

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE FAMÍLIAS BRASILEIRAS COM
ANIRIDIA CONGÊNITA**

ZULEIDE SILVA FERNANDES LIMA

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutora em Ciências (Genética e Biologia Molecular)**.

Orientadora: Prof^a. Dra. Lavínia Schüler Faccini

Porto Alegre, janeiro de 2018.

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 do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), 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 pelo CNPq vinculada ao PPGBM (Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular).

A Ivan Fernandes Lima (in memoriam).

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Lavínia Faccini por todos os ensinamentos ao longo desta trajetória desde quando iniciei o mestrado, foram seis anos de muito aprendizado, conquistas e sorrisos. Sem o seu carinho nada disto seria possível!

A todos os colaboradores do Projeto Aniridia, especialmente a Isabella Monlleó, Vanessa Paixão-Côrtes, Flavia Biondi, Tábita Hünemeier e Virginia Ramallo por me ensinarem os primeiros passos nesta jornada.

Aos meus colaboradores, e amigos, diretos desta tese pela dedicação e primor com os quais contribuíram para a construção deste trabalho. Lucas Fraga, Thayne Kowalski, Juliano Boquett e Gabriela Wachholz, essa tese é nossa!

À Danaê Longo, Eneida Figueiredo e Bibiane Godoy pelo incentivo e apoio profissional e pessoal para que este meu antigo sonho pudesse se tornar realidade.

À todos os professores que contribuíram para minha formação desde os meus primeiros anos na escola, com carinho especial aos professores Francisco Tovar, Guilherme Porciúncula e Emerson Santana por sempre torcerem pelas minhas conquistas.

Ao Elmo Cardoso, que com sua indiscutível amabilidade sempre me recebeu e me ajudou em tudo que estive ao seu alcance, desde a dúvida mais simples a questões mais complexas. Você é uma pessoa ímpar!

Ao professor Nelson Fagundes por cada momento filosófico vivido nos cafés pós-almoço. Talvez não tenhas ideia do quanto isso contribui para o meu pensamento crítico e me fez crescer.

Aos meus amigos do Lab 113, Luiza Mariath, Júlia Do Amaral, Augusto Cardoso, Fernanda Vianna, Alejandra Rojas, Mariléia Furtado, Pedro Figueiredo, Stephanie Rosswag, Gustavo Medina, Priscilla Vianna, Clairton Marcolongo, Leonardo Faccini, Anderson Faccini, Gabriela Cardoso, Daniela Quisani e Bruna Rengel não tenho palavras para agradecer cada riso, cada choro, cada mão

estendida nos melhores e piores momentos, a caminhada foi muito mais leve por ter vocês ao meu lado.

Àquela que além de amiga de laboratório foi também minha parceira de apartamento, Perpétua Costa, obrigada por cada momento vivido juntas, você que tantas vezes respeitou o meu silêncio por entender que era importante para mim.

Às amigadas cultivadas em Porto Alegre, em especial à Ellen Sodré, Karine Kramer e Bianca Heineck, a torcida pelo sucesso de vocês é recíproca!

Aos meus amigos de Maceió, especialmente à Bruna Granja, Amanda Silva e Élide Marins, que mesmo longe me enviaram boas energias e mensagens de carinho para a conclusão desta jornada.

À minha segunda família, Emirce Monteiro, Ederson Matsumoto, Paulo Matsumoto Júnior, Marília Matsumoto, Lucas Matsumoto e minha amiga-irmã Emanuelle Matsumoto. Sei o quanto vocês sinceramente torcem pela minha felicidade!

Aos meus pais, Maria Da Silva e Antônio Cavalcanti, e irmãos, Pedro Fernandes Lima e Djalma Da Silva, por todo amor incondicional, por suportarem a saudade, por chorarem em cada despedida e por sorrirem em cada chegada, a distância nos ensinou o quanto esse alicerce é importante em nossas vidas, vocês são o meu mais precioso tesouro!

Ao meu amor, Mauro Santos, obrigada pelo abraço mais sincero no qual em meus piores momentos me dava a certeza de que tudo daria certo, por cada sorriso que me dizia “você vai conseguir e eu estou ao seu lado”, por cada conselho, por sempre me ouvir atenciosamente, por todas as palavras de carinho ditas através do olhar. Você é o mais lindo presente desta jornada!

Ao Deus que acredito existir, a fé que carrego comigo foi essencial para que eu me mantivesse firme e que a palavra “desistir” jamais fizesse parte da minha vida.

SUMÁRIO

| | |
|---|------------|
| Lista de Abreviaturas..... | 8 |
| Resumo..... | 11 |
| Abstract..... | 13 |
| 1. Capítulo I – Introdução..... | 15 |
| 1.1. Desenvolvimento do olho..... | 16 |
| 1.1.1. <i>Desenvolvimento geral.....</i> | 16 |
| 1.1.2. <i>Desenvolvimento da íris.....</i> | 20 |
| 1.1.3. <i>Desenvolvimento do cristalino.....</i> | 21 |
| 1.2. Aniridia Congênita..... | 24 |
| 1.2.1. <i>Aniridia no Brasil.....</i> | 26 |
| 1.2.2. <i>Variabilidade fenotípica.....</i> | 27 |
| 1.3. Gene mestre do desenvolvimento: PAX6..... | 30 |
| 1.3.1. <i>PAX6 e Aniridia.....</i> | 38 |
| 1.4. Genes Modificadores..... | 40 |
| 1.4.1. <i>Propriedades dos genes modificadores.....</i> | 41 |
| 1.4.2. <i>Desafios e estratégias para a identificação de potenciais genes modificadores.....</i> | 44 |
| 2. Capítulo II – Justificativa..... | 48 |
| 3. Capítulo III – Objetivos..... | 50 |
| 3.1. <i>Objetivo Geral.....</i> | 51 |
| 3.2. <i>Objetivos Específicos.....</i> | 51 |
| 4. Capítulo IV – Artigo I - A Mutation In The Transactivation Domain Of The Pax6 Gene In Congenital Aniridia..... | 52 |
| 5. Capítulo V – Artigo II - Genetic background underlying phenotypic variability of iris malformations: <i>in silico</i> pursuit of candidate genes..... | 67 |
| 6. Capítulo VI – Artigo III - Genetic Evaluation In TP53 And MDM2 As Modifier Genes For Congenital Aniridia..... | 101 |
| 7. Capítulo VII – Discussão..... | 106 |
| 8. Capítulo VIII – Perspectivas..... | 114 |

| | |
|--|------------|
| 9. Capítulo IX – Referências Bibliográficas..... | 116 |
| 10. Capítulo X – Recursos Online..... | 133 |
| 11. Capítulo XI – Anexos..... | 135 |
| 11.1. <i>Anexo I – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa.....</i> | <i>136</i> |
| 11.2. <i>Anexo II – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Adulto).....</i> | <i>139</i> |
| 11.3. <i>Anexo III – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Criança e Adolescente).....</i> | <i>142</i> |

LISTA DE ABREVIATURAS

aa - Aminoácido

ABCA4 - *ATP Binding Cassette Subfamily A Member 4*

AC - Aniridia Congênita

BMP - *Bone Morphogenetic Protein*

CC - Catarata Congênita

cDNA - DNA complementar (*Complementary DNA*)

CRYAA - *Crystallin Alpha A*

CRYBB3 - *Crystallin Beta B3*

CT - Região C-terminal

CYP1B1 - *Cytochrome P450 Family 1 Subfamily B Member 1*

DNA - *Ácido desoxirribonucléico (Deoxyribonucleic acid)*

dup - duplicação

del – deleção

FGFs - *Fibroblast Growth Factors*

FGF8 - *Fibroblast Growth Factor 8*

FISH - *Fluorescence in situ hybridization*

FOXC1 - *Forkhead Box C1*

FOXC2 - *Forkhead Box C2*

FOXE3 - *Forkhead Box E3*

GJA3 - *Gap Junction Protein Alpha 3*

GJA8 - *Gap Junction Protein Alpha 8*

HD – Domínio Homeo (*Homeo Domain*)

HESX1 - *HESX Homeobox 1*

LHX2 - *LIM Homeobox Protein 2*

LNK – Região *Linker*

ins - inserção

ITCH - *Itchy E3 Ubiquitin Protein Ligase*

LOVD - *Leiden Open Variation Database*

MDM2 - *MDM2 Proto-Oncogene*

MIP - *Major Intrinsic Protein Of Lens Fiber*

mRNA – Ácido ribonucléico mensageiro (*Messenger ribonucleic acid*)
MYC - *MYC Proto-Oncogene, BHLH Transcription Factor*
NANOG - *Nanog Homeobox*
NMD – *Nonsense Mediated Decay*
OCT4 - *Octamer-Binding Protein 4*
OMIM - *Online Mendelian Inheritance in Man*
ORF - *Open Reading Frame*
OTX2 - *Orthodenticle Homeobox 2*
PAX - *Paired Box Genes*
PAX1 - *Paired Box 1*
PAX2 - *Paired Box 2*
PAX3 - *Paired Box 3*
PAX4 - *Paired Box 4*
PAX5 - *Paired Box 5*
PAX6 - *Paired Box 6*
PAX6(5) - *PAX6 isoforma canônica*
PAX6(5a) - *PAX6 isoforma alternativa*
PAX7 - *Paired Box 7*
PAX8 - *Paired Box 8*
PAX9 - *Paired Box 9*
PD – *Domínio Paired (Paired Domain)*
PITX2 - *Paired Like Homeodomain 2*
PITX3 - *Paired Like Homeodomain 3*
PRKACA - *Protein Kinase CAMP-Activated Catalytic Subunit Alpha*
PRPH2 - *Peripherin 2*
PROX1 - *Prospero Homeobox 1*
PST - *Domínio de transativação rico em prolina, serina e treonina*
PTC – *Códon de Terminação Prematuro (Premature Termination Codon)*
RAX - *Retina And Anterior Neural Fold Homeobox*
RNA - *Ácido ribonucléico (Ribonucleic acid)*
ROM1 - *Retinal Outer Segment Membrane Protein 1*
RP - *Retinite Pigmentosa*

SNC - Sistema Nervoso Central

Sey - *Small eye*

SHH - *Sonic Hedgehog*

SIX3 - *SIX Homeobox 3*

SIX6 - *SIX Homeobox 6*

TP53 - *Tumor Protein P53*

VAX1 - *Ventral Anterior Homeobox 1*

WAGR - Tumor de Wilms (nefroblastoma), Aniridia, Alterações Geniturinárias e retardo mental (*Wilms Tumor, Aniridia, Genitourinary Anomalies, and Mental Retardation Syndrome*)

WNT - *Wnt Family Member*

WT1 - *Wilms Tumor 1*

WNT5B - *Wnt Family Member 5B*

RESUMO

O desenvolvimento dos olhos em humanos tem início na quarta semana de vida embrionária. Neste período uma grande série de sinalizadores estão envolvidos. Várias anomalias oculares decorrem de alterações nos genes envolvidos neste período, como a aniridia e a catarata. A aniridia congênita (AC) é uma anomalia rara caracterizada por diversos graus de hipoplasia de íris e afeta aproximadamente 1:40,000 a 1:100,000 nascidos vivos. Diversas anormalidades oculares estruturais e/ou funcionais podem estar associadas, entre estas, a catarata. Cerca de 90% das mutações que levam ao fenótipo da aniridia ocorrem no gene *PAX6*, o gene mestre do desenvolvimento dos olhos. Apesar de bem estabelecida a relação entre o *PAX6* e a aniridia, variações fenotípicas inter- e intra-familiar em indivíduos que compartilham a mesma mutação no *PAX6* é amplamente relatada na literatura. Este trabalho teve por objetivo investigar variações no gene *PAX6*, e potenciais genes modificadores envolvidos nas variações fenotípicas observadas nos indivíduos afetados por AC.

No primeiro artigo, relatamos um indivíduo com AC total associada a catarata e glaucoma, onde detectamos uma mutação ainda não descrita no domínio de transativação do gene *PAX6* (c.955_958dupGACA). Devido ao fato que esta mutação não afeta os domínios de ligação ao DNA da proteína *PAX6*, sugerimos que esta alteração apresenta um efeito dominante-negativo.

No segundo artigo, tentamos identificar genes modificadores candidatos utilizando uma abordagem *in silico* com buscas nos bancos curados de genes e fenótipos, revisão de literatura e ferramentas de bioinformática para avaliações de expressão e redes preditas de proteínas. Avaliamos genes relacionados a expressão da catarata, uma vez que esta anomalia é frequentemente associada a AC e identificamos 5 potenciais genes modificadores: *GJA3*, *GJA8*, *MIP*, *CRYAA* e *CRYBB3*. Estes genes estão envolvidos em processos de transporte de metabólitos entre as células como o *GJA3*, *GJA8* e o *MIP* e componentes estruturais como o *CRYAA* e o *CRYBB3*. Ambos grupos possuem grande importância na manutenção

da transparência do cristalino e mutações nestes genes também já foram relacionadas a outras anormalidades associadas a AC, como microcórnea, microftalmia e glaucoma. Sugerimos que variações nestes genes são candidatas a serem investigadas em sua influência na expressividade fenotípica dos indivíduos com AC por mutações no *PAX6*

No terceiro artigo, investigamos um polimorfismo no gene *TP53* (rs1042522), e outro em seu principal regulador, o *MDM2* (rs2279744) em indivíduos com AC, com e sem catarata associada. Já foi sugerido na literatura o potencial papel de genes da via da apoptose durante o desenvolvimento do cristalino. As frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo no *TP53* entre indivíduos afetados por AC sem catarata (n = 12; CC: 0; CG: 66.7%; GG: 33.3%; C: 33.3% e G: 66.6%) e indivíduos afetados por AC e catarata (n = 17; CC: 23.5%; CG: 41.2% e GG: 35.3%; C: 44.1% e G: 55.9%) não foram diferentes (p = 0,22 e p = 1). O mesmo foi observado em relação ao polimorfismo no *MDM2*, onde nenhuma diferença foi encontrada entre as frequências genótípicas e alélicas do grupo afetado por AC sem catarata (n = 12; TT: 16.7%; TG: 50% e GG: 33.3%; T: 41,7% e G: 58,3%) e do grupo afetado por AC e catarata (n = 17; TT: 41.2%; TG: 35.3% e GG: 23.5%; T: 55.9% e G: 44.1%; p = 0,453 e p = 0,350). Entretanto nossas conclusões são limitadas devido ao nosso pequeno número amostral.

Em conclusão, os dados apresentados neste trabalho confirmam a grande complexidade molecular da AC e a importância da investigação de fatores modificadores de fenótipo, a fim de auxiliar o manejo e em pesquisas futuras no desenvolvimento de drogas e terapias que possam reverter os prejuízos clínicos, ou inibir a progressão destes, nos indivíduos afetados.

ABSTRACT

Human eye development begins in the fourth week of the embryonic life. At this time a wide range of signals are involved. Several ocular anomalies result from changes in the genes involved in this period, such as aniridia and cataract. Congenital aniridia (CA) is a rare anomaly characterized by varying degrees of iris hypoplasia and affects approximately 1:40,000 to 1:100,000 live births. Several structural and/or functional ocular abnormalities may be associated, among them, the cataract. About 90% of the mutations that lead to the aniridia phenotype occur in the *PAX6* gene, the master gene for eye development. Although well-established the relationship between *PAX6* and aniridia, inter- and intra-familial phenotypic variations in individuals sharing the same mutation in *PAX6* is widely reported in the literature. In this work, we aimed to investigate variations in the *PAX6* gene, and potential modifying genes involved in the phenotypic variations observed in individuals affected by CA.

In the first article, we report an individual with total CA associated with cataract and glaucoma, where we detected a mutation not yet described in the *PAX6* gene transactivation domain (c.955_958dupGACA). Since this mutation does not affect the DNA binding domains of the *PAX6* protein, we suggest that this change has a dominant-negative effect.

In the second article, we attempted to identify candidate modifying genes using an *in silico* approach with researches in cured banks of genes and phenotypes, literature review and bioinformatics tools for expression evaluations and predicted protein networks. We evaluated genes related to cataract expression, since this anomaly is frequently associated with CA and we identified five potential modifier genes: *GJA3*, *GJA8*, *MIP*, *CRYAA*, and *CRYBB3*. These genes are involved in the transport of metabolites between cells such as *GJA3*, *GJA8* and *MIP* and structural components such as *CRYAA* and *CRYBB3*. Both groups have great importance in the maintenance of crystalline transparency and mutations in these genes have also been related to other abnormalities associated with CA, such as microcornea, microphthalmia and glaucoma. We suggest that variations in these genes are

candidates to be investigated for their influence on the phenotypic expressivity of CA individuals by mutations in *PAX6*.

In the third article, we investigated a polymorphism in the *TP53* gene (rs1042522), and another in its main regulator, *MDM2* (rs2279744) in individuals with CA, with and without associated cataract. The potential role of genes in the apoptosis pathway during lens development has been suggested in the literature. The genotype and allelic frequencies of the polymorphism within *TP53* between affected individual by CA without cataract (n = 12; CC: 0; CG: 66.7%; GG: 33.3%; C: 33.3% and G: 66.6%) and affected individuals by CA and cataract (n = 17; CC: 23.5%; CG: 41.2% and GG: 35.3%; C: 44.1% and G: 55.9%) were not different (p = 0,22 and p = 1). The same was observed regarding the polymorphism in *MDM2*, where no difference was found between the genotypic and allelic frequencies of the group affected by CA without cataract (n = 12; TT: 16.7%; TG: 50% and GG: 33.3%; T: 41,7% and G: 58,3%) and affected group by CA and cataract (n = 17; TT: 41.2%; TG: 35.3% and GG: 23.5%; T: 55.9% and G: 44.1%; p = 0,453 and p = 0,350). However, our conclusions are limited because of our small sample size.

In conclusion, the data presented in this thesis confirm the great molecular complexity of CA and the importance of investigating phenotype-modifying factors, in order to assist the management and in future research on the development of drugs and therapies that may reverse clinical losses, or inhibit the progression of these in the affected individuals.

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Desenvolvimento do olho

1.1.1 Desenvolvimento geral

Os olhos apresentam uma grande complexidade na sua maquinaria e deste modo seu desenvolvimento precisa ser bem orquestrado (Graw, 2010; Gehring, 2014; Cvekl & Callaerts, 2017), durante este período vários eventos ocorrem e uma série de sinalizadores estão envolvidos, tais como *PAX6* (*Paired Box 6*), os *FGFs* (*Fibroblast Growth Factors*), vias de sinalização *WNT* (*Wnt Family Member*) e sinalização mediada por *BMP* (*Bone Morphogenetic Protein*) (Graw, 2010; Li *et al.*, 2015; Blake & Ziman, 2014; Stenkamp, 2015). Além dos sinalizadores citados acima, outros fatores de transcrição, proteínas estruturais, de membrana e de citoesqueleto estão presentes na cascata molecular envolvida durante este período (Graw, 2010; Cvekl & Callaerts, 2017). O desenvolvimento dos olhos nos seres humanos inicia por volta da quarta semana de vida embrionária, onde quatro fontes darão origem a diversas estruturas dos olhos: o neuroectoderma do prosencéfalo, que dará origem à retina, camadas posteriores da íris e do nervo óptico; o ectoderma da superfície da cabeça, que formará o cristalino e o epitélio da córnea; o mesoderma entre as duas camadas anteriores, que irá originar as túnicas fibrosas e vasculares dos olhos; e as células da crista neural, que irão formar o coroide, a esclera e o endotélio da córnea (Tabela 1) (Moore & Persaud, 2008; Dudek, 2014).

