Além disso, se você autorizar, iremos consultar seus registros médicos e de seus filhos em hospitais ou postos de saúde para obter informações complementares.

Gostaríamos de pedir a sua autorização para realizar estes procedimentos. Algumas pessoas podem preferir participar de apenas uma etapa da pesquisa e não de outras, sem que isso seja um impedimento. O material coletado será utilizado única e exclusivamente para fins do projeto de pesquisa, isto é, para a pesquisa de fatores envolvidos na aniridia, sendo garantido o sigilo das informações obtidas. As análises dos fatores genéticos serão feitas no Departamento de Genética na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

A coleta de saliva é um procedimento indolor e será realizada por pessoal devidamente treinado utilizando um recipiente descartável e individual. O contato da boca é com a parte esterilizada do recipiente, portanto não há risco de contaminação.

Você terá direito ao acesso aos resultados da investigação genética. Se tiver interesse, vamos lhe entregar estes resultados através de uma consulta médica que se chama aconselhamento genético. Nesta consulta explicaremos o que estes resultados significam para sua saúde e de seus filhos. Poderemos lhe explicar também quais são as chances que você tem de ter filhos com aniridia e que tipos de tratamento são disponíveis para melhorar a sua saúde.

Os pesquisadores responsáveis pelo projeto são os médicos geneticistas, Profa. Lavinia Schuler-Faccini, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (51 3308-9826) e a Profa. Isabella Monlleo (82 3202-3774) e o Prof. Reinaldo Luna (82 3315-6711) que poderão ser contatados em caso de dúvidas, assim como o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (51 3308-3629).

Ao participar deste projeto você tem o direito de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida a cerca da pesquisa. Também tem liberdade de não participar do estudo ou de mudar de ideia mesmo depois de ter concordado.

B. Consentimentos dados pelos pais (ou tutor legal) da criança ou adolescente

Coleta de dados familiares e de saúde (entrevista)

- Concordo em fornecer informações de saúde.
- Não concordo em fornecer informações de saúde.

Exame físico e oftalmológico

- Concordo que seja realizado examinado por médicos geneticistas e oftalmologistas.
- Não concordo que seja realizado examinado por médicos geneticistas e oftalmologistas.

Coleta de material biológico (saliva)

- Concordo em fornecer amostra de saliva para extração de DNA para análise de fatores genéticos envolvidos com aniridia.
- Não concordo para extração de DNA para análise de fatores genéticos envolvidos com aniridia.

Autorização para acesso de informações de prontuários

- Autorizo a consulta de dados dos prontuários médicos.
- Não autorizo a consulta de dados dos prontuários médicos.

Declaro que li ou me foi lido este termo e que minhas dúvidas foram esclarecidas antes da concordância na participação. Declaro ainda que uma cópia deste termo me foi fornecida.

Nome do participante: _____

Nome do responsável legal: _____

Assinatura ou impressão digital: _____

Testemunha no caso de participante não alfabetizado: _____

Data: _____

Nome do pesquisador: _____

Assinatura: _____

Data: _____