Tabela 1. Estrutura dos olhos embrionárias e seus derivados no adulto (Adaptado de Dudek, 2014).

| Estrutura embrionária | Derivado adulto |
|---------------------------------------|--|
| Diencefalo | |
| Cálice óptico (neuroectoderma) | <i>Retina, epitélio da íris, músculo do esfíncter da pupila e dilatador da íris, epitélio do corpo ciliar</i> |
| Haste óptica (neuroectoderma) | <i>Nervo óptico, quiasma óptico, trato óptico</i> |
| Ectoderma da superfície | Cristalino, epitélio anterior da córnea, conjuntiva palpebral e bulbar |
| Mesoderma | Esclera, coroide, estroma da íris, estroma do corpo ciliar, músculo ciliar, substância própria da córnea, endotélio corneano, corpo vítreo, artéria central e veia da retina, músculos extraoculares |

As primeiras estruturas observadas são os sulcos ópticos que aparecem nas pregas neurais (Figura 1A e 1B), quando estas se unem para formar o prosencéfalo, os sulcos ópticos evaginam a partir da parede do diencefalo para formar as vesículas ópticas, contínuas ao prosencéfalo (Moore & Persaud, 2008; Dudek, 2014). As vesículas ópticas neste momento entram em contato com o ectoderma da superfície da cabeça, e induz este à formação do placóide do cristalino que irá se invaginar e se aprofundar no ectoderma da superfície para dar origem a fosseta do cristalino, este é o primeiro e um importante passo para o desenvolvimento do cristalino (Moore & Persaud, 2008; Graw, 2009; 2010). As bordas da fosseta então se fundem e deste modo levam a formação das vesículas do cristalino esféricas, perdendo em seguida sua conexão com o ectoderma (Moore & Persaud, 2008; Graw, 2010; Stenkamp, 2015).

Concomitantemente, as vesículas ópticas se invaginam para formar os cálices ópticos com parede dupla, esta etapa é crucial para a formação da íris e do corpo ciliar (Figura 1D, 1F e 1H) (Moore & Persaud, 2008; Graw, 2010; Stenkamp, 2015). O gene *PAX6* é predominantemente expresso no cálice óptico e no placóide do cristalino (Blake & Ziman, 2014; Dudek, 2014) e possui papel essencial para o desenvolvimento das estruturas e tecidos subsequentes. Outro fator de transcrição importante na transição da vesícula óptica para o cálice óptico é o *LHX2* (*Lim*

Homeobox Protein 2), este gene atua através da regulação de proteínas da via de sinalização *BMP*, como *BMP4* e *BMP7* (Yun *et al.*, 2009; Graw, 2010). Posteriormente as bordas dos cálices ópticos começam a circundar o cristalino em formação. A partir deste momento as vesículas do cristalino perdem suas conexões com o ectoderma da superfície e se direcionam para a cavidade do cálice óptico (Figura 1E) (Moore & Persaud, 2008). Além do *PAX6* e *LHX2*, outros genes reguladores são cruciais durante o desenvolvimento das vesículas ópticas, tais como: *RAX* (*Retina And Anterior Neural Fold Homeobox*), *OTX2* (*Orthodenticle Homeobox 2*), *SIX6* (*SIX Homeobox 6*), *SIX3* (*SIX Homeobox 3*) e *SHH* (*Sonic Hedgehog*) (Graw, 2010; Alves *et al.*, 2013).

Ao longo das vesículas ópticas, que crescem para o interior do mesênquima adjacente expandindo suas extremidades, as hastes ópticas são formadas a partir da constrição sofrida nas conexões entre as vesículas ópticas e o prosencéfalo (Figura 1C) (Moore & Persaud, 2008; Dudek, 2014). Outro membro da família *PAX*, o *PAX2* (*Paired Box 2*) é expresso principalmente nas hastes ópticas (Blake & Ziman, 2014; Dudek, 2014). Nestas estruturas podemos observar também a expressão de *SHH* (*Sonic Hedgehog*), *VAX1* (*Ventral Anterior Homeobox 1*) e *HESX1* (*HESX Homeobox 1*) (Graw, 2010; Alves *et al.*, 2013).

As fissuras retinianas são sulcos que se formam na superfície ventral dos cálices ópticos e ao longo das hastes ópticas (Figura 1G). No interior das fissuras retinianas encontra-se o mesênquima vascular que dará origem aos vasos sanguíneos hialoides, a artéria hialoide e a veia hialoide. A artéria hialoide supre a camada interna do cálice óptico, a vesícula do cristalino e o mesênquima do cálice óptico. A veia hialoide por sua vez recolhe o sangue dessas estruturas. No momento que as bordas das fissuras retinianas se fundem, os vasos hialoides passam a fazer parte do nervo óptico, as partes distais se degeneram e as partes proximais irão persistir como a artéria e veia centrais da retina (Moore & Persaud, 2008; Dudek, 2014).

Como mencionado nas etapas do desenvolvimento dos olhos descritas anteriormente, o gene *PAX6* possui papel essencial para a morfogênese de vários

tecidos e estruturas, como a íris e o cristalino, porém sua expressão também é mantida ao longo da vida na córnea, epitélio da lente e retina (Hever *et al.*, 2006; Blake & Ziman, 2014; Deml *et al.*, 2015). Este gene, portanto, além da sua grande importância para o desenvolvimento dos olhos também é necessário para a manutenção destas estruturas na vida adulta (Zhang *et al.*, 2001).

Alterações nos genes envolvidos na morfogênese ocular podem levar a diversas malformações, entre as anomalias que podem acometer o globo ocular de modo geral, destacamos a anoftalmia decorrente da ausência de formação das vesículas ópticas; a microftalmia, quando se observa um globo ocular pequeno, geralmente assimétrica com prejuízo para as estruturas do globo ocular; e a nanoftalmia, onde ocorre uma diminuição do globo ocular, porém sem alteração das estruturas deste (Alves *et al.*, 2013; Deml *et al.*, 2015).

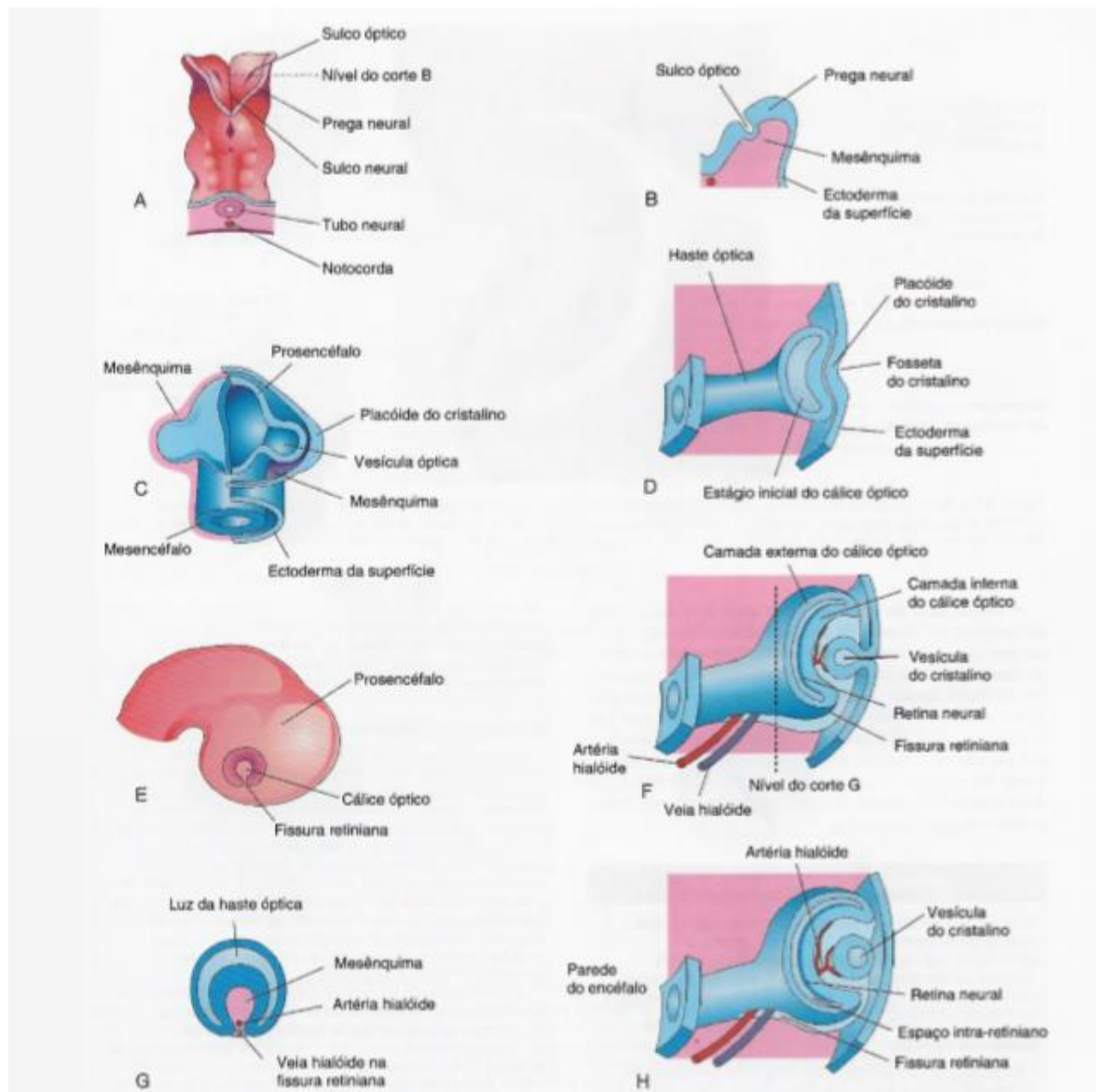


Figura 1. Desenhos ilustrando os estágios iniciais do desenvolvimento do olho. **A.** Vista dorsal da extremidade cefálica de um embrião de cerca de 22 dias, mostrando os sulcos ópticos, a primeira indicação do desenvolvimento dos olhos. **B.** Corte transversal de uma prega neural, mostrando o sulco óptico. **C.** Desenho esquemático do prosencéfalo de um embrião de cerca de 28 dias, mostrando suas camadas de revestimento de mesênquima e o ectoderma da superfície. **D, F e H.** Cortes esquemáticos do olho em desenvolvimento ilustrando estágios sucessivos do desenvolvimento do cálice óptico e da vesícula do cristalino. **E.** Vista lateral do encéfalo de um embrião de cerca de 32 dias, mostrando o aspecto externo do cálice óptico. **G.** Corte transversal da haste óptica, mostrando a fissura retiniana e seu conteúdo, onde as bordas da fissura retiniana estão se aproximando, completando o cálice óptico e englobando a artéria e veia centrais da retina na haste e no cálice óptico (Retirado de Moore & Persaud, 2008).

1.1.2. Desenvolvimento da íris

A íris se desenvolve a partir das bordas dos cálices ópticos que crescem recobrando de modo parcial o cristalino (Figura 2A, 2B, 2C e 2D). O epitélio da íris representa as duas camadas que compõe o cálice óptico e permanecem delgadas neste local, contínuas com o epitélio das duas camadas do corpo ciliar e com o epitélio pigmentar da retina. O estroma da íris tem origem a partir das células da crista neural que irão migrar para a íris, enquanto que o neuroectoderma do cálice óptico irá formar os músculos dilatores e o esfíncter da pupila. As vias de sinalização *WNT* e *BMP* possuem importante papel para o correto desenvolvimento da íris, já foi demonstrado em modelos animais que a perda de função destas vias inibe a formação correta da íris e do corpo ciliar (Zhao *et al.*, 2002; Cho & Cepko, 2006; Dias da Silva *et al.*, 2007; Graw, 2010).

A íris em sua maioria das vezes é azul ou cinza nos indivíduos recém-nascidos, adquirindo cor conforme a pigmentação que ocorre durante os 6 a 10 primeiros meses. Os cromatóforos, células que contém o pigmento, irão determinar

a cor da íris de acordo com sua concentração e distribuição no tecido conjuntivo frouxo vascular. No caso do pigmento melanina estar restrito ao epitélio na superfície posterior da íris, os olhos serão azuis, porém, quando a melanina está também presente no estroma, os olhos serão castanhos (Moore & Persaud, 2008; Dudek, 2014). Além das vias de sinalização mencionadas, outros genes, principalmente fatores de transcrição, estão envolvidos na morfogênese de tecidos oculares, entre eles destacamos o *PITX2* (*Paired Like Homeodomain 2*), *PITX3* (*Paired Like Homeodomain 3*), *FOXC1* (*Forkhead Box C1*), *FOXC2* (*Forkhead Box C2*), *CYP1B1* (*Cytochrome P450 Family 1 Subfamily B Member 1*) e *PAX6* (*Paired Box 6*) (Alves *et al.*, 2013). Mutações neste último podem levar as principais anomalias que acometem a íris, como a aniridia que corresponde a ausência da íris de forma total ou parcial; e o coloboma de íris que se caracteriza por uma hipoplasia de íris que se assemelha a uma “fechadura” (Alves *et al.*, 2013; Lim *et al.*, 2017).

1.1.3. Desenvolvimento do cristalino

A vesícula do cristalino dará origem ao cristalino (Figura 2A, 2B, 2C e 2D), a parede anterior da vesícula se tornará o epitélio subcapsular do cristalino e a parede posterior formará as fibras primárias do cristalino, na medida que essas últimas crescem, elas obliteram toda a cavidade da vesícula. A zona equatorial, como é conhecida a borda do cristalino, posteriormente dará origem as fibras secundárias do cristalino, posicionando-se aos lados externos das fibras primárias. As fibras secundárias continuam a ser formadas durante a vida adulta e o cristalino por sua vez aumenta de tamanho, enquanto que as fibras primárias precisam ser mantidas saudáveis por toda a vida (Moore & Persaud, 2008). As fibras do cristalino são preenchidas por proteínas do citoesqueleto chamadas de *filensinas* e α , β e γ -*cristalinas*, que são responsáveis por manter a conformação e a transparência das lentes (Graw, 2009; Dudek, 2014).

Durante o seu desenvolvimento, o cristalino é suprido pela artéria hialoide, porém no período fetal a parte distal da artéria degenera, e o local onde esta se

encontrava corresponde ao canal hialoide. Após este evento, o cristalino se torna uma estrutura avascular e a sua nutrição dependerá da difusão a partir do humor aquoso na câmara anterior do olho e do humor vítreo, as proteínas de transporte como as conexinas e as aquaporinas possuem papel essencial nesta função e também para a manutenção da transparência do cristalino (Graw, 2009; Shiels & Hejtmancik, 2011; Deng & Yuan, 2014; Schey *et al.*, 2014). A túnica vascular do cristalino é formada por um mesênquima vascular que envolve o cristalino durante o seu desenvolvimento, a membrana pupilar, por sua vez, corresponde a parte anterior desta cápsula. Ao longo do período fetal a túnica vascular do cristalino e a membrana pupilar se degeneram, porém, a cápsula do cristalino se mantém. O corpo vítreo se forma no interior do cálice óptico, ele é composto pelo humor vítreo primário que deriva das células mesenquimais originárias da crista neural e do humor vítreo secundário que envolve o anterior (Moore & Persaud, 2008).

Alguns estudos sugerem que o desenvolvimento da íris depende de uma correta formação do cristalino, estes estudos demonstraram que a ablação do cristalino interfere na morfogênese adequada da íris, corpo ciliar e córnea (Harrington *et al.*, 1991; Beebe & Coats, 2000; Graw, 2010). Para que a morfogênese do cristalino ocorra corretamente, será necessária a expressão harmonizada de genes como: *SIX3* (*SIX Homeobox 3*), *PAX6* (*Paired Box 6*), *FOXE3* (*Forkhead Box E3*), *PITX3* (*Paired Like Homeodomain 3*) e *PROX1* (*Prospero Homeobox 1*) (Alves *et al.*, 2013). Em relação as anomalias do cristalino, a catarata congênita, onde se observa uma opacidade do cristalino, pode ser decorrente de mutações em uma grande heterogeneidade de genes, além dos fatores de transcrição, como os citados anteriormente, esta anomalia também pode estar associada a alterações em proteínas das famílias das *cristalinas*, das *conexinas* e das *aquaporinas*. Outras anomalias importantes também são observadas no cristalino, como a microesferofacia que é uma diminuição do diâmetro e do formato arredondado do cristalino; a lenticone, que corresponde a alteração na curvatura da parte central da face anterior ou posterior do cristalino; a afacia congênita que é a não formação do cristalino e a luxação ou subluxação de

cristalino, que se trata de uma ectopia do cristalino (Shiels & Hejtmancik, 2011; Alves *et al.*, 2013).

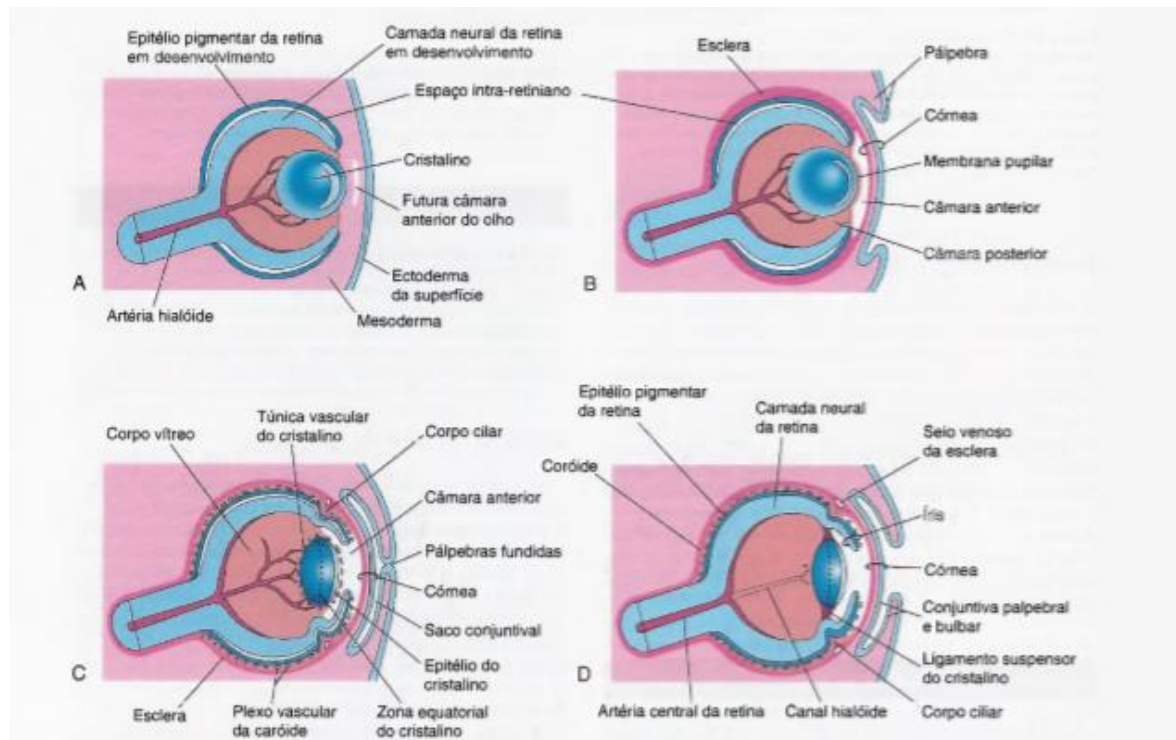


Figura 2. Desenhos esquemáticos de cortes sagitais do olho, mostrando estágios sucessivos do desenvolvimento do cristalino, da retina, da íris e da córnea. **A.** Com 5 semanas. **B.** Com 6 semanas. **C.** Com 20 semanas. **D.** Recém-nascido. Observe que as camadas do cálice óptico se fundem para formar o epitélio pigmentar da retina e a retina neural, e que estes se estendem anteriormente como o epitélio duplo do corpo ciliar e da íris. A retina e o nervo óptico são formados a partir do cálice óptico e da haste óptica (prolongamento do encéfalo). Ao nascimento, o olho tem cerca de três quartos do tamanho adulto. A maior parte do crescimento ocorre durante o primeiro ano. Após a puberdade, o crescimento do olho é desprezível (Retirado de Moore & Persaud, 2008).

1.2. Aniridia congênita

A aniridia congênita (AC) (OMIM #106210) é um distúrbio raro, caracterizado por hipoplasia de íris que pode ser clinicamente detectada ao nascimento. Geralmente é associada a várias anormalidades estruturais e/ou funcionais, tais como opacificação da córnea, formação de tecido fibrovascular ou granuloso na córnea (*Pannus*), catarata, subluxação de cristalino, glaucoma, erros de refração, hipoplasia da fóvea, hipoplasia do nervo óptico, hipoplasia macular, ausência de reflexo macular, nistagmo, estrabismo, fotofobia, ptose, entre outras. Entre os prejuízos visuais para os indivíduos afetados por AC, o maior deles é a perda de visão progressiva (Nelson *et al.*, 1984; Kokotas & Petersen, 2010; Hingorani *et al.*, 2012; Schanilec & Biernacki, 2014; Bobilev *et al.*, 2016; Lim *et al.*, 2017). Devido a frequente ocorrência de outras anormalidades oculares associadas, o termo “aniridia” vem sendo discutido e considerado inapropriado. O termo correto, portanto, seria Síndrome da Aniridia, que englobaria todas as formas de aniridia (Lim *et al.*, 2017).

Esta anomalia afeta aproximadamente 1:40,000 a 1:100,000 entre os nascidos vivos sem influência conhecida de cor ou raça (Shaw *et al.*, 1960; Chang *et al.*, 2015; Lim *et al.*, 2017). Em torno de 2/3 dos casos ocorrem por herança autossômica dominante com alta penetrância e expressividade variável, enquanto que o 1/3 restante são casos esporádicos por mutação *de novo* (Shaw *et al.*, 1960; Hingorani *et al.*, 2012; Schanilec & Biernack, 2014). Em 85% dos casos a AC ocorre como uma Síndrome da Aniridia (AC com ou sem achados sistêmicos), em 10 a 13%, como parte da Síndrome WAGR, e nos 2% a 15% restantes como parte de outras síndromes raras (Kokotas & Petersen, 2010; Vasilyeva *et al.*, 2017).

A WAGR (OMIM #194072 - Tumor de **W**ilms (nefroblastoma), **a**niridia, alterações **g**eniturinárias e “**r**etardo **m**ental”), foi descrita pela primeira vez por Miller e colaboradores (1964), as primeiras observações foram a aniridia, a hipermetrofia (crescimento anormal de um lado do corpo, ou partes dele) e o tumor de Wilms. Posteriormente foram também identificados o déficit cognitivo e genitália ambígua. Essa síndrome é devido a uma deleção de genes contíguos na região 11p, que

inclui os genes *PAX6* e *WT1* (*Wilms Tumor 1*) (11p13; chr11: 31,000,000-36,400,000; GRCh38hg38) (Riccardi *et al.*, 1978; Fischbach *et al.*, 2005; Bobilev *et al.*, 2016; Vasilyeva *et al.*, 2017).

A Síndrome de Gillespie (OMIM #206700) foi relatada por Mirkinson & Mirkinson (1975) em um estudo de caso de uma família com aniridia, catarata, glaucoma e ausência de rötula. Além disto os pacientes com esta síndrome podem apresentar, além da hipoplasia congênita da íris, hipoplasia cerebelar progressiva, ataxia e variável déficit cognitivo, normalmente leve. A Anomalia de Peters (OMIM #604229) por sua vez, é identificada como uma série de defeitos no sistema visual, tais como, leucoma central da córnea, ausência do estroma posterior da córnea, e um grau variável de defeitos de íris, que podem ou não estar associados a aniridia.

Cerca de 90% das mutações que causam AC ocorrem no gene *PAX6* (chr11:31784392-31817961; GRCh38hg38) (Hingorani *et al.*, 2012; Ensembl, 2017). Este gene, composto por 14 éxons (sendo 11 deles codificantes, parte do 4 ao 13), codifica um fator de transcrição importante no desenvolvimento dos olhos, estruturas olfatórias, sistema nervoso central e pâncreas. O *PAX6* é bastante conservado evolutivamente e mutações que ocorram em diversas regiões deste gene podem levar a graves consequências. A maioria dos casos apresenta mutações em heterozigose. Já foram descritos casos raros de heterozigotos compostos com fenótipos graves e/ou incompatíveis com a sobrevivência neonatal, onde o fenótipo decorrente de mutações presentes nos dois alelos leva o indivíduo ao óbito em poucos dias (Glaser *et al.*, 1994; Redeker *et al.*, 2008; Schmidt-Sidor *et al.*, 2009; Solomon *et al.*, 2010). Há descrito apenas um caso de um indivíduo heterozigoto composto sobrevivente. Um indivíduo do sexo masculino com 4 anos de idade, além de apresentar mutações distintas em cada alelo do *PAX6* (c.112C>T de herança paterna e c.718C>T de herança materna) também foi diagnosticado com trissomia do 21. A criança apresentava hipopituitarismo, *diabetes mellitus* e anormalidades cerebrais e oftalmológicas (Solomon *et al.*, 2010).

1.2.1. Aniridia no Brasil

Não há muitos relatos de casos de AC no Brasil. Llerena Jr. e colaboradores (2000) investigaram um indivíduo do sexo feminino, filha de casal não consanguíneo, diagnosticada com glaucoma e aniridia bilateral, sem evidências de déficit cognitivo, nem dismorfia adicional e exames de ultrassom sem anormalidades abdominais. A paciente apresentava uma aparente translocação balanceada *de novo* [t(11;13)(p13;q33)] com uma microdeleção envolvendo a região que envolve os genes relacionados a Síndrome WAGR, detectada por estudo de *FISH* (*Fluorescence in situ hybridization*). Outro caso, relatado por Andrade e colaboradores (2008), foi de um indivíduo do sexo masculino, filho de casal não consanguíneo, apresentando aniridia, déficit cognitivo e motor, história de ambiguidade genital e dismorfias menores, apresentando uma deleção *de novo* no braço curto do cromossomo 11 [46,XY,del(11p)] detectada por cariótipo e confirmando o diagnóstico de Síndrome de WAGR.

Em outro estudo foi relatada uma família com diagnóstico de AC bilateral em duas gerações, mãe, dois filhos e uma filha. No estudo molecular foi identificada uma alteração 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). Ainda neste estudo foram identificados dois casos de indivíduos não relacionados entre eles e com a família citada anteriormente, que apresentavam AC parcial bilateral e AC bilateral e catarata congênita respectivamente, sem mutações no *PAX6* que pudessem ser relacionadas aos fenótipos observados (França, 2009). Nosso grupo (Fernandes-Lima *et al.*, 2014) investigou uma família residente no Sertão de Alagoas com 163 indivíduos de 5 gerações, onde 53 indivíduos apresentavam fenótipos compatíveis com AC. Avaliação clínica foi realizada para 31 indivíduos afetados constatando uma ampla variação fenotípica. A análise molecular identificou mudança heterozigótica de G>A no primeiro nucleotídeo do íntron 5 (c.141+1G>A) já descrita anteriormente por Wang e colaboradores (2006) que sugerem que esta mutação leva a uma “perturbação” no *donor splice site* do éxon 5 que contém o *Paired Domain* (PD).

1.2.2. Variabilidade fenotípica

Apesar da bem estabelecida associação da AC com mutações no *PAX6*, ainda não é possível estabelecer claramente a relação genótipo-fenótipo. Algumas mutações foram encontradas associadas a ampla variabilidade de fenótipos inter-familiar bem como intra-familiar. No momento, a causa da heterogeneidade fenotípica intra-familiar não é conhecida (Kokotas & Petersen, 2010; Vasilyeva *et al.*, 2017). Chang e colaboradores (2015) relataram em duas gerações de uma família, probando (sexo masculino), pai e irmã mais velha, uma nova deleção em heterozigose no *donor splice site* do éxon 8 (c.357+1delG), identificada por método de Sanger. O probando apresentava AC total e glaucoma bilaterais. A irmã mais velha do probando apresentava fenótipo similar, com AC total, glaucoma e opacificação da córnea bilaterais, enquanto que o pai de ambos apresentava fenótipo mais leve com corectopia, opacificação da córnea, microcornea, catarata e diminuição da acuidade visual desde a adolescência.

No estudo de Dubey e colaboradores (2015) trinta probandos e parentes não afetados foram avaliados. Os achados clínicos revelaram heterogeneidade fenotípica entre indivíduos com a mesma mutação ou mutações diferentes. Nem a localização nem a natureza da mutação foram correlacionadas com a variabilidade fenotípica observada. Nos 19 pacientes com diferentes mutações no *PAX6* todos apresentaram nistagmo e 18 hipoplasia foveal. Foi ainda observada grande heterogeneidade fenotípica em catarata (13/19), glaucoma (9/19), ceratopatia (10/19), microcornea (2/19), ptose (2/19), subluxação de cristalino (2/19), e anomalia de nervo óptico (1/19). Em uma das famílias estudadas pelo grupo, foi identificada a mutação c.764A>G, onde o probando apresentou AC total, porém sua mãe e seu filho tinham AC parcial. Outra família com a mutação c.7_10dupAACA, o probando teve AC total, microcórnea bilateral e anomalias esqueléticas, as quais não foram detectadas em seu pai que apresentava AC parcial, catarata e glaucoma.

Podemos ainda exemplificar a ampla variabilidade fenotípica em famílias com AC citando o trabalho de Liu e colaboradores (2015), onde eles estudaram três gerações de uma família totalizando 9 indivíduos (cinco afetados e 4 não afetados).

Os afetados (probando do sexo feminino, mãe, irmã mais velha, filho e sobrinho) apresentaram a mutação c.796delG no éxon 10, que leva a um *premature termination codon* (PTC) no *Homeo Domain* (HD). Todos os afetados apresentaram AC e fotofobia. Dois indivíduos afetados não apresentaram catarata, observada nos outros três afetados, devido ao fato de ainda serem crianças (filho e sobrinho da probando), e não foi descartada a possibilidade de manifestação tardia da anomalia nestes indivíduos. Um indivíduo da família não apresentou nistagmo (filho da probando). Os membros não afetados não apresentavam nenhuma outra anormalidade ocular.

Em um estudo com 12 indivíduos pertencentes a cinco famílias e 16 indivíduos com AC esporádica, foram observadas sete mutações *nonsense* localizadas nos éxons 5 a 11 do gene *PAX6*, duas *frameshifts* (inserções), quatro alterações de *splicing* e duas *missense*. Anomalias cromossômicas envolvendo a região 11p13 foram detectadas em quatro dos 16 indivíduos sem história familiar. Quanto aos fenótipos observados, a ausência total de íris foi verificada em 50 olhos (89%), íris parcialmente ausente em quatro olhos (7%) e aparência próximo do normal em dois olhos (4%). Hipoplasia da fóvea foi observada em 54 olhos (96%), catarata em 50 olhos (89%), glaucoma em 12 olhos (21%), opacificação da córnea em dez olhos (18%), e hipoplasia de nervo óptico em dois olhos (4%). Um caso interessante neste estudo refere-se um indivíduo do sexo masculino que apresentou duas mutações: uma mutação *nonsense* no éxon 5 (c.79C>T) e um erro de *splicing* no íntron 6 (IVS6+1G>A). Estas mutações não foram encontradas nos pais ou irmãos deste indivíduo (Yokoi *et al.*, 2016). Como já mencionado anteriormente, mutações nos dois alelos são incompatíveis com a vida ou levam a fenótipos extremamente graves (Glaser *et al.*, 1994; Redeker *et al.*, 2008; Schmidt-Sidor *et al.*, 2009; Solomon *et al.*, 2009), portanto como este indivíduo apresenta apenas AC, acredita-se que este indivíduo carregue ambas as mutações no mesmo alelo (Yokoi *et al.*, 2016).

No estudo de Vasilyeva e colaboradores (2017) em uma *coorte* com 117 indivíduos, dos quais 110 indivíduos apresentavam AC e sete a Síndrome de WAGR, pertencentes a 91 famílias não relacionadas, a apresentação clínica, entre

os 110 indivíduos com AC variou de completa ausência bilateral da íris em 83 casos (75.5%) até AC parcial, coloboma atípico, sutil hipoplasia estromal ou ectopia uveal nos 27 casos restantes (24.5%). A maioria (98%) dos pacientes demonstraram anormalidades oculares adicionais. Defeitos não oculares foram observados em 45% dos 110 pacientes não WAGR incluindo no sistema nervoso central (SNC). Na maioria dos casos familiares deste estudo (13/18) a apresentação fenotípica variou significativamente entre os afetados.

Cao e colaboradores (2014) apresentaram um caso de par de gêmeos do sexo masculino e seu pai com a mesma mutação (c.888insA) no éxon 10 do *PAX6* e fenótipos distintos. Os gêmeos apresentaram AC e nistagmo, enquanto o pai foi afetado por AC, nistagmo e catarata. Outro caso interessante envolvendo gêmeos foi relatado por Brémond-Gignac e colaboradores (2005), onde gêmeas monozigóticas com a mesma deleção envolvendo a região do *PAX6* e *WT1* levando ao fenótipo de Síndrome WAGR, característico deste tipo de deleção, ambas com AC bilateral e catarata, porém uma delas com um fenótipo de catarata mais leve e em contrapartida com déficit cognitivo mais "grave" do que sua irmã.

Diversos são os relatos de variabilidade fenotípica inter- e intra-familiar relacionados a AC e mutações no *PAX6* (Chien *et al.*, 2009; Jin *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2012; Chograni *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2014; He *et al.*, 2015; Primignani *et al.*, 2016; Miao *et al.*, 2017; Pérez-Solórzano *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017). As razões para a variabilidade de fenótipos entre indivíduos com a mesma mutação são desconhecidas (Park *et al.*, 2012; Chang *et al.*, 2015). Devido a AC ser um distúrbio raro e possuir expressão variável, as correlações genótipo-fenótipo não são consistentes em pacientes com esta síndrome (Neethirajan *et al.*, 2009; Weisschuh *et al.*, 2012; Chang *et al.*, 2015). Em poucas famílias, a variabilidade fenotípica pode ser explicada pelo mosaïcismo nos pais mais levemente afetados. Alguns estudos relatam a taxa do mosaïcismo tão alta quanto 17.5% entre os aparentemente casos *de novo* para diferentes distúrbios. A aniridia não é exceção (Crolla & van Heyningen, 2002; Qin *et al.*, 2016; Vasilyeva *et al.*, 2017). Outra possível explicação está relacionada ao mecanismo pelo qual as variantes no *PAX6* levam a AC. Apesar do conceito da haploinsuficiência ser o mais amplamente

apoiado, os níveis de dosagem da PAX6 residual podem variar dependendo do tipo da mutação, e talvez contribuindo desta forma para a variação fenotípica observada (Hingorani *et al.*, 2012; Vasilyeva *et al.*, 2017).

1.3. Gene mestre do desenvolvimento: PAX6

O desenvolvimento dos olhos ao longo das espécies envolve uma conservada cascata molecular, onde podem ser observadas inúmeras interações entre genes do desenvolvimento que se organizam de maneira altamente primorosa durante o desenvolvimento embrionário para a composição estrutural e funcional dos olhos. Os olhos dos vertebrados são órgãos muito complexos e mutações nos genes “chave” podem levar a graves distúrbios congênitos. Entre os genes envolvidos, o PAX6 tem um papel especial, sendo este considerado o gene mestre do desenvolvimento dos olhos. Este gene pertence a uma família conhecida como Família PAX (*Paired Box Genes*) (Graw, 2010; Gehring, 2014; Li *et al.*, 2015; Cvekl & Callaerts, 2017).

Esta família de genes codifica fatores de transcrição com um domínio de ligação ao DNA altamente conservado denominado *Paired*, podendo ser considerados os principais reguladores da expressão gênica. Existem nove genes PAX conhecidos em mamíferos, e a conservação evolutiva do PD tem sido identificada através das filogenias desde os insetos, até os anfíbios e pássaros (Blake & Ziman, 2014; Paixão-Côrtes *et al.*, 2015; Cvekl & Callaerts, 2017) (Figura 3).

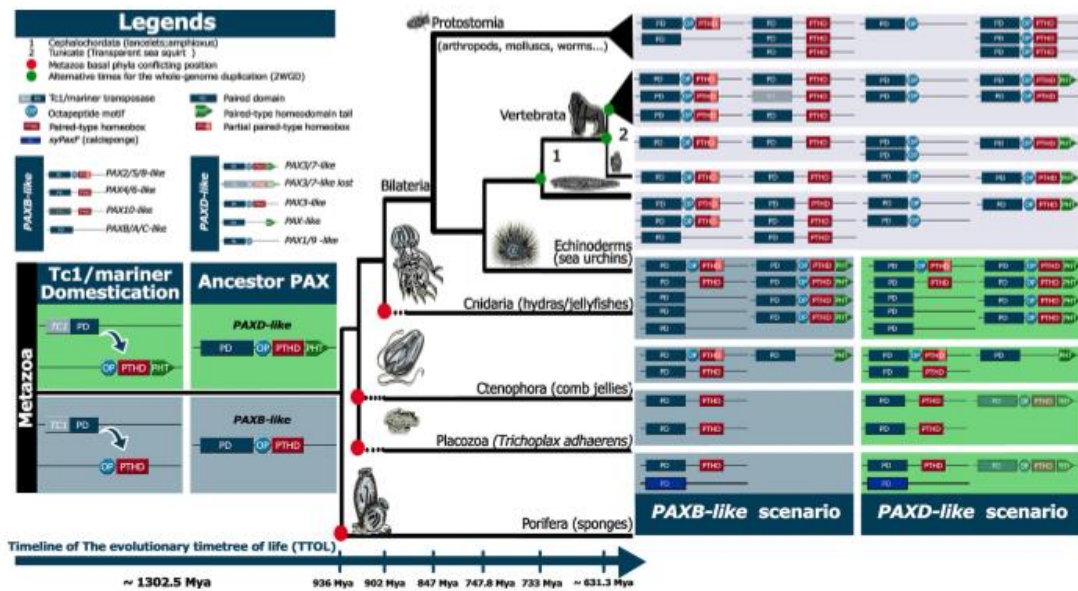


Figura 3. Conservação do domínio *Paired* em membros da família PAX ao longo das espécies (Retirado de Paixão-Côrtes *et al.*, 2015).

Nos vertebrados superiores, as proteínas PAX são subclassificadas em grupos de acordo com a inclusão de um domínio de ligação ao DNA, o domínio Homeo e/ou uma região de octapeptídeo, que serve como um motivo de ligação de proteínas co-fatoras para uma potente inibição da transcrição de genes *downstream* (Eberhard *et al.*, 2000; Blake & Ziman 2014), todas as proteínas PAX incluem um domínio de transativação na região C-terminal rico em prolina, serina e treonina (PST) (Figura 4) (Underhill, 2012; Blake & Ziman, 2014; Paixão-Côrtes *et al.*, 2015).

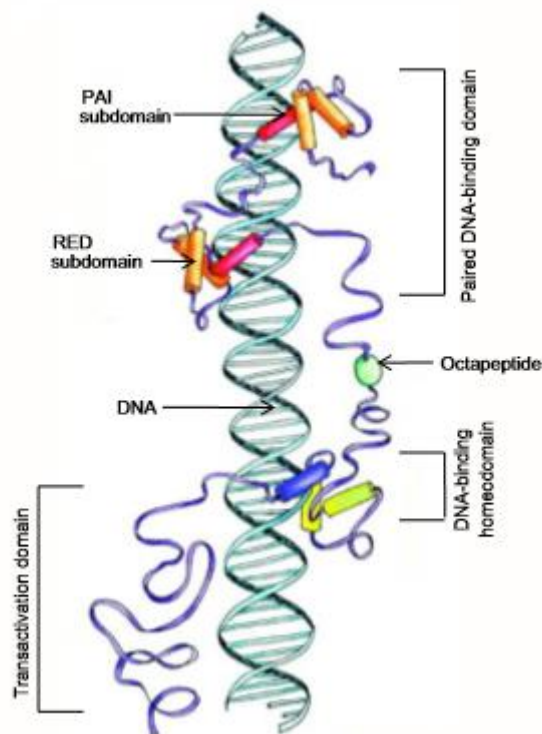


Figura 4. Subclassificação dos fatores de transcrição PAX de acordo com a estrutura da proteína. Todas as proteínas PAX contêm um domínio de transativação (PST) e um domínio de ligação ao DNA conhecido como *Paired Domain* (PD). O PD consiste em dois subdomínios, o PAI e o RED, cada um dos quais é composto por três hélices em um motivo *helix-turn-helix*. Alguns membros da família PAX também contêm um domínio adicional de ligação ao DNA chamado *Homeo Domain* (HD) e/ou uma região de octapeptídeo (Adaptado de Blake & Ziman, 2014)

Já é conhecido que todos os genes *PAX*, com exceção do *PAX4* e *PAX9*, produzem transcritos de RNA alternativos. A diversidade funcional das proteínas *PAX in vivo* é provavelmente devido a habilidade em produzir isoformas por meio de *splicing* alternativos que diferem em estrutura e conseqüentemente na atividade de ligação ao DNA de seus domínios *Paired* e *Homeo* (Underhill, 2012; Blake & Ziman, 2014). Os primeiros estudos descobriram que as famílias de genes reguladores estão relacionadas principalmente a compartimentalização e padronização do corpo durante o desenvolvimento dos organismos. Nos estudos

mais recentes, foi descoberto o papel da Família PAX no início da especificação do destino celular e subsequentemente da morfogênese de vários tecidos e órgãos (Robson & Eccles, 2006; Blake & Ziman, 2014).

Estudos em animais junto com análises genéticas em humanos, revelaram importantes papéis para os genes *PAX* no desenvolvimento de vários órgãos e tecidos (Tabela 2). Para entender como os fatores de transcrição *PAX* regulam padrões de expressão gênica e controlam o desenvolvimento celular é essencial determinar os mecanismos pelos quais as proteínas *PAX* operam, embora isto ainda permaneça como um grande desafio. O *PAX6* é um dos membros mais amplamente estudados da Família *PAX* (Blake & Ziman, 2014).

Tabela 2. Principais tecidos e órgãos que os membros da família *PAX* estão envolvidos no desenvolvimento (Blake & Ziman, 2014).

| Órgãos e tecidos | Membros da família <i>PAX</i> |
|---|---|
| Timo | <i>PAX1; PAX7</i> |
| Vertebra | <i>PAX1</i> |
| Orelha | <i>PAX2; PAX8</i> |
| Rim | <i>PAX2</i> |
| Sistema Nervoso Central | <i>PAX2; PAX5; PAX8; PAX6; PAX3; PAX7</i> |
| Vasculatura do coração; Sistema Nervoso Entérico, Melanócitos e Células de Schwann | <i>PAX3; PAX7</i> |
| Pâncreas | <i>PAX4; PAX6</i> |
| Linfócitos B | <i>PAX5</i> |
| Olhos | <i>PAX6</i> |
| Músculo Esquelético | <i>PAX3; PAX7</i> |
| Tireoide | <i>PAX8</i> |
| Dentes | <i>PAX7; PAX9</i> |

O *Pax6* foi inicialmente descoberto de forma independente através do *screening* de bibliotecas de expressão usando diversas sondas *Paired Box* em embriões de camundongos, e com posterior clonagem do cDNA completo e mapeamento detalhado dos domínios de expressão do *Pax6* por meio de hibridização *in situ* nos embriões de camundongos (Walther *et al.*, 1991; Whalter & Gruss, 1991). Posteriormente utilizando abordagem similar, o *Pax6* foi clonado a partir de *Zebrafish* (Krauss *et al.*, 1991). Embora a Família PAX tenha sido inicialmente identificada em *Drosophila* (*Pax meso*), a clonagem do gene *eyeless* foi descrita após a descoberta dos genes *Pax6* nos vertebrados (Quiring *et al.*, 1994). Halder e colaboradores (1995) demonstraram ainda que a superexpressão em regiões específicas de *eyeless* e *Pax6* de camundongos poderia induzir a formação de olho ectópico em várias partes do corpo das moscas das frutas (*Drosophila*), incluindo antena, pernas e asas.

Homólogos do *Pax6* foram subsequentemente identificados e caracterizados em vários invertebrados incluindo *C. elegans* (Chisholm & Horvitz, 1995; Zhang & Emmons, 1995), lula (Tomarev *et al.*, 1997; Hartmann *et al.*, 2003), planária (Callaerts *et al.*, 1999), poliquetos (Arendt *et al.*, 2002), e uma família *Paired Box* em água-viva (Miller *et al.*, 2000; Kozmik *et al.*, 2003; Suga *et al.*, 2010). Os *Pax6* homólogos foram ainda identificados nos vertebrados inferiores incluindo os tunicados (Glargon *et al.*, 1997) e cefalocordados (Glargon *et al.*, 1998).

O *PAX6* está localizado no braço curto do cromossomo 11 na região 11p3, é um gene composto por 14 éxons (sendo 11 deles codificantes, parte do 4 ao 13), que codifica um fator de transcrição considerado o mestre do desenvolvimento dos olhos. Este gene produz duas proteínas principais, codificadas pelos promotores P0 e P1. P0 produz uma isoforma canônica - *PAX6(5)* - com 422 aminoácidos e P1, por sua vez, codifica uma isoforma resultante de uma *splicing* alternativo - *PAX6(5a)* -, onde ocorre a inserção de 14 aminoácidos (aa) no PD, e devido a esta inserção as duas isoformas possuem sítios de ligação ao DNA distintos (Figura 5). O PD é composto por dois subdomínios o PAI e o RED, a inserção destes 14 aa ocorre no subdomínio PAI (Xu *et al.*, 1999; Cvekl & Callaerts, 2017). A isoforma *PAX6(5)* pode-se ligar ao DNA pelos dois subdomínios, a isoforma *PAX6(5a)* liga-

se ao DNA principalmente por meio do subdomínio RED. Uma das principais funções da proteína PAX6(5a) é durante o desenvolvimento, principalmente nos olhos, porém ambas as proteínas estão envolvidas no desenvolvimento normal dessas estruturas. A menor ou maior expressão de um transcrito ou outro leva a defeitos específicos nos olhos. A isoforma canônica tem sido também associada a proliferação e diferenciação neuronal, enquanto a isoforma 5a tem apresentado importante função apenas na proliferação neuronal (Mascarenhas *et al.*, 2009; Jami *et al.*, 2013) (Figura 5A e 5B).

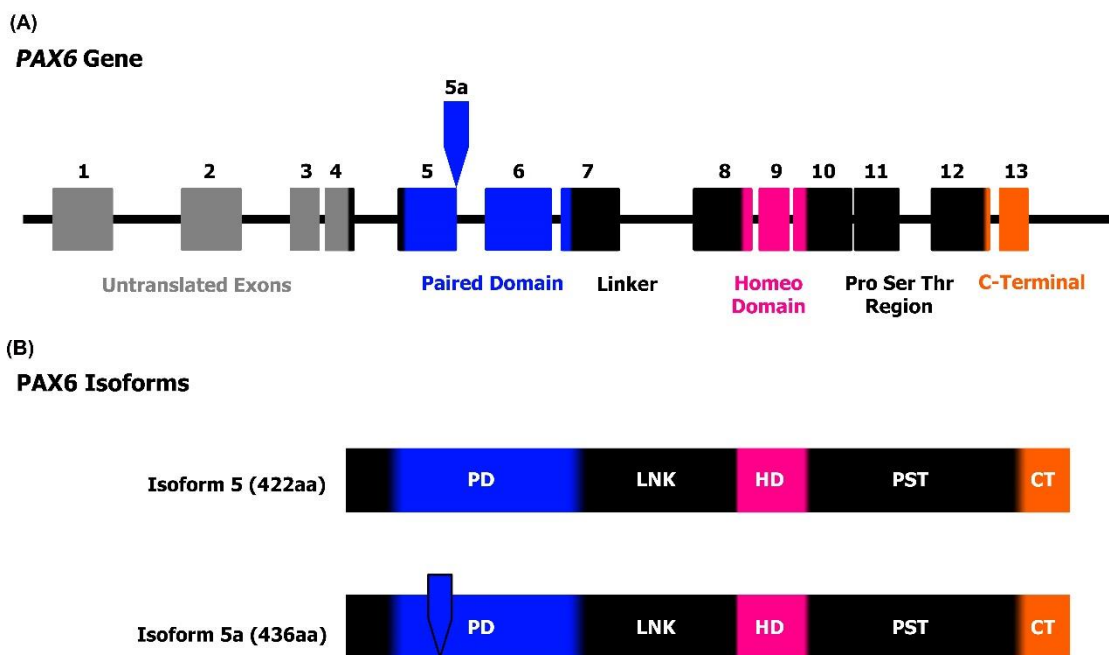


Figura 5. A. Esquema do gene *PAX6*. Os blocos representam os éxons. O *PAX6* possui 10 éxons constitutivos, 4-13, e um éxon com *splicing* alternativo, 5a. *Paired Domain* (PD - azul), domínio de ligação ao DNA; *Linker* (LNK), região de ligação entre o *Paired Domain* e *Homeo Domain*; *Homeo domain* (HD - rosa), domínio de ligação ao DNA; PST, domínio de transativação rico em prolina, serina e treonina; CT, região C-terminal (laranja). **B.** Esquema representando as duas isoformas principais do *PAX6*. *PAX6*(5): Isoforma canônica (422aa); *PAX6*(5a): Isoforma alternativa (436aa). PD (azul), domínio de ligação ao DNA; LNK, região de ligação entre o PD e HD; HD (rosa), domínio de ligação ao DNA; PST, domínio de

transativação rico em prolina, serina e treonina; CT, região C-terminal (laranja) (Desenho e concepção de Thayne Woycinck Kowalski e Zuleide Silva Fernandes Lima).

Além da sua grande importância durante o desenvolvimento dos olhos, o *PAX6* também apresenta papel essencial nos primeiros estágios do desenvolvimento do pâncreas, intestino, estruturas nasais, glândula pituitária e sistema nervoso central (SNC) (Simpson & Price, 2002; Blake & Ziman, 2014; Manuel *et al.*, 2015). O *PAX6* coordena a especificação do neuroectoderma durante o início do desenvolvimento do SNC, que ocorre na segunda semana após a concepção nos humanos. Existe evidência de que ele reprime genes de pluripotência, tais como *OCT4* (*Octamer-Binding Protein 4*), *NANOG* (*Nanog Homeobox*) e *MYC* (*MYC Proto-Oncogene, BHLH Transcription Factor*), para iniciar a diferenciação, no entanto isto não é suficiente. A isoforma *PAX6(5)* liga-se para induzir genes *downstream* *LHX2* (*LIM Homeobox Protein 2*), *SIX3* (*Six Homeobox 3*), *FGF8* (*Fibroblast Growth Factor 8*) e *WNT5B* (*Wnt Family Member 5B*), enquanto a isoforma *PAX6(5a)* potencializa o efeito indutivo da *PAX6(5)* através da co-repressão dos genes de pluripotência (Zhang *et al.*, 2010; Blake & Ziman, 2014). A proliferação neurogênica e a diferenciação no córtex cerebral também são controladas pelo *PAX6* que mantém o equilíbrio entre a auto renovação das células-tronco neurais (divisão celular simétrica) e a neurogênese (divisão celular assimétrica que produz um neurônio e um progenitor neurogênico) (Sansom *et al.*, 2009; Asami *et al.*, 2011; Blake & Ziman, 2014). O mecanismo pelo qual o *PAX6* exerce estas funções é através das distintas propriedades dos subdomínios do PD, o PAI e o RED. Através de estudos com camundongos, demonstrou-se que diferentes genes alvo *downstream* foram preferencialmente ligados em um ou outro subdomínio. O subdomínio PAI tem o papel de diminuir as mitoses celulares, enquanto o subdomínio RED tem o efeito oposto. Concluiu-se, portanto, que a co-ativação tanto de genes proliferativos quanto de genes anti-proliferativos agem de maneira fina para ajustar a progressão do ciclo celular (Walcher *et al.*, 2013; Blake & Ziman, 2014).

Uma mutação *missense* no *PAX6* (136C>G) foi identificada em uma paciente diagnosticada com autismo. Esta mutação leva a troca do aminoácido Leucina por uma Valina na posição 46, que é extremamente conservado desde as moscas até os humanos. Esta mutação não foi relatada anteriormente nem em pacientes com autismo ou não-autistas. A paciente não era filha de pais consanguíneos e herdou a mutação do pai. Quanto ao fenótipo ocular a paciente apresentava visão prejudicada, fotofobia e ptose palpebral, sem outras anormalidades tais como aniridia (Maekawa *et al.*, 2009).

Os modelos animais, como já mencionado, demonstraram sua grande importância ao longo das décadas ao evidenciar o *PAX6* como o gene mestre do desenvolvimento dos olhos (Cvekl & Callaerts, 2017), porém sua descoberta não limitou os modelos animais a esta função. Eles têm mostrado sua importância em estudos que avaliam características clínicas e possíveis tratamentos. Nakayama e colaboradores (2015) demonstraram que mutações em *Xenopus* levam a fenótipos similares observados nos humanos, além de AC, também foram observadas catarata e anomalias da córnea. Este mostrou-se um excelente modelo para o melhor entendimento das deficiências iniciais durante o desenvolvimento devido as mutações no *Pax6*. Takamiya e colaboradores (2015) por sua vez apresentaram *Zebrafish* mutantes para o *Pax6* como um ótimo modelo para estudos. Os animais mutantes apresentaram defeitos tais como hipoplasia de íris e anomalias da córnea e do cristalino.

Os camundongos por sua grande similaridade com os humanos são os mais vastamente utilizados, os estudos com esses modelos animais foram os pioneiros na descoberta do *Pax6* (Walther *et al.*, 1991; Whalter & Gruss 1991). A maioria dos trabalhos em genética relacionados a AC decorrem de estudos com esses modelos, frequentemente realizado em um camundongo mutante, *Small eye* (*Sey*) (Ramaesh *et al.*, 2003; 2006; Ihnatko *et al.*, 2016). A AC em humanos e os camundongos *Sey* são similares com relação ao genótipo e fenótipo. Estes camundongos compartilham muitas características oculares da AC humana e têm sido amplamente aceitos como modelos animais para tais estudos (Ihnatko *et al.*, 2016). Além disto têm sido utilizados para o teste de drogas a fim de desenvolver

tratamentos para indivíduos afetados com AC. Considerando que a maioria das mutações que levam a AC são "nonsense" e de que a haploinsuficiência seria o principal mecanismo pelo qual essas mutações levariam ao fenótipo em questão, a manipulação da dosagem da Pax6 poderia limitar o progresso e danos ao desenvolvimento dos olhos (Gregory-Evans *et al.*, 2014). Foi, portanto, avaliada a eficácia de um composto conhecido como Ataluren. Foram testadas aplicações tópicas e sistêmicas em camundongos pós-natal *Pax6^{Sey+/-}* (Gly194X). Eles observaram que as aplicações tópicas foram mais eficazes e que além de suspender a progressão da condição, também foi capaz de reverter deficiências na retina, no cristalino e na córnea, demonstrando que o desenvolvimento dos tecidos controlados pela expressão de Pax6 ainda é sensível à manipulação após o nascimento (Gregory-Evans *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2017).

1.3.1. PAX6 e Aniridia

O PAX6 foi identificado como gene candidato para o fenótipo conhecido como AC, por meio de clonagem em 1991 por Ton e colaboradores. Uma das hipóteses é que a haploinsuficiência seja o mecanismo pelo qual o fenótipo de AC esteja associado as mutações no PAX6, devido a diminuição de dosagem deste gene (Prosser & Van Heyningen, 1998). Outra possível causa seria um mecanismo dominante-negativo, onde proteínas mutantes e normais competiriam pelo sítio de ativação no DNA, havendo preferência de ligação das proteínas mutantes, assim estas se ligariam ao sítio, mas não ativariam a transcrição dos genes alvos e impediriam fisicamente a ligação das proteínas normais e a ativação correta dos genes (Singh *et al.*, 1998). Proteínas PAX6 que mantêm os domínios de ligação PD e HD apresentam a região C-terminal com alterações, e tem sido associadas a fenótipo de AC total, enquanto que proteínas com mutações no HD, com ou sem alterações no PD, foram relacionadas com hipoplasia parcial da íris (Vincent *et al.*, 2003; Atchaneeyasakul *et al.*, 2006).

A maioria das mutações intragênicas do *PAX6* resultam na introdução de um PTC, ou em extensões C-terminais ou em substituições de aminoácidos (Hingorani *et al.*, 2009; 2012). O PTC introduzido na ORF (*open reading frame*) é devido a diferentes mecanismos, incluindo mutações *nonsense*, *splicing* e *frameshift*, que juntas totalizam 72 a 77% de todas as mutações associadas a anomalia (Tzoulaki *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2015). A AC está predominantemente associada a mutações *nonsense*, acima de 3/4 dos casos são devido a mutações com introdução de um PTC, enquanto que mais de 2/3 das mutações *missense* estão associadas principalmente a uma variedade de fenótipos “não-aniridia” tais como defeitos de nervo óptico, queratite, microfthalmia ou hipoplasia da fóvea (Azuma *et al.*, 2003; Tzoulaki *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2008; Hingorani *et al.*, 2009; 2012; Chang *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2015; Vasilyeva *et al.*, 2017; LOVD, 2017). Estas mutações *missense* podem alterar o grau e a especificidade de ligação ao DNA e a regulação da transcrição pela proteína *PAX6* em uma extensão variável, o que leva a heterogeneidade fenotípica (Azuma *et al.*, 2003; Tzoulaki *et al.*, 2005; Dubey *et al.*, 2015). Já as mutações de *splicing* também parecem resultar em uma ampla variabilidade de fenótipos (Vincent *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2008; Lee & Colby, 2013; Chang *et al.*, 2015; Vasilyeva *et al.*, 2017).

As mutações identificadas que levam a fenótipos dentro do espectro da aniridia estão distribuídas por todo o gene *PAX6*. Aproximadamente 50% destas ocorrem no PD (Neethirajan *et al.*, 2003; 2004; Nallathambi *et al.*, 2006; Dubey *et al.*, 2015). O HD do *PAX6* tem o menor número de variantes descritas em relação as outras regiões (Deml *et al.*, 2015; LOVD, 2017). Um número menor de mutações é identificado no domínio PST (152 aa) apesar do seu comprimento comparado ao relativamente menor PD (128 aa) (LOVD, 2017). O PD é sugerido como um *hotspot* mutacional (Dubey *et al.*, 2015). De acordo com o banco de dados curado LOVD (2017), das 472 variantes únicas descritas, 193 (40.9%) estão localizadas no PD, no PST são verificadas 87 (18.4%) variantes, 43 (9.1%) variantes são observadas no HD, e por fim 41 (8.7%) ocorrem na região LNK. As 108 (22.9%) variantes restantes estão localizadas em outras regiões do gene ou correspondem a grandes deleções.

Cerca de 10 a 20% dos casos de AC não estão associados a mutações no gene *PAX6* (Lim *et al.*, 2012; Ansari *et al.*, 2016). Apesar de uma noção prévia de que casos de AC sem nenhuma mutação detectável no *PAX6* apresentariam fenótipos mais leves, já foram realizados estudos que apresentaram resultados discordantes, onde houve grande variação de fenótipos, desde os mais leves até os mais graves, em paciente com e sem mutações neste gene (Deml *et al.*, 2015; Dubey *et al.*, 2015; Ansari *et al.*, 2016; Yokoi *et al.*, 2016). Também foram identificadas variações de fenótipos dentro de uma mesma família segregando uma única mutação (Fernandes-Lima *et al.*, 2014). Provavelmente a não identificação de mutações no *PAX6* em alguns casos de aniridia deve-se ao fato que algumas regiões deste gene não são rotineiramente sequenciadas, como as regiões 5' e 3' não traduzidas e os íntrons, que podem conter elementos *cis*- e *trans*-reguladores que podem modular a expressão do gene (Lim *et al.*, 2012).

1.4. Genes modificadores

Na literatura, como já mencionado nas seções anteriores, é de conhecimento geral a grande variabilidade fenotípica observada entre os casos relatados de AC, mesmo entre aqueles pertencentes a uma mesma família que carregam a mesma mutação ao longo das gerações (Chien *et al.*, 2009; Jin *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2012; Chograni *et al.*, 2014; Dubey *et al.*, 2015; Primignani *et al.*, 2016). Este fenômeno também é observado em outros distúrbios, os mais impressionantes exemplos são vindos de estudos com gêmeos não idênticos em que pacientes que crescem compartilhando o mesmo ambiente e portam a mesma mutação causal, porém mostram fenótipos distintos, provavelmente por conta de determinantes genéticos que agem como modificadores (Walia *et al.* 2008; Kousi & Katsanis, 2015). Diante disto, torna-se difícil a correlação genótipo-fenótipo acurada o que nos leva a questionar quais outros fatores poderiam estar envolvidos e contribuindo para a variabilidade observada na AC. Neste momento entram em cena os “genes modificadores”, estes genes têm essa denominação por possuírem a capacidade

de interferir e influenciar na expressividade fenotípica de outros genes em um ou mais *loci* (Futuyma, 1998).

Embora seja notável o progresso na identificação das mutações causais de diversos distúrbios genéticos, como ocorre na relação AC e *PAX6*, o entendimento do efeito do *background* genético de cada indivíduo na expressividade fenotípica não tem acompanhado este ritmo, possivelmente devido aos desafios das metodologias utilizadas para identificar estes genes modificadores. No entanto, o conhecimento dos genes e mutações que causam determinadas condições tem um modesto impacto na habilidade de predição do prognóstico com relação aos aspectos da expressividade do distúrbio, tais como a idade de início, a taxa de progressão, a gravidade e a manifestação de outras morbidades (Kousi & Katsanis, 2015). As evidências clínicas e genéticas sugerem, que mesmo para os distúrbios classicamente monogênicos, a visão que a expressividade do fenótipo é exclusivamente propriedade de uma mutação dominante ou recessiva em um *locus* único pode ser uma simplificação excessiva do fenômeno biológico (Dipple & McCabe, 2000; Badano & Katsanis, 2002; Schäffer, 2013; Kousi & Katsanis, 2015). O conceito de genes modificadores não é novo (Haldane, 1941), porém poucos são os esforços para compreender a arquitetura genética, causalidade e expressividade variável de alguns distúrbios, como exemplo, na Doença de Hirschsprung, na Distrofia Muscular de Duchenne e na Fibrose Cística (Wallace & Anderson, 2011; Kousi & Katsanis, 2015; Vo & McNally, 2015; Trouvé *et al.*, 2017).

1.4.1. Propriedades dos genes modificadores

Além de esclarecer e explicar, ainda que em parte, a complexa variabilidade de determinadas condições, os genes modificadores podem ainda ser utilizados como marcadores e auxiliar a classificação de determinados distúrbios. Os fenômenos descritos pelos termos epistasia, herança oligogênica, ou ainda interação/modificação genética, são todos sinônimos de um mesmo processo, ou seja, o efeito de um gene/alelo no resultado fenotípico de um segundo gene/*locus*.

Uma maneira de definir este fenômeno genético consiste em estabelecer se o *locus* primário é necessário e suficiente para causar a doença (Kousi & Katsanis, 2015). Em caso positivo, então a presença do alelo em um segundo *locus*/gene pode exercer o papel de modificador na expressividade fenotípica, que pode ser definido por taxas de progressão da doença, a gravidade do fenótipo ou na manifestação de endofenótipos que necessitam de interações genéticas; se não, então o requerimento de um alelo em um segundo gene para manifestar o distúrbio define um caso de herança digênica ou oligogênica (Hamilton & Benjamin, 2012; Kousi & Katsanis, 2015).

Um gene modificador pode exercer seu efeito no fenótipo estabelecido pela mutação no *locus* primário de diversas maneiras. Dependendo da natureza do modificador esta interação pode resultar em penetrância reduzida de um específico endofenótipo(s) e ou distúrbio; em variável expressividade resultando ou em um exacerbado fenótipo (início mais cedo e progressão mais rápida da doença); ou em uma apresentação clínica mais leve (idade de início mais tardia, progressão atenuada da doença e ausência/proteção de específicos endofenótipos). Há ainda os modificadores que potencializam a manifestação de específicos endofenótipos resultando no que poderá ser descrito como novas formas do distúrbio (Hamilton & Benjamin, 2012; Kousi & Katsanis, 2015).

Algumas propriedades devem ser levadas em consideração para a avaliação de potenciais modificadores, como veremos nos tópicos a seguir:

- Heterogeneidade alélica: A natureza da mutação pode levar a fenótipos distintos, como os exemplos citados relacionados a aniridia, onde mutações *nonsense* podem levar a fenótipos mais graves, enquanto que mutações *missense*, podem determinar fenótipos mais leves (Azuma *et al.*, 2003; Tzoulaki *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2008; Lee & Colby, 2013; Hingorani *et al.*, 2009; 2012; Chang *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2015; Vasileya *et al.*, 2017).
- Múltiplas interações e interações gene/alelo específicas: O efeito dos genes modificadores na penetrância e/ou expressividade fenotípica

pode variar a partir da modificação de um modelo monogênico, em que um modificador pode ser considerado para a maioria da variabilidade observada, ou um modelo mais complexo onde mais do que um determinante genético interage com o *locus* primário do distúrbio (Kousi & Katsanis, 2015). Estudos abordando AC e potenciais modificadores, para o nosso conhecimento, não foram ainda relatados, apesar de ser reconhecida a sua importância (Primignani *et al.*, 2016).

- Modificadores localizados no mesmo *locus*/região do gene causal da condição: Genes modificadores em posição *cis* com o gene causal do distúrbio podem ser considerados como variantes alvos e serem transmitidos em desequilíbrio de ligação com a mutação causal. Os fatores de transcrição, e outros genes relacionados a regulação, podem ser utilizados como exemplo (Hamilton & Benjamin, 2012; Kousi & Katsanis, 2015).
- Frequência das variantes modificadoras na população geral: Assumindo que um alelo modificador sozinho não é suficiente para levar ao distúrbio, este pode ser relativamente comum na população geral, dificultando a distinção entre as variantes importantes para a determinação do fenótipo *versus* as variantes benignas. No segundo patamar, existem alelos de frequência intermediária na população geral. E por fim as variantes raras que são enriquecidas em indivíduos afetados quando comparados aos indivíduos controles. Embora seja mais fácil estabelecer a importância de variantes raras para a causalidade do distúrbio ou a sua predisposição, o mesmo não é verdadeiro para as variantes comuns que são super-representadas na população controle. No contexto de genes modificadores, a questão não é o quão comum ou rara a variante é, mas como elas trabalham juntas e qual é o seu efeito cumulativo na expressividade e penetrância do distúrbio (Gibson, 2012; Kousi & Katsanis, 2015).

1.4.2. Desafios e estratégias para a identificação de potenciais genes modificadores

Além das limitações metodológicas, existem desafios adicionais a serem considerados para a identificação de potenciais modificadores. A disponibilidade da avaliação clínica acurada com caracterização detalhada do fenótipo é um desses desafios. Muitos estudos apresentam casos caracterizados apenas de forma qualitativa para a presença/ausência da característica. Por sua vez os efeitos dos fatores não genéticos representam o maior aspecto confundidor (Kousi & Katsanis, 2015).

Em relação as estratégias para identificação de genes modificadores, diversas técnicas e abordagens podem ser utilizadas (Figura 6), preferencialmente combinando várias linhas de investigação a fim de oferecer mais acurácia aos achados finais, como já utilizado em alguns estudos prévios (Wallace & Anderson, 2011; Vo & McNally, 2015; Trouvé *et al.*, 2017). Algumas das estratégias utilizadas são: análise de ligação, estudos de associação de *locus* candidato, abordagem de gene candidato, candidatos baseados em sistemas, análise de transcriptoma, análise de dados de exoma completo e modificadores em linhagens de camundongos induzidos por mutação (Hamilton & Benjamin, 2012; Kousi & Katsanis, 2015; Vo & McNally, 2015).

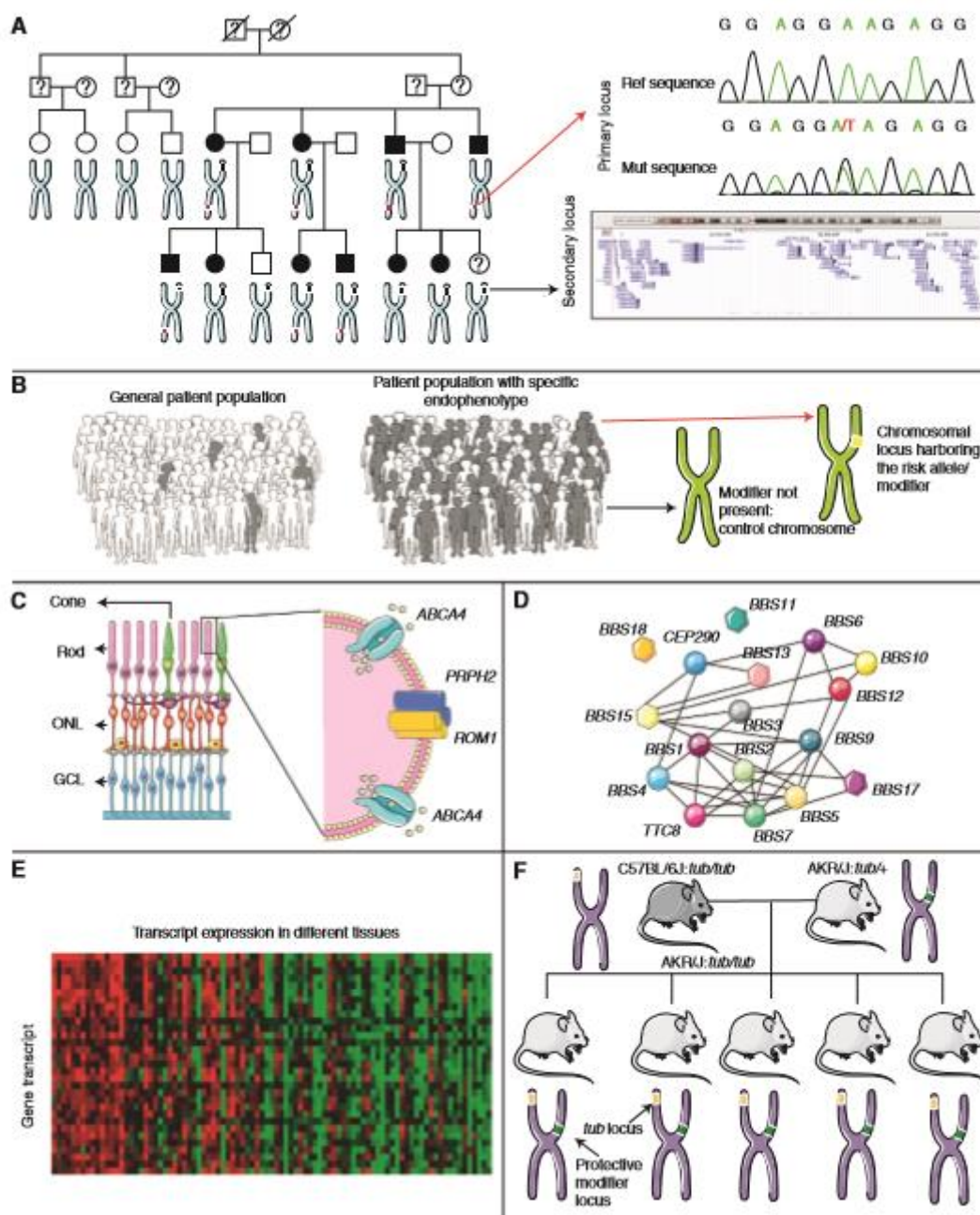


Figura 6. Exemplos de estratégias para a identificação de genes modificadores. **A.** Análise de ligação, como membros afetados de uma família manifestando endofenótipos específicos ou gravidade variável do distúrbio. Através da avaliação do conjunto da amostra para o endofenótipo ou característica de interesse, o *loci* modificador candidato pode ser mapeado. O *snapshot* do cromossomo 9 no painel A é original do UCSC browser (<http://genome.ucsc.edu/>). **B.** Estudos de associação comparando *coortes* de pacientes com (cinza) ou sem (branco) um modificador da

gravidade/expressividade do distúrbio, para obter um sinal para o locus/posição que abriga o(s) alelo(s) modificador(es). **C.** A abordagem de gene candidato avalia se os genes aos quais os produtos operam dentro de uma mesma via podem exercer um efeito modificador um ao outro. O exemplo ilustrado é proveniente da observação onde mutações em *PRPH2* (*Peripherin 2*) e *ABCA4* (*ATP Binding Cassette Subfamily A Member 4*) podem agravar o fenótipo de degeneração da retina quando combinados com a mutação causal do distúrbio em *ROM1* (*Retinal Outer Segment Membrane Protein 1*). **D.** A hipótese baseada em sistema é avaliada a probabilidade de genes específicos interagirem fisicamente ou manifestar similar perfil de expressão modificadas em controles *versus* indivíduos afetados para construir uma rede genética que resulta na patogênese do distúrbio. Tais como as redes de interação entre genes que causam o mesmo ou similares distúrbios. **E.** Na análise de transcriptoma, os gráficos de *heatmaps* comparam modificações na expressão ao nível dos genes entre indivíduos afetados e saudáveis. **F.** Utilização de linhagens de camundongos induzidos por mutação para mapear modificadores em um *background* genético mais simplificado (Retirado de Kousi & Katsanis, 2015).

O conhecimento da mutação causal nem sempre está acoplado a um prognóstico acurado. Apesar dos numerosos relatos apoiando a presença e importância dos genes modificadores, este campo não tem progredido tão rapidamente comparado a identificação das mutações causais dos distúrbios. Uma das razões para esta diferença é a nossa limitação em reconhecer interações entre alelos e variantes (Eichler *et al.* 2010; Kousi & Katsanis, 2015; Primignani *et al.*, 2016). Apesar dos avanços nas tecnologias de sequenciamento, o número de estudos para a identificação de genes modificadores permanece pequeno até o momento devido a muitas razões tais como os limitados tamanhos da população afetada, a heterogeneidade genética, a baixa frequência no qual uma particular combinação de alelos está presente na população, e descrições clínicas incompletas (Flint & Mackay, 2009; Kousi & Katsanis, 2015) Os modelos animais por sua vez têm fornecido uma poderosa ferramenta para a identificação de genes modificadores (Hamilton & Benjamin, 2012; Kousi & Katsanis, 2015).

A identificação dos genes modificadores poderá levar a uma compreensão mais aprofundada das vias biológicas afetadas e processos celulares. Entender a base do distúrbio de uma forma mais acurada nos possibilita o desenvolvimento de novas drogas e terapias mais eficientes, melhorar o prognóstico e diagnóstico genético para as famílias e até mesmo prevenir a manifestação do distúrbio ou características específicas, através de um manejo clínico personalizado de acordo com as peculiaridades de cada indivíduo (Kousi & Katsanis, 2015; Vo & McNally, 2015).

Diante dos casos vastamente variáveis de AC, e considerando ser um distúrbio que não possui cura até o presente momento, o manejo adequado dos indivíduos afetados a fim de possibilitar uma melhor qualidade de vida ao amenizar as diversas manifestações associadas, ou parte delas, a investigação de potenciais modificadores pode nos auxiliar nesta conduta. Genes envolvidos no desenvolvimento e manutenção dos olhos, assim como aqueles envolvidos em vias de sinalização, apoptose e modificações pós-traducionais (Graw, 2010) são fortes candidatos para um ponto de partida para estes estudos.

CAPÍTULO II – JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

A aniridia congênita (AC) é uma anomalia rara que pode estar associada a diversas anormalidades oculares estruturais e/ou funcionais. A perda de visão progressiva é um dos maiores prejuízos. Embora não exista cura para esta anomalia, é possível o tratamento de algumas das anormalidades associadas, tais como a catarata e o glaucoma, a fim de amenizar os efeitos e proporcionar bem-estar físico e psicológico, melhorando a qualidade de vida dos indivíduos afetados. A AC é herdada como herança autossômica dominante em 2/3 dos casos, o 1/3 restante corresponde a casos que ocorrem por mutação “*de novo*”. Nos casos familiares é observada alta penetrância porém expressividade variável. Apesar de ser possível o diagnóstico clínico após exame oftalmológico, o diagnóstico molecular nos permite definir se o caso se trata de AC isolada ou se é uma manifestação dentro do espectro de síndromes as quais ela pode estar associada. Um exemplo, é a WAGR, que neste caso é necessário um acompanhamento adequado do indivíduo para a verificação da presença do Tumor de Wilms. Uma vez determinado o diagnóstico de AC isolada, um novo desafio é lançado: o que há por trás da biologia de fenótipos tão complexos e variáveis?

Embora aproximadamente 90% dos casos de AC seja devido a mutações no *PAX6*, a relação entre o tipo da mutação e o fenótipo observado ainda não é bem determinada. Alguns estudos sugerem que a natureza da mutação (*missense* ou *nonsense*, por exemplo) ou ainda que a região no qual ocorre a mutação (*Paired Domain*, *Homeo Domain* ou Região PST) podem definir a gravidade do fenótipo, porém na literatura são observados muitos relatos de indivíduos de uma mesma família que compartilham a mesma mutação e o mesmo *background* ambiental e apresentam fenótipos distintos. Nesta tese, além de corroborar com os estudos previamente descritos na literatura no âmbito da correlação genótipo-fenótipo, nós também pretendemos demonstrar possíveis genes modificadores que além de ampliar o conhecimento em relação ao mecanismo envolvido nesta condição, também possibilite e incentive pesquisas futuras por tratamentos e terapias apropriadas para os indivíduos afetados.

CAPÍTULO III - OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Investigar características moleculares em famílias brasileiras com aniridia congênita.

3.2. Objetivos específicos

- Relacionar os fenótipos de aniridia congênita com possíveis mutações no gene *PAX6*;
- Investigar o impacto das mutações identificadas neste trabalho e nas descritas na literatura, sobre a estrutura da proteína PAX6;
- Analisar possíveis interações entre o *PAX6* e genes relacionados ao desenvolvimento;
- Estudar potencial influência de genes modificadores na variabilidade fenotípica na aniridia congênita.

CAPÍTULO IV – ARTIGO I

**A Mutation In The Transactivation Domain Of The *Pax6* Gene In Congenital
Aniridia**

Manuscrito submetido a Revista *Clinical Genetics*

A Mutation In The Transactivation Domain Of The *Pax6* Gene In Congenital Aniridia

Fernandes-Lima, Zuleide Silva^{1,2}; Paixão-Cortês, Vanessa Rodrigues⁸; Andrade, Ana Karolina Maia³; Coronado, Bruno Nobre Lins⁵; Santos, Mario Jorge^{5,9}; Monlleó, Isabella Lopes^{4,6,7}; Schüler-Faccini, Lavínia^{1,2,3}.

¹ Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil;

² Instituto Nacional de Genética Médica Populacional, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil;

³ Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil;

⁴ Serviço de Genética Clínica Hospital, Hospital Universitário Professor Alberto Antunes, Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Maceió, Brazil;

⁵ Serviço de Oftalmologia, Hospital Universitário Professor Alberto Antunes, Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Maceió, Brazil;

⁶ Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Maceió, Brazil;

⁷ Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Maceió, Brazil;

⁸ Programa de Pós-Graduação em Genética e Biodiversidade, Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, Brazil;

⁹ Programa de Pós-Graduação em Oftalmologia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brazil.

Corresponding author:

Lavínia Schüler-Faccini
Departamento de Genética – IB
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Caixa Postal 15031 – Agência Campus Agronomia
91501-970 – Porto Alegre – RS – Brazil

lavinia.faccini@ufrgs.br

CAPÍTULO V – ARTIGO II

Genetic background underlying phenotypic variability of iris malformations:

***in silico* pursuit of candidate genes**

Manuscrito submetido a Revista *Scientific Reports*

**Genetic background underlying phenotypic variability of iris malformations:
in silico pursuit of candidate genes**

Zuleide Silva Fernandes-Lima^{1,2,3}, Gabriela Elis Wachholz^{1, 3}, Thayne Woycinck Kowalski^{1,2,3}, Lavínia Schüler-Faccini^{1,2,3,4}, and Lucas Rosa Fraga^{1,2, 3,4*}

¹ Laboratório de Genética Médica e Evolução, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

² Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

³ Instituto Nacional de Genética Médica Populacional, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

⁴ Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

Corresponding author:

Lucas Rosa Fraga
Brazilian Teratogen Information Service (SIAT)
Medical Genetics Service
Hospital de Clínicas
90035-903 – Porto Alegre – RS – Brazil
Fax 55 51 33598008
lrf.fraga@gmail.com

CAPÍTULO VI – ARTIGO III
**Genetic Evaluation In *TP53* And *MDM2* As Modifier Genes For Congenital
Aniridia**

Letter submetida a Revista Gene Reports

Letter to the Editor

Genetic Evaluation in *TP53* and *MDM2* as modifier genes for congenital aniridia

Zuleide Silva Fernandes-Lima^{1,2,3*}; Lucas Rosa Fraga^{1,2,3,4*}; Gabriela Elis Wachholz^{1,3}; Lavínia Schüler-Faccini^{1,2,3,4}, Juliano André Boquett^{1,2,3};

¹Laboratório de Genética Médica e Evolução, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

²Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

³Instituto Nacional de Genética Médica Populacional, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

⁴Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

*Both authors contributed equally to this work

Correspondence to:

Juliano André Boquett

Departamento de Genética

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CEP 91501-970

Porto Alegre RS

Brazil

Tel: +55 51 3308-9819

e-mail: julianob9@hotmail.com

CAPÍTULO VII - DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

Apesar de bem estabelecida a etiologia genética da aniridia congênita (AC) para a maioria dos casos, o entendimento completo da relação genótipo-fenótipo ainda não está completamente estabelecido. Sabe-se que 90% dos casos de AC são devido a mutações no gene *PAX6* (*Paired Box 6*) (Hingorani *et al.*, 2012). O banco curado LOVD (2017) lista 472 variantes únicas. Este gene é bem conservado evolutivamente e, portanto, variantes em diversas regiões do gene podem levar a anomalias oculares, como a AC.

Um dos objetivos desta tese foi contribuir para o melhor entendimento da relação genótipo-fenótipo, *PAX6*-aniridia. No Capítulo IV, descrevemos uma nova mutação identificada no domínio de transativação rico em prolina, serina e treonina (PST) da proteína *PAX6* (c.955_958dupGACA) em um indivíduo afetado por AC com outras anomalias associadas. A mutação, segundo preditores funcionais *in silico*, introduz um erro na matriz de leitura na posição 334, resultando em um códon de término prematuro (PTC) na posição 355, mantendo os domínios de ligação *Paired Domain* (PD) e *Homeo Domain* (HD). Alguns estudos têm proposto que proteínas *PAX6* que mantém os domínios de ligação PD e HD intactos, porém apresentam alterações no PST e região C-terminal, estão associadas a fenótipos com AC total, enquanto que proteínas com mutações no HD, com ou sem alterações no PD, estão relacionadas com hipoplasia parcial da íris (Vincent *et al.*, 2003; Atchaneeyasakul *et al.*, 2006).

Outra discussão é quanto a natureza das mutações e se esta poderia determinar a gravidade do fenótipo, neste caso, mutações *nonsense* determinariam fenótipos mais graves, enquanto mutações *missense*, poderiam levar a fenótipos mais leves. As variantes *missense* podem resultar nos mais variáveis fenótipos, no banco de dados LOVD (2017) estão descritas 67 variantes *missense*, cerca da metade causa AC em uma forma mais leve, enquanto a segunda metade resulta em hipoplasia da íris, catarata, hipoplasia foveal, adesão iridocorneal, coloboma do nervo óptico e corioretinal, vítreo primário hiperplástico persistente, glaucoma,

opacificação corneal, esclerocornea, anoftalmia e microftalmia e Anomalia de Peters (Deml *et al.*, 2015; Ihnatko *et al.*, 2016).

Porém a maioria das alterações no gene *PAX6* que levam a AC são causadas por mutações que introduzem um PTC na *open reading frame* (ORF) deste gene. Os mRNAs contendo PTCs são degradados por uma via de decaimento *nonsense* (NMD) (Chang *et al.*, 2007), resultando em perda de função de uma cópia do *PAX6*, este tipo de mutação tipicamente determina um fenótipo mais grave (Tzoulaki *et al.*, 2005; Wen, 2008; Dubey *et al.*, 2015; Bobilev *et al.*, 2016; Ihnatko *et al.*, 2016). Na literatura, o mecanismo mais aceito pelo qual mutações no *PAX6* levam a AC, é o da haploinsuficiência. O gene neste caso, possuiria uma redução pela metade do seu produto devido à perda de função de uma cópia, e portanto, os mRNAs transcritos a partir de uma única cópia funcional são incapazes de produzir adequados níveis da proteína *PAX6*, que neste caso ficariam abaixo da dose crítica requerida para iniciar a transcrição de seus genes alvos *downstream*, o que prejudicaria o desenvolvimento do olho normal (Cvekl *et al.*, 1994; Singh *et al.*, 1998; Kokotas & Petersen, 2010; Hingorani *et al.*, 2012; Dubey *et al.*, 2015).

Entretanto, outro mecanismo tem sido discutido, o efeito dominante-negativo. Singh e colaboradores (1998) já demonstraram em ensaios funcionais que proteínas *PAX6* cujas mutações ocorrem no PST, e desde que mantenham o PD e o HD intactos, podem competir pelos sítios alvos de ligação com as proteínas *PAX6* normais e, conseqüentemente, reprimir a atividade destas. No entanto, as mutações *missense*, que perderam a habilidade de ligação através do PD, não reprimiram a atividade das proteínas normais. Na presença da *PAX6* mutante, as proteínas *PAX6* normais apresentam uma ligação mais fraca ao DNA, enquanto as proteínas mutantes mostram uma afinidade 3 a 5 vezes maior na ligação ao DNA, e desta forma, podem reduzir a atividade da *PAX6* normal mesmo em quantidades subestequiométricas. A alteração no PST parece resultar em uma maior habilidade de ligação da *PAX6* mutante, levando ao efeito dominante-negativo. Nesta situação a dose residual de *PAX6* normal seria ainda mais prejudicada em relação ao mecanismo da haploinsuficiência, uma vez que haveriam fatores impedindo o seu correto funcionamento, neste caso, os fatores seriam as proteínas mutantes.

Portanto, combinando os relatos da literatura e os achados clínicos e moleculares no caso analisado neste trabalho, nós propusemos que o mecanismo que está atuando na proteína resultante da mutação identificada e que poderia explicar, mesmo que em parte, o fenótipo mais grave neste indivíduo, é o dominante-negativo. Para corroborar esta hipótese será necessário a realização de estudos funcionais, o que, por limitações de técnica, ainda não foi possível realizar.

A dificuldade em determinar a correlação genótipo-fenótipo nos indivíduos com AC se deve a grande gama de mutações descritas nesta anomalia e sem um padrão específico. Indivíduos que apresentam uma mesma mutação, ainda que pertencentes a uma mesma família, podem apresentar fenótipos variados como visto em vários estudos anteriores (Brémond-Gignac *et al.*, 2005; Chien *et al.*, 2009; Jin *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2012; Cao *et al.*, 2014; Chograni *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2014; Chang *et al.*, 2015; Dubey *et al.*, 2015; He *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2015; Primignani *et al.*, 2016; Yokoi *et al.*, 2016; Miao *et al.*, 2017; Pérez-Solórzano *et al.*, 2017; Vasilyeva *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017) e na família que estudamos anteriormente (Fernandes-Lima *et al.*, 2014).

A busca no Capítulo V nos levou a cinco genes como potenciais modificadores. Dois pertencentes a família das cristalinas, *CRYAA* (*Crystallin Alpha A*) e *CRYBB3* (*Crystallin Beta B3*); uma aquaporina, *MIP* (*Major Intrinsic Protein Of Lens Fiber*); e dois pertencentes a família das conexinas *GJA3* (*Gap Junction Protein Alpha 3*) e *GJA8* (*Gap Junction Protein Alpha 8*). Aproximadamente metade dos casos de CC apresentam mutações nos genes da família das cristalinas. Esta família de genes codifica proteínas estruturais que são importantes para a manutenção da transparência do cristalino. Em torno de 15% das mutações que levam a CC ocorrem em genes da família das conexinas. As proteínas produzidas por estes genes possuem importante papel no transporte de metabólitos entre as células, uma vez que o cristalino é uma estrutura avascular. Cerca de 10% dos casos apresentam mutações em fatores de transcrição. Aproximadamente 5% ocorre em genes de filamentos intermediários ou aquaporinas, que também possuem importante papel no transporte através das membranas. E por fim, cerca de 10% dos casos de CC ocorrem em diversos outros genes e os outros 10%

restantes não possuem um gene identificado (Graw, 2009; 2010; Shiels & Hejtmancik, 2013; Deng & Yuan; 2014; Yu *et al.*, 2014).

Os genes identificados em nosso estudo como potenciais modificadores já foram descritos como envolvidos com outras anormalidades oculares além da catarata e alguns deles podem apresentar penetrância incompleta. O gene *CRYAA* já foi relacionado a microcórnea (Vanita *et al.*, 2006; Khan *et al.*, 2007; Hansen *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2011), microftalmia (Brady *et al.*, 1997; Litt *et al.*, 1998) e glaucoma (Huang *et al.*, 2015) além da CC total (Santhiya *et al.*, 2006). Richter e colaboradores (2008) observaram microcórnea e opacificação da córnea nos casos estudados. Vanita e colaboradores (2006) ainda sugerem que as α -A-cristalinas estão envolvidas no desenvolvimento do segmento anterior do olho, além do cristalino. Uma mutação no gene *CRYBB3* foi identificada por Reis e colaboradores (2013) como a causa de múltiplos tipos de CC autossômica dominante segregando em uma família com penetrância incompleta. O gene *MIP* por sua vez já foi relacionado a casos apresentando glaucoma (Verma *et al.*, 2015), enquanto que *GJA3* apresentou penetrância incompleta em uma família com CC descrita por Burdon e colaboradores (2004). Também já foram observadas variações fenotípicas inter- e intra-familial com relação a morfologia e a localização da opacificação do cristalino, em casos com mutações no *GJA3*, o que sugere a influência do *background* ambiental e de outros genes nesta variabilidade (Zhang *et al.*, 2012). Em relação ao gene *GJA8* também foram descritos casos com microcórnea (Devi & Vijayalakshmi, 2006; Sun *et al.*, 2011), microftalmia (Ma *et al.*, 2016; 2017) e glaucoma (Huang *et al.*, 2015) como foi observado no gene *CRYAA*. Foi ainda observado CC do tipo estrelada além de microcórnea em uma família relatada por Hansen e colaboradores (2007). He e colaboradores (2011) também demonstraram penetrância incompleta nos casos analisados em uma família com CC apresentando mutações em *GJA8*, como observado para os genes *CRYBB3* e *GJA3*.

As anormalidades descritas acima também já foram observadas em indivíduos afetados por AC com mutações no *PAX6* descritos em estudos prévios, incluindo o nosso (Fernandes-Lima *et al.*, 2014; Chang *et al.*, 2015; Dubey *et al.*,

2015; Yokoi *et al.*, 2016). A análise de predição de rede de interação proteína-proteína demonstrou que a PAX6 interage com MIP através de dois intermediários, a ubiquitina ITCH (*Itchy E3 Ubiquitin Protein Ligase*) e a proteína kinase PRKACA (*Protein Kinase CAMP-Activated Catalytic Subunit Alpha*). MIP por sua vez interage com GJA3 e GJA8. CRYAA e CRYBB3 não mostraram evidência de interação direta com a PAX6. Apesar disto, de acordo com a literatura, o PAX6 ativa genes codificantes de proteínas de citoesqueleto, estruturais e de membrana durante o desenvolvimento dos olhos (Graw, 2010), famílias onde os genes propostos neste estudo estão incluídos. Estudos a fim de identificar genes modificadores na AC não foram ainda descritos na literatura.

Mutações no gene *PRPH2* (*Peripherin 2*) estão descritas na literatura como associadas a degeneração na retina, porém é observada uma variabilidade fenotípica entre os casos. Utilizando a abordagem de genes modificadores, estudos têm demonstrado a função do gene *ROM1* (*Retinal Outer Segment Membrane Protein 1*) e *ABCA4* (*ATP Binding Cassette Subfamily A Member 4*) como potenciais modificadores de fenótipos na herança complexa da degeneração da retina, onde podem ser observados Retinite Pigmentosa (RP), degeneração macular e *Fundus Flavimaculatus* (Weleber *et al.*, 1993; Kajiwara *et al.* 1994; Rivolta *et al.* 2002; Poloschek *et al.* 2010). O gene *ROM1* foi o primeiro destes a ser identificado como modificador, Kajiwara e colaboradores (1994) investigaram três famílias que apresentavam fenótipos distintos, todas possuíam uma mutação em heterozigose em *PRPH2* (p.L185P). Apenas nos membros da família que apresentaram mutações em *PRPH2* e em *ROM1* (p.114fsX) desenvolveram RP. Enquanto os indivíduos que foram heterozigotos para apenas uma dessas mutações, não desenvolveram RP (Kajiwara *et al.* 1994; Rivolta *et al.* 2002). Posteriormente a função do *ROM1* como modificador foi corroborada por um estudo que investigou 15 membros de uma família, onde aqueles que apresentavam mutação em *PRPH2* (p.R172W) combinada com alteração em *ROM1* (p.R229H) demonstravam um fenótipo mais grave, com perda de função das células Rod mas não das células Cone da retina. Ainda neste estudo, um subgrupo de pacientes com uma mutação em um terceiro gene, o *ABCA4* (p.V2050L), combinada com as mutações observadas em *PRPH2* e *ROM1*, o fenótipo foi ainda mais grave, com avançada

degeneração macular, nictalopia e grave perda das funções das células Rod e Cone (Poloschek *et al.* 2010).

É importante ressaltar que análises moleculares nos genes propostos em indivíduos com AC, assim como foram realizadas nos estudos relacionados a degeneração da retina, são necessárias para corroborar nossa hipótese de que *CRYAA*, *CRYBB3*, *MIP*, *GJA3* e *GJA8* são potenciais genes modificadores para a variabilidade fenotípica inter- e intra-familiar observada na AC. Este tipo de estudo pode contribuir para um melhor manejo das características clínicas de cada paciente direcionando-os para um tratamento personalizado.

No capítulo VI nosso grupo avaliou os polimorfismos rs1042522 do *TP53* (*Tumor Protein P53*) e rs2279744 do *MDM2* (*MDM2 Proto-Oncogene*) para 29 indivíduos afetados por AC (17 destes apresentando CC além da AC) pertencentes a família previamente investigada por nosso grupo e mencionada anteriormente (Fernandes-Lima *et al.*, 2014). Observamos através de análises *in silico* de predição de redes de interação proteína-proteína (dados não apresentados nesta tese) que o *TP53* se posiciona como um intermediário entre o *PAX6* e os genes modificadores propostos no capítulo V.

Embora as frequências alélicas e genotípicas tenham sido distintas entre os dois grupos, não foi encontrada associação positiva entre as variantes analisadas e a ocorrência de CC nos indivíduos afetados pela AC. Porém, é importante ressaltar que o nosso número amostral é limitado para obter resultados estatísticos significantes. Alguns estudos evidenciaram o potencial papel de genes de apoptose como o *TP53* e seu principal regulador, o *MDM2*, durante o desenvolvimento do olho e do cristalino, observado em ensaios *in vivo* em camundongos e galinhas (Geatrell *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2012; Vuong *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2014). Zhang e colaboradores (2014) demonstraram ainda que a deleção de *MDM2* em embriões de camundongos leva a uma ativação anormal de *TP53* resultando em defeitos no desenvolvimento do cristalino. O gene *TP53* também já foi previamente identificado como regulando diretamente o gene *CRYAA* (Ji *et al.*, 2013).

Esta tese teve por objetivo contribuir com os estudos que buscam compreender a ampla variação fenotípica observada na AC e a sua correlação genótipo-fenótipo. Apesar de ser uma anomalia rara, a AC merece atenção especial, devido aos prejuízos funcionais e sociais que ela traz aos indivíduos afetados. Em decorrência da perda visual progressiva, que pode ser iniciada ainda na infância, estes indivíduos são impostos a limitações de acesso à educação e profissionalização. Porém é importante ressaltar que embora não exista cura para a AC até o momento, algumas das anormalidades que estão associadas podem ser tratadas, tais como a CC e o glaucoma. O bem-estar de cada indivíduo afetado dependerá de como essa condição e os prejuízos físicos e psicológicos que a acompanham serão tratados caso a caso. O conjunto de dados deste trabalho, visa, portanto, melhorar a compreensão dos aspectos peculiares da AC assim como promover o manejo adequado dos indivíduos afetados por esta anomalia bem como de seus familiares não afetados, proporcionando a estes tratamento e aconselhamento genético apropriados. Em uma visão mais otimista e ambiciosa, o entendimento dos fatores genéticos envolvidos na biologia da AC além do *PAX6*, podem auxiliar pesquisas futuras no campo do desenvolvimento de drogas e terapias a fim de reverter os prejuízos clínicos, ou no mínimo, bloquear a progressão destes, nos indivíduos afetados.

CAPÍTULO VIII - PERSPECTIVAS

8. PERSPECTIVAS

Esta tese apresentou a importância dos estudos moleculares em humanos afetados pela AC, porém ainda há muito a ser feito.

1. Realizar ensaios funcionais da mutação encontrada no gene *PAX6* a fim de demonstrar o impacto destas sobre a proteína no artigo descrito no Capítulo IV.
2. Avaliar outros casos de indivíduos afetados por AC, incluindo pesquisa de mutações no gene candidato *PAX6* e em outros genes descritos na literatura já previamente relacionados com a anomalia, bem como ensaios funcionais quando possível.
3. Realizar testes moleculares dos possíveis genes modificadores propostos no Capítulo V nos indivíduos da família descrita por nosso grupo.
4. Testar estes genes em outros indivíduos portadores de AC com e sem CC e controles.
5. Ampliar os testes para os polimorfismos dos genes *TP53* e *MDM2* em outros casos de AC com e sem CC.

CAPÍTULO IX – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves MR, Dantas AM, Sallum J (2013) Embriologia, genética e malformações do aparelho visual. 3ª edição. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

Andrade JGR de, Guaragna MS, Soardi FC, Guerra-Junior G, Mello MP de, Maciel-Guerra AT (2008) Clinical and genetic findings of five patients with *WT1*-related disorders. *Arq Bras de Endocrinol E Metabol* 52(8), 1236–1243.

Ansari M, Rainger J, Hanson IM, Williamson KA, Sharkey F, Harewood L, Sandilands A, Clayton-Smith J, Dollfus H, Bitoun P, Meire F, Fantes J, Franco B, Lorenz B, Taylor DS, Stewart F, Willoughby CE, McEntagart M, Khaw PT, Clericuzio C, Van Maldergem L, Williams D, Newbury-Ecob R, Traboulsi EI, Silva ED, Madlom MM, Goudie DR, Fleck BW, Wieczorek D, Kohlhase J, McTrusty AD, Gardiner C, Yale C, Moore AT, Russell-Eggitt I, Islam L, Lees M, Beales PL, Tuft SJ, Solano JB, Splitt M, Hertz JM, Prescott TE, Shears DJ, Nischal KK, Doco-Fenzy M, Prieur F, Temple IK, Lachlan KL, Damante G, Morrison DA, van Heyningen V, FitzPatrick DR (2016) Genetic Analysis of 'PAX6-Negative' Individuals with Aniridia or Gillespie Syndrome. *PLoS One* 11(4):e0153757.

Arendt D, Tessmar K, de Campos-Baptista MI, Dorresteyn A, Wittbrodt J (2002) Development of pigment-cup eyes in the polychaete *Platynereis dumerilii* and evolutionary conservation of larval eyes in Bilateria. *Development* 129: 1143-1154.

Asami M, Pilz GA, Ninkovic J, Godinho L, Schroeder T, Huttner WB, Götz M (2011) The role of *Pax6* in regulating the orientation and mode of cell division of progenitors in the mouse cerebral cortex. *Development* 138, 5067-5078.

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.

Azuma N, Yamaguchi Y, Handa H, Tadokoro K, Asaka A, Kawase E, Yamada M (2003) Mutations of the *PAX6* gene detected in patients with a variety of optic-nerve malformations. *Am J Hum Genet* 72(6), 1565–70.

Badano JL, Katsanis N (2002) Beyond Mendel: An evolving view of human genetic disease transmission. *Nat Rev Genet* 3: 779–789.

Beebe DC & Coats JM (2000) The lens organizes the anterior segment: Specification of neural crest cell differentiation in the avian eye. *Dev Biol* 220, 424–431.

Blake JA & Ziman MR (2014). *Pax* genes: regulators of lineage specification and progenitor cell maintenance. *Development* 141(4), 737–751.

- Bobilev AM, Mcdougal ME, Taylor WL, Geisert EE, Netland PA, Lauderdale JD (2016) Assessment of *PAX6* alleles in 66 families with aniridia. *Clin Genet* 89(6), 669–677.
- Brady JP, Garland D, Duglas-Tabor Y, Robison WG Jr, Groome A, Wawrousek EF (1997) Targeted disruption of the mouse alpha A-crystallin gene induces cataract and cytoplasmic inclusion bodies containing the small heat shock protein alpha B-crystallin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 884-889.
- Brémond-Gignac D, Gérard-Blanluet M, Copin H, Bitoun P, Baumann C, Crolla JA, Benzacken B, Verloes A (2005) Three patients with hallucal polydactyly and WAGR syndrome, including discordant expression of Wilms tumor in MZ twins. *Am J Med Genet* 134 A(4), 422–425.
- Burdon KP, Wirth MG, Mackey DA, Russell-Eggitt IM, Craig JE, Elder JE, Dickinson JL, Sale MM (2004) A novel mutation in the connexin 46 gene causes autosomal dominant congenital cataract with incomplete penetrance. *J Med Genet* 41: e106.
- Cai F, Zhu J, Chen W, Ke T, Wang F, Tu X, Zhang Y, Jin R, Wu X (2010) A novel *PAX6* mutation in a large Chinese family with aniridia and congenital cataract. *Mol Vis* 16:1141-5.
- Callaerts P, Munoz-Marmol AM, Glardon S, Castillo E, Sun H, Li WH, Gehring WJ, Salo E. (1999). Isolation and expression of a *Pax-6* gene in the regenerating and intact Planarian *Dugesia(G)tigrina*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 558-563.
- Cao X, Zhou XM, Gan R, Jiang LQ, Lu L, Wang Y, Fan N, Yin Y, Yan NH, Yu WH, Liu XY (2014) A novel mutation of *PAX6* identified in a chinese twin family with congenital aniridia complicated with nystagmus. *Genet Mol Res* 13(4), 8679–8685.
- Chang YF, Imam JS, Wilkinson MF (2007) The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. *Annu Rev Biochem* 76: 51–74.
- Chang MS, Han JC, Lee J, Kwun Y, Huh R, Ki CS, Kee C, Cho SY, Jin DK (2015) A novel splice site mutation in the *PAX6* gene in a Korean family with isolated aniridia. *Ann Clin Lab Sci* 45(1), 90–93.
- Chien YH, Huang HP, Hwu WL, Chien YH, Chang TC, Lee NC (2009) Eye anomalies and neurological manifestations in patients with *PAX6* mutations. *Mol Vis* 15:2139-45.
- Chisholm AD, Horvitz HR (1995) Patterning of the *Caenorhabditis elegans* head region by the Pax-6 family member *vab-3*. *Nature* 377: 52-55.
- Cho S-H & Cepko CL (2006) Wnt2b/ β -catenin-mediated canonical *Wnt* signaling determines the peripheral fates of the chick eye. *Development* 133, 3167–3177.

Chograni M, Derouiche K, Chaabouni M, Lariani I, Bouhamed HC (2014) Molecular analysis of the *PAX6* gene for aniridia and congenital cataracts in Tunisian families. *Hum Genome Var* 1:14008.

Crolla JA & van Heyningen V (2002) Frequent chromosome aberrations revealed by molecular cytogenetic studies in patients with aniridia. *Am J Hum Genet* 71(5), 1138–49.

Cvekl A, Sax CM, Bresnick EH, Piatigorsky J (1994) A complex array of positive and negative elements regulates the chicken alpha A-crystallin gene: involvement of Pax-6, USF, CREB and/or CREM, and AP-1 proteins. *Mol Cell Biol* 14:7363-76.

Cvekl A & Callaerts P (2017) *PAX6*: 25th anniversary and more to learn. *Exp Eye Res* 156, 10–21.

Czerny T, Busslinger M (1995) DNA-binding and transactivation properties of Pax-6: three amino acids in the paired domain are responsible for the different sequence recognition of Pax-6 and BSAP (Pax-5). *Mol Cell Biol* 15(5):2858-71.

De Lima Marson FA, Bertuzzo CS, Secolin R, Ribeiro AF, Ribeiro JD (2013) Genetic interaction of *GSH* metabolic pathway genes in cystic fibrosis. *BMC Med Genet* 14, 60

Deml B, Reis LM, Lemyre E, Clark RD, Kariminejad A, Semina EV (2015) Novel mutations in *PAX6*, *OTX2* and *NDP* in anophthalmia, microphthalmia and coloboma. *Eur J Hum Genet*, 24(4), 535–541.

Deng H & Yuan L (2014) Molecular genetics of congenital nuclear cataract. *Eur J Med Genet* 57(2-3):113-22.

Devi RR & Vijayalakshmi P (2006) Novel mutations in *GJA8* associated with autosomal dominant congenital cataract and microcornea. *Mol Vis* 12: 190-195.

Devi RR, Yao W, Vijayalakshmi P, Sergeev YV, Sundaresan P, Hejtmancik JF (2008) Crystallin gene mutations in Indian families with inherited pediatric cataract. *Mol Vis* 14:1157-70.

Dias da Silva MR, Tiffin N, Mima T, Mikawa T, Hyer J (2007) FGF-mediated induction of ciliary body tissue in the chick eye. *Dev Biol* 304, 272–285.

Ding X, Wang B, Luo Y, Hu S, Zhou Z, Wang J, Ma X, Qi Y (2011) A novel mutation in the connexin 46 (*GJA3*) gene associated with congenital cataract in a Chinese pedigree. *Mol Vis* 17:1343-9.

Dipple KM & McCabe ERB (2000) Phenotypes of patients with “simple” Mendelian disorders are complex traits: Thresholds, modifiers, and systems dynamics. *Am J Hum Genet* 66: 1729–1735.

Dubey SK, Mahalaxmi N, Vijayalakshmi P, Sundaresan P (2015) Mutational analysis and genotype-phenotype correlations in southern Indian patients with sporadic and familial aniridia. *Mol Vis* 21:88-97.

Dudek RW (2014) *Embriology*. 6ª edição. Wolters Kluwer, Philadelphia, pp 106-114.

Duncan MK, Cvekl A, Li X, Piatigorsky J (2000) Truncated forms of Pax-6 disrupt lens morphology in transgenic mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41(2):464-73.

Eberhard D, Jiménez G, Heavey B, Busslinger M (2000) Transcriptional repression by Pax5 (BSAP) through interaction with corepressors of the Groucho family. *EMBO J* 19, 2292-2303.

Eichler EE, Flint J, Gibson G, Kong A, Leal SM, Moore JH, Nadeau JH (2010) Missing heritability and strategies for finding the underlying causes of complex disease. *Nat Rev Genet* 11: 446–450.

Fernandes-Lima ZS, Paixão-Côrtes VR, Andrade AK, Fernandes AS, Coronado BN, Monte Filho HP, Santos MJ, Omena Filho RL, Biondi FC, Ruiz-Linares A, Ramallo V, Hünemeier T, SchulerFaccini L, Monlleó IL (2014) Ocular and craniofacial phenotypes in a large Brazilian family with congenital aniridia. *Clin Genet* 87(1):68-73.

Fernandes-Lima ZS (2014) *Investigação clínica e genética de uma família brasileira com aniridia congênita*. Master's thesis. Porto Alegre. Disponível em: <http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/96852>. Acesso em: Agosto 2014.

Flint J & Mackay TFC (2009) Genetic architecture of quantitative traits in mice, flies, and humans. *Genome Res* 19: 723–733.

Fischbach BV, Trout KL, Lewis J, Luis CA, Sika M (2005) WAGR syndrome: a clinical review of 54 cases. *Pediatrics* 116: 984–988.

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.

Futuyma DJ (2008) *Biologia evolutiva*. 2ª edição. Funpec, Ribeirão Preto.

Gehring WJ (1996) The master control gene for morphogenesis and evolution of the eye. *Genes Cells* 1(1):11-5.

Gehring WJ (2014) The evolution of vision. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 3(1), 1–40.

Gibson G (2012) Rare and common variants: Twenty arguments. *Nat Rev Genet* 13: 135–145.

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.

Glardon S, Callaerts P, Halder G, Gehring WJ (1997) Conservation of Pax-6 in a lower chordate, the ascidian *Phallusia mammillata*. *Development* 124 817-825.

Glardon S, Holland LZ, Gehring WJ, Holland ND (1998) Isolation and developmental expression of the amphioxus *Pax-6* gene (AmphiPax-6): insights into eye and photoreceptor evolution. *Development* 125: 2701-2710.

Graw J (2009) Genetics of crystallins: Cataract and beyond. *Exp Eye Res* 88(2), 173–189.

Graw J (2010) Eye development. *Curr Top Dev Biol* 90:343-86.

Gregory-Evans CY, Wang X, Wasan KM, Zhao J, Metcalfe AL, Gregory-Evans K (2014) Postnatal manipulation of Pax6 dosage reverses congenital tissue malformation defects. *J Clin Invest* 124(1), 111–116.

Goswami S, Gupta V, Srivastava A, Sihota R, Malik MA, Kaur J (2014) A novel duplication in the *PAX6* gene in a North Indian family with aniridia. *Int Ophthalmol* 34(6):1183-8.

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

Haldane J (1941) The relative importance of principal and modifying genes in determining some human diseases. *J Genet* 41: 149–157.

Halder G, Callaerts P, Gehring WJ (1995) Induction of ectopic eyes by targeted expression of the eyeless gene in *Drosophila*. *Science* 267: 1788-1792.

Hansen L, Yao W, Eiberg H, Kjaer KW, Baggensen K, Hejtmancik JF, Rosenberg, T (2007) Genetic heterogeneity in microcornea-cataract: five novel mutations in *CRYAA*, *CRYGD*, and *GJA8*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48: 3937-3944.

Harrington L, Klintworth GK, Secor TE, Breitman ML (1991) Developmental analysis of ocular morphogenesis in α A-crystallin/diphtheria toxin transgenic mice undergoing ablation of the lens. *Dev Biol* 148, 508–516.

Hartmann B, Lee PN, Kang YY, Tomarev S, de Couet HG, Callaerts P (2003) *Pax6* in the sepiolid squid *Euprymna scolopes*: evidence for a role in eye, sensory organ and brain development. *Mech Dev* 120: 177-183.

He W, Li X, Chen J, Xu L, Zhang F, Dai Q, Cui H, Wang DM, Yu J, Hu S, Lu S (2011) Genetic linkage analyses and *Cx50* mutation detection in a large multiplex Chinese family with hereditary nuclear cataract. *Ophthalmic Genet* 32: 48-53.

He F, Liu DL, Chen MP, Liu L, Lu L, Ouyang M, Yang J, Gan R, Liu XY (2015) A rare *PAX6* mutation in a Chinese family with congenital aniridia. *Genet Mol Res* 14(4), 13328–13336.

Hever AM, Williamson KA, van Heyningen V (2006) Developmental malformations of the eye: The role of *PAX6*, *SOX2* and *OTX2*. *Clin Genet* 69(6), 459–470.

Hingorani M, Hanson I, van Heyningen V (2012) Aniridia. *Eur J Hum Genet* 20(10):1011-7.

Hingorani M, Williamson KA, Moore AT, van Heyningen V (2009) Detailed ophthalmologic evaluation of 43 individuals with *PAX6* mutations. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50(6), 2581–2590.

Hu XH, Nie Q, Yi M, Li TT, Wang ZF, Huang ZX, Gong XD, Zhou L, Ji WK, Hu WF, Liu JF, Wang L, Woodward Z, Zhu J, Liu WB, Nguyen QD, Li DW (2014) The tumor suppressor, *p53* regulates the γ A-crystallin gene during mouse lens development. *Curr Mol Med* 14(9):1197-204.

Huang X, Xiao X, Jia X, Li S, Li M, Guo X, Liu X, Zhang Q (2015) Mutation analysis of the genes associated with anterior segment dysgenesis, microcornea and microphthalmia in 257 patients with glaucoma. *Int J Mol Med* 36(4):1111-7.

Ihnatko R, Eden U, Fagerholm P, Lagali N (2016) Congenital Aniridia and the Ocular Surface. *Ocul Surf* 14(2), 196–206.

Ivanov I, Shuper A, Shohat M, Snir M, Weitz R (1995) Aniridia: recent achievements in pediatric practice. *Eur J Pediatr* 154(10):795-800.

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), 305–312.

Javadiyan S, Craig JE, Souzeau E, Sharma S, Lower KM, Pater J, Casey T, Hodson T, Burdon KP (2016) Recurrent mutation in the crystallin alpha A gene associated with inherited paediatric cataract. *BMC Res Notes* 9:83.

Jiao X, Kabir F, Irum B, Khan AO, Wang Q, Li D, Khan AA, Husnain T, Akram J, Riazuddin S, Hejtmancik JF, Riazuddin SA (2016) A Common Ancestral Mutation in *CRYBB3* Identified in Multiple Consanguineous Families with Congenital Cataracts. *PloS One* 11(6):e0157005.

Ji WK, Tang XC, Yi M, Chen PQ, Liu FY, Hu XH, Hu WF, Fu SJ, Liu JF, Wu KL, Wu MX, Liu XL, Luo LX, Huang S, Liu ZZ, Yu MB, Liu YZ, Li DW (2013) *p53* directly regulates α A- and β A3/A1-crystallin genes to modulate lens differentiation. *Curr Mol Med* 13(6):968-78.

Jin C, Wang Q, Li J, Zhu Y, Shentu X, Yao K (2012) A recurrent *PAX6* mutation is associated with aniridia and congenital progressive cataract in a Chinese family. *Mol Vis* 18:465-70.

Kajiwara K, Berson E, Dryja T (1994) Digenic retinitis pigmentosa due to mutations at the unlinked peripherin/ *RDS* and *ROM1* loci. *Science* 264: 1604–1608.

Khan AO, Aldahmesh MA, Meyer B (2007) Recessive congenital total cataract with microcornea and heterozygote carrier sings caused by a novel missense *CRYAA* mutation (R54C). *Am J Ophthalmol* 144(6):949-952.

Kousi M, Katsanis N (2015) Genetic modifiers and oligogenic inheritance. *Cold Spring Harb Perspect Med* 5(6), 1-22.

Kokotas H & Petersen MB (2010) Clinical and molecular aspects of aniridia. *Clin Genet* 77(5), 409–420.

Kozmik Z, Daube M, Frei E, Norman B, Kos L, Dishaw LJ, Noll M, Piatigorsky J (2003) Role of *Pax* genes in eye evolution: a cnidarian *PaxB* gene uniting *Pax2* and *Pax6* functions. *Dev Cell* 5: 773-785.

Krauss S, Johansen T, Korzh V, Moens U, Ericson JU, Fjose A (1991) Zebrafish *pax[zf-a]*: a paired box-containing gene expressed in the neural tube. *EMBO J* 10: 3609-3619.

Kumar M, Agarwal T, Khokhar S, Kumar M, Kaur P, Roy TS, Dada R (2011) Mutation screening and genotype phenotype correlation of α -crystallin, γ -crystallin and *GJA8* gene in congenital cataract. *Mol Vis* 17:693-707.

Kurahashi S, Hayakawa F, Miyata Y, Yasuda T, Minami Y, Tsuzuki S, Abe A, Naoe T (2011) *PAX5-PML* acts as a dual dominant-negative form of both *PAX5* and *PML*. *Oncogene* 30(15):1822-30.

Lee H, Khan R, O'Keefe M (2008) Aniridia: current pathology and management. *Acta Ophthalmol* 86:708-715.

Lee HJ & Colby KA (2013) A Review of the Clinical and Genetic Aspects of Aniridia. *Semin Ophthalmol* 28(5–6), 306–312.

Lee PC, Lam HH, Ghani SA, Subrayan V, Chua KH (2014) Investigation of a *PAX6* gene mutation in a Malaysian family with congenital aniridia. *Genet Mol Res* 13(2), 3553–3559.

Li J, Wang Q, Fu Q, Zhu Y, Zhai Y, Yu Y, Zhang K, Yao K (2013) A novel connexin 50 gene (gap junction protein, alpha 8) mutation associated with congenital nuclear and zonular pulverulent cataract. *Mol Vis* 19:767-74.

Li G, Xu F, Zhu J, Krawczyk M, Zhang Y, Yuan J, Patel S, Wang Y, Lin Y, Zhang M, Cai H, Chen D, Zhang M, Cao G, Yeh E, Lin D, Su Q, Li WW, Sen GL, Afshari N, Chen S, Maas RL, Fu XD, Zhang K0, Liu Y, Ouyang, H (2015) Transcription factor PAX6 (paired box 6) controls limbal stem cell lineage in development and disease. *J Biol Chem* 290(33), 20448–20454.

Lim HT, Seo EJ, Kim GH, Ahn H, Lee HJ, Shin KH, Lee JK, Yoo HW (2012) Comparison between aniridia with and without PAX6 mutations: Clinical and molecular analysis in 14 Korean patients with aniridia. *Ophthalmology* 119(6), 1258–1264.

Lim HT, Kim DH, Kim H (2017) PAX6 aniridia syndrome: clinics, genetics and therapeutics. *Curr Opin Ophthalmol* 28(5):436-447.

Lipner EM, Garcia BJ, Strong M (2016) Network Analysis of Human Genes Influencing Susceptibility to Mycobacterial Infections. *PLoS One* 11(1), 1–20.

Litt M, Kramer P, LaMorticella DM, Murphey W, Lovrien EW, Weleber RG (1998) Autosomal dominant congenital cataract associated with a missense mutation in the human alpha crystallin gene *CRYAA*. *Hum Molec Genet* 7: 471-474.

Liu FY, Tang XC, Deng M, Chen P, Ji W, Zhang X, Gong L, Woodward Z, Liu J, Zhang L, Sun S, Liu JP, Wu K, Wu MX, Liu XL, Yu MB, Liu Y, Li DW (2012) The tumor suppressor *p53* regulates *c-Maf* and *Prox-1* to control lens differentiation. *Curr Mol Med* 12(8):917-28.

Liu Q, Wan W, Liu Y, Hu Z, Guo H, Xia K, Jin X (2015) A novel PAX6 deletion in a Chinese family with congenital aniridia. *Gene* 563(1):41-44.

Llerena JC Jr, de Almeida C, Bastos E, Crolla JA (2000) FISH studies in a girl with sporadic aniridia and an apparently balanced de novo t(11;13)(p13;q33) translocation detect a microdeletion involving the WAGR region. *Genet Mol Biol* 23(3), 535–539.

Lykke-Andersen S & Jensen TH (2015) Nonsense-mediated mRNA decay: an intricate machinery that shapes transcriptomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16(11):665-77.

Ma AS, Grigg JR, Ho G, Prokudin I, Farnsworth E, Holman K, Cheng A, Billson FA, Martin F, Fraser C, Mowat D, Smith J, Christodoulou J, Flaherty M, Bennetts B, Jamieson, RV (2016) Sporadic and Familial Congenital Cataracts: Mutational Spectrum and New Diagnoses Using Next-Generation Sequencing. *Hum Mutat* 37(4), 371–384.

Ma AS, Grigg JR, Prokudin I, Flaherty M, Bennetts B, Jamieson RV (2017) New mutations in *GJA8* expand the phenotype to include total sclerocornea. *Clin Genet* 29. doi: 10.1111/cge.13045.

Maekawa M, Iwayama Y, Nakamura K, Sato M, Toyota T, Ohnishi T, Yamada K, Miyachi T, Tsujii M, Hattori E, Maekawa N, Osumi N, Mori N, Yoshikawa T (2009) A novel missense mutation (Leu46Val) of *PAX6* found in an autistic patient. *Neurosci Lett*, 462(3), 267–271.

Manuel MN, Mi D, Mason JO, Price DJ (2015) Regulation of cerebral cortical neurogenesis by the Pax6 transcription factor. *Front Cell Neurosci* 9, 1–21.

Mascarenhas JB, Young KP, Littlejohn EL, Yoo BK, Salgia R, Lang D (2009) PAX6 is expressed in pancreatic cancer and actively participates in cancer progression through activation of the MET tyrosine kinase receptor gene. *J Biol Chem* 284(40), 27524–27532.

Miao Q, Ping X, Tang X, Zhang L, Zhang X, Cheng Y, Shentu X (2017) Experimental assessment of novel *PAX6* splicing mutations in two Chinese families with aniridia. *Gene* 630, 44–48.

Milivojevic M, Petrovic I, Kovacevic-Grujicic N, Popovic J, Mojsin M, Stevanovic M (2013) Construction and functional analysis of novel dominant-negative mutant of human SOX18 protein. *Biochemistry (Mosc)* 78(11):1287-92.

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.

Miller DJ, Hayward DC, Reece-Hoyes JS, Scholten I, Catmull J, Gehring WJ, Callaerts P, Larsen JE, Ball EE. (2000). Pax gene diversity in the basal cnidarian *Acropora millepora* (Cnidaria, Anthozoa): implications for the evolution of the Pax gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 4475-4480.

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

Mirzayans F, Pearce WG, MacDonald IM, Walter MA (1995) Mutation of the *PAX6* gene in patients with autosomal dominant keratitis. *Am J Hum Genet* 57(3):539-48.

Moore KL & Persaud TVN (2008) *Embriologia Clínica*. 8ª edição. Elsevier, Rio de Janeiro, pp 428-438.

Nakayama T, Fisher M, Nakajima K, Odeleye AO, Zimmerman KB, Fish MB, Yaoita Y, Chojnowski JL, Lauderdale JD, Netland PA, Grainger RM (2015) *Xenopus pax6* mutants affect eye development and other organ systems, and have phenotypic similarities to human aniridia patients. *Dev Biol* 408(2), 328–344.

Nallathambi J, Neethirajan G, Shashikant S, Vijayalakshmi P, Sundaresan, P (2006) *PAX6* missense mutations associated in patients with optic nerve malformation. *Mol Vis* 12, 236–242.

Neethirajan G, Hanson IM, Krishnadas SR, Vijayalakshmi P, Anupkumar K, Sundaresan P (2003) A novel *PAX6* gene mutation in an Indian aniridia patient. *Mol Vis* 9, 205–9.

Neethirajan G, Krishnadas SR, Vijayalakshmi P, Shashikant S, Sundaresan P (2004) *PAX6* gene variations associated with aniridia in south India. *BMC Med Genet* 5, 9.

Neethirajan G, Solomon A, Krishnadas SR, Vijayalakshmi P, Sundaresan P (2009) Genotype/phenotype association in Indian congenital aniridia. *Indian J Pediatr* 76(5), 513–517.

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

Paixão-Côrtés VR, Salzano FM, Bortolini MC (2015) Origins and evolvability of the *PAX* family. *Semin Cell Dev Biol* 44:64-74.

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* 18:488-94.

Pearce WG, Mielke BW, Hassard DT, Climenhaga HW, Climenhaga DB, Hodges EJ (1995) Autosomal dominant keratitis: a possible aniridia variant. *Can J Ophthalmol* 30(3):131-7.

Pérez-Solórzano S, Chacón-Camacho OF, Astiazarán MC, Ledesma-Gil G, Zenteno, JC (2017) *PAX6* allelic heterogeneity in Mexican congenital aniridia patients: expanding the mutational spectrum with seven novel pathogenic variants. *Clin Exp Ophthalmol* (169352).

Pichi F, Lembo A, Serafino M, Nucci P (2016) Genetics of Congenital Cataract. *Dev Ophthalmol* 57:1-14.

Poloschek CM, Bach M, Lagrèze WA, Glaus E, Lemke JR, Berger W, Neidhardt J. (2010). *ABCA4* and *ROM1*: Implications for modification of the *PRPH2*-associated macular dystrophy phenotype. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51: 4253–4265.

Primignani P, Allegrini D, Manfredini E, Romitti L, Mauri L, Patrosso MC, Veniani E, Franzoni A, Del Longo A, Gesu GP, Piozzi E, Damante G, Penco S (2016) Screening of *PAX6* gene in Italian congenital aniridia patients revealed four novel mutations. *Ophthalmic Genet* 6810, 1–7.

Prosser J & van Heyninen V (1998) *PAX6* mutations reviewed. *Hum Mutat* 11(2):93-108.

Qin L, Wang J, Tian X, Yu H, Truong C, Mitchell JJ, Wierenga KJ, Craigen WJ, Zhang VW, Wong LC (2016) Detection and Quantification of Mosaic Mutations in Disease Genes by Next-Generation Sequencing. *J Mol Diagn* 18: 446-453.

Quiring R, Walldorf U, Kloter U, Gehring W (1994) Homology of the eyeless gene of *Drosophila* to the Small eye gene in mice and Aniridia in humans. *Science* 265(5173), 785–789.

Ramaesh T, Collinson JM, Ramaesh K, Kaufman MH, West JD, Dhillon B (2003) Corneal abnormalities in *Pax6*^{+/-} small eye mice mimic human aniridia-related keratopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*44, 1871-1878.

Ramaesh T, Ramaesh K, Leask R, Springbett A, Riley SC, Dhillon B, West JD (2006) Increased apoptosis and abnormal wound-healing responses in the heterozygous *Pax6*^{+/-} mouse cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47, 1911-1917.

Redeker EJ, de Visser AS, Bergen AA, Mannens MM (2008) Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) enhances the molecular diagnosis of aniridia and related disorders. *Mol Vis* 14, 836–840.

Reis LM, Tyler RC, Muheisen S, Raggio V, Salviati L, Han DP, Costakos D, Yonath H, Hall S, Power P, Semina EV (2013) Whole exome sequencing in dominant cataract identifies a new causative factor, *CRYBA2*, and a variety of novel alleles in known genes. *Hum Genet* 132: 761-770.

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.

Richter L, Flodman P, Barria von-Bischhoffshausen F, Burch D, Brown S, Nguyen L, Turner J, Spence MA, Bateman JB (2008) Clinical variability of autosomal dominant cataract, microcornea and corneal opacity and novel mutation in the alpha A crystallin gene (*CRYAA*). *Am J Med Genet* 146A: 833-842.

Rivolta C, Sharon D, DeAngelis MM, Dryja TP (2002) Retinitis pigmentosa and allied diseases: Numerous diseases, genes, and inheritance patterns. *Hum Mol Genet* 11: 1219–1227.

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

Santhiya ST, Soker T, Klopp N, Illig T, Prakash MVS, Selvaraj B, Gopinath PM, Graw J (2006) Identification of a novel, putative cataract-causing allele in *CRYAA* (G98R) in an Indian family. *Mol Vis* 12: 768-773.

Santhiya ST, Kumar GS, Sudhakar P, Gupta N, Klopp N, Illing t, SökerT, Groth M, Platzer M, Gopinath PM, Graw J (2010) Molecular analysis of cataract families in India: new mutations in the CRYBB2 and GJA3 gene and rare polymorphisms. *Mol Vis* 16:1837-47.

Schäffer AA (2013) Digenic inheritance in medical genetics. *J Med Genet* 50: 641–652.

Schanilec P & Biernacki R (2014) Aniridia : A Comparative Overview. *Am Orthopt J*. 64, 98–105.

Schey KL, Wang Z, L Wenke J, Qi Y (2014) Aquaporins in the eye: expression, function, and roles in ocular disease. *Biochim Biophys Acta* 1840(5):1513-23.

Schmidt-Sidor B, Szymanska K, Williamson KV, van Heyningen V, Roszkowski T, Wierzba-Bobrowicz T, Zaremba J (2009) Malformations of the brain in two fetuses with a compound heterozygosity for two PAX6 mutations. *Folia Neuropathol* 47(4), 372–382.

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

Shiels A & Hejtmancik JF (2013) Genetics of human cataract. *Clin Genet* 84(2), 120–127.

Simms CL, Thomas EN, Zaher HS (2016) Ribosome-based quality control of mRNA and nascent peptides. *Wiley Interdiscip Rev RNA*.

Simpson TI & Price DJ (2002) *Pax6*; a pleiotropic player in development. *BioEssays* 24(11), 1041–1051.

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.

Solomon BD, Pineda-Alvarez DE, Balog JZ, Hadley D, Gropman AL, Nandagopal R, Han JC, Hahn JS, Blain D, Brooks B, Muenke M (2010) 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.

Stenkamp DL (2015) Development of the Vertebrate Eye and Retina. *Prog Mol Biol Transl Sci* 134:397-414.

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.

Sun W, Xiao X, Li S, Guo X, Zhang Q (2011) Mutational screening of six genes in Chinese patients with congenital cataract and microcornea. *Mol Vis* 17:1508-13.

Takamiya M, Weger BD, Schindler S, Beil T, Yang L, Armant O, Ferg M, Schlunck G, Reinhard T, Dickmeis T, Rastegar S, Strähle U (2015) Molecular description of eye defects in the zebrafish *pax6b* mutant, sunrise, reveals a *pax6b*-dependent genetic network in the developing anterior chamber. *PLoS One* 10(2), 1–23.

Tang HK, Chao LY, Saunders GF (1997) Functional analysis of paired box missense mutations in the PAX6 gene. *Hum Mol Genet* 6(3):381-6.

Tomarev SI, Callaerts P, Kos L, Zinovieva R, Halder G, Gehring W, Piatigorsky J (1997) Squid Pax-6 and eye development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 2421-2426.

Ton CCT, Hirvonen H, Miwa H, Weil MM, Monaghan P, Jordan T, van Heyningen V, Hastie ND, Meijers-Heijboer H, Drechsler M, Saunders GF (1991) Positional cloning and characterization of a paired box- and homeobox-containing gene from the aniridia region. *Cell* 67(6), 1059–1074.

Trouvé P, Génin E, Férec C (2017) In silico search for modifier genes associated with pancreatic and liver disease in Cystic Fibrosis. *PLoS One* 12(3):e0173822

Tzoulaki I, White IM, Hanson IM (2005) *PAX6* mutations: genotype-phenotype correlations. *BMC Genet* 6(Mim 106210), 27.

Underhill DA (2012) PAX proteins and fables of their reconstruction. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 22, 161-177.

Vanita V, Singh JR, Hejtmancik JF, Nurnberg P, Hennies HC, Singh D, Sperling K (2006) A novel fan-shaped cataract-microcornea syndrome caused by a mutation of *CRYAA* in an Indian family. *Mol Vis* 12: 518-522.

Vachtenheim J & Drdová B (2003) A dominant negative mutant of microphthalmia transcription factor (MITF) lacking two transactivation domains suppresses transcription mediated by wild type MITF and a hyperactive MITF derivative. *Pigment Cell Res* 17(1):43-50.

Vasilyeva TA, Voskresenskaya AA, Käsmann-Kellner B, Khlebnikova OV, Pozdeyeva NA, Bayazutdinova GM, Kutsev SI, Ginter EK, Semina EV, Marakhonov AV, Zinchenko RA (2017) Molecular analysis of patients with aniridia in Russian Federation broadens the spectrum of *PAX6* mutations. *Clin Genet* 92(6), 639–644.

Verma RK, Gupta AB, Sankararamakrishnan R (2015) Major intrinsic protein superfamily: channels with unique structural features and diverse selectivity filters. *Methods Enzymol* 557:485-520.

Vincent MC, Gallai R, Olivier D, Speeg-Schatz C, Flament J, Calvas P, Dollfus H (2004) Variable phenotype related to a novel *PAX6* mutation (IVS4+5G>C) in a family presenting congenital nystagmus and foveal hypoplasia. *Am J Ophthalmol* 138(6), 1016–1021.

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.

Vo AH & McNally EM (2015) Modifier genes and their effects on Duchenne muscular dystrophy. *Curr Opin Neurol* 28(5):528-34.

Vuong L, Brobst DE, Saadi A, Ivanovic I, Al-Ubaidi MR (2012) Pattern of expression of p53, its family members, and regulators during early ocular development and in the post-mitotic retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 20;53(8):4821-31.

Walcher T, Xie Q, Sun J, Irmeler M, Beckers J, Öztürk T, Niessing D, Stoykova A, Cvekl A, Ninkovic J, Götz M (2013) Functional dissection of the paired domain of Pax6 reveals molecular mechanisms of coordinating neurogenesis and proliferation. *Development* 140, 1123-1136.

Wallace AS, Anderson RB (2011) Genetic interactions and modifier genes in Hirschsprung's disease. *World J Gastroenterol* 17(45):4937-44.

Walia S, Fishman GA, Swaroop A, Branham KEH, Lindemena M, Othman M, Weleber RG (2008) Discordant phenotypes in fraternal twins having an identical mutation in exon ORF15 of the *RPGR* gene. *Arch Ophthalmol* 126: 379–384.

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, 644–648.

Wang X, Gregory-Evans K, Wasan KM, Sivak O, Shan X, Gregory-Evans CY (2017) Efficacy of Postnatal In Vivo Nonsense Suppression Therapy in a *Pax6* Mouse Model of Aniridia. *Mol Ther Nucleic Acids* 7, 417–428.

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

Walther C, Guenet JL, Simon D, Deutsch U, Jostes B, Goulding MD, Plachov D, Balling R, Gruss P (1991) *Pax*: a murine multigene family of paired box-containing genes. *Genomics* 11: 424-434.

Weisschuh N, Wissinger B, Gramer E (2012) A splice site mutation in the *PAX6* gene which induces exon skipping causes autosomal dominant inherited aniridia. *Mol Vis* 18, 751–7.

Weleber RG, Carr RE, Murphey WH, Sheffield VC, Stone EM (1993) Phenotypic variation including retinitis pigmentosa, pattern dystrophy, and fundus flavimaculatus in a single family with a deletion of codon 153 or 154 of the peripherin/RDS gene. *Arch Ophthalmol* 111: 1531– 1542.

Wen J & Brogna S (2008) Nonsense-mediated mRNA decay. *Biochem Soc Trans* 36:514-6

Xu H, Rould MA, Xu W, Epstein JA, Maas RL, Pabo CO (1999) Crystal structure of the human Pax6 paired domain-DNA complex reveals specific roles for the linker region and carboxy-terminal subdomain in DNA binding. *Genes Dev* 13(10), 1263–1275.

Yokoi T, Nishina S, Fukami M, Ogata T, Hosono K, Hotta Y, Azuma N (2016) Genotype–phenotype correlation of *PAX6* gene mutations in aniridia. *Hum Genome Var* 3, 15052.

Yu Y, Yu Y, Chen P, Li J, Zhu Y, Zhai Y, Yao K (2014) A novel MIP gene mutation associated with autosomal dominant congenital cataracts in a Chinese family. *BMC Med Genet* 15:6.

Yun S, Saijoh Y, Hirokawa KE, Kopinke D, Murtaugh LC, Monuki ES, Levine EM (2009) *Lhx2* links the intrinsic and extrinsic factors that control optic cup formation. *Development* 136, 3895–3906.

Zhang Y & Emmons SW (1995) Specification of sense-organ identity by a *Caenorhabditis elegans Pax-6* homologue. *Nature* 377: 55-59.

Zhang W, Cveklova K, Oppermann B, Kantorow M, Cvekl A (2001) Quantitation of PAX6 and PAX6(5a) transcript levels in adult human lens, cornea, and monkey retina. *Mol Vis* 7:1-5.

Zhang X, Huang CT, Chen J, Pankratz MT, Xi J, Li J, Yang Y, Lavaute TM, Li XJ, Ayala M, Bondarenko GI, Du ZW, Jin Y, Golos TG, Zhang SC (2010) *Pax6* is a human neuroectoderm cell fate determinant. *Cell Stem Cell* 7, 90-100.

Zhang X, Wang L, Wang J, Dong B, Li Y (2012) Coralliform cataract caused by a novel connexin46 (*GJA3*) mutation in a Chinese family. *Mol Vis* 18: 203-210.

Zhang Y, Zhang X, Lu H (2014) Aberrant activation of *p53* due to loss of *MDM2* or *MDMX* causes early lens dysmorphogenesis. *Dev Biol* 1;396(1):19-30.

Zhang R, Linpeng S, Wei X, Li H, Huang Y, Guo J, Wu Q, Liang S, Wu L (2017) Novel variants in *PAX6* gene caused congenital aniridia in two Chinese families. *Eye (Lond)* (6):956-961.

Zhao S, Chen Q, Hung FC, Overbeek PA (2002) *BMP* signaling is required for development of the ciliary body. *Development* 129, 4435–4442.

Zhou D, Ji H, Wei Z, Guo L, Li Y, Wang T, Zhu Y, Dong X, Wang Y, He L, Xing Q, Zhang L (2013) A novel insertional mutation in the connexin 46 (gap junction alpha 3) gene associated with autosomal dominant congenital cataract in a Chinese family. *Mol Vis* 19:789-95.

CAPÍTULO X – RECURSOS ONLINE

10. RECURSOS ONLINE

Comparative Toxicogenomics Databases (CTD)

<http://ctdbase.org> (Outubro, 2017)

Gene Ontology Consortium (GO)

<http://www.geneontology.org/> (Novembro, 2017)

Human Genome Epidemiology Encyclopedia (HuGE Navigator)

www.cdc.gov/genomics/hugenet/hugenavigator.htm (Outubro, 2017)

Leiden Open Variation Databases (LOVD)

http://lsdb.hgu.mrc.ac.uk/home.php?select_db=PAX6 (Novembro, 2017)

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)

<https://www.omim.org> (Novembro, 2017)

Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes and Proteins

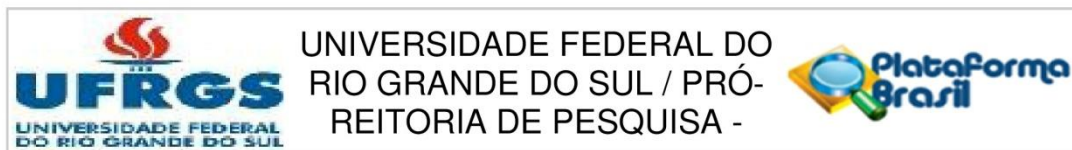
<https://string-db.org> (Outubro, 2017)

Venny 2.1

<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/> (Outubro, 2017)

CAPÍTULO XI - ANEXOS

11.1. ANEXO I – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa



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@propeq.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

11.2. ANEXO II – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Adulto)

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 a confidencialidade das informações obtidas. As análises dos fatores genéticos será feita 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 o risco de contaminação e desconforto com a coleta é mínimo. O presente estudo apresenta outros riscos como quebra de confidencialidade e privacidade. No entanto, há garantias fornecidas pelo coordenador do estudo de que estes danos serão evitados.

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 contatadas 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 à qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida a cerca da pesquisa. Também tem liberdade de não participar do estudo ou de mudar de idéia 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: _____

11.3. ANEXO III – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Criança e Adolescente)

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 será feita 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 o risco de contaminação e desconforto com a coleta é mínimo. O presente estudo apresenta outros riscos como quebra de confidencialidade e privacidade. No entanto, há garantias fornecidas pelo coordenador do estudo de que estes danos serão evitados.

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 contatadas 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 à qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida a cerca da pesquisa. Também tem liberdade de não participar do estudo ou de mudar de idéia mesmo depois de ter concordado.

B. Consentimentos dados pelos pais (ou tutor legal) pela 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 oftalmol

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 copia 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: _____