

# UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



**Emerson Salvador de Souza França**

## **“Análise de Mutações e Polimorfismos no Gene *PAX6* em Pacientes com Aniridia e Síndrome de Morning-Glory”**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) EMERSON SALVADOR DE SOUZA FRANÇA e aprovada pela Comissão Julgadora Maricilda Palandi de Mello

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética Animal e Evolução.

Orientadora: Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello  
Co-Orientadora: Profa. Dra. Mônica Barbosa de Melo  
Co-Orientadora: Dra. Fernanda Caroline Soardi

Campinas, 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

**F844a**

França, Emerson Salvador de Souza  
Análise de mutações e polimorfismos no gene PAX6 em  
pacientes com aniridia e síndrome de Morning Glory /  
Emerson Salvador de Souza França. – Campinas, SP:  
[s.n.], 2009.

Orientadores: Maricilda Palandi de Mello, Mônica  
Barbosa de Melo, Fernanda Caroline Soardi.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de  
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Gene PAX6. 2. Aniridia. 3. Síndrome *Morning  
Glory*. 4. Mutação (Biologia). 5. Polimorfismo  
(Genética). I. Mello, Maricilda Palandi de. II. Melo,  
Mônica Barbosa de. III. Soardi, Fernanda Caroline. IV.  
Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.  
V. Título.

(rcdt/ib)

**Título em inglês:** Mutations and polymorphisms analysis in PAX6 gene of patients with Aniridia and Morning Glory Syndrome.

**Palavras-chave em inglês:** PAX6 gene; Aniridia; Morning Glory Syndrome; Mutation (Biology); Polymorphism (Genetics).

**Área de concentração:** Genética Animal e Evolução.

**Titulação:** Mestre em Genética e Biologia Molecular.

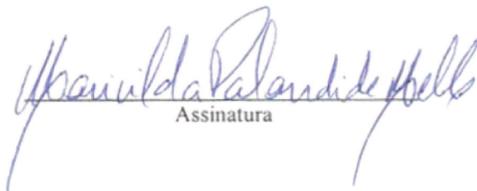
**Banca examinadora:** Maricilda Palandi de Mello, Maria Isabel de Souza Aranha Melaragno, Fabiana Alexandrino.

**Data da defesa:** 07/08/2009.

**Programa de Pós-Graduação:** Genética e Biologia Molecular.

**BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra .Maricilda Palandi de Mello

  
Assinatura

Profa. Dra. Maria Isabel de Souza Aranha Melaragno

  
Assinatura

Dra . Fabiana Alexandrino

  
Assinatura

Prof. Dr . Carlos Eduardo Steiner

---

  
Assinatura

Profa. Dra . Laura Maria MariscalOttoni

---

  
Assinatura

**À minha mãe Maria Aparecida de Souza**

## AGRADECIMENTOS

---

Gostaria de agradecer à professora Maricilda por me receber tão bem no laboratório. Agradeço também pela confiança ao longo do desenvolvimento deste projeto.

À Fernanda Soardi (Fer 2), minha co-orientadora. Obrigado pelas broncas e cobranças. Agradeço também pela ajuda nas correções de relatórios, artigo e tese.

À Fernanda Coeli (Fer 3) e a Carol Lincoln por me ensinar a lidar com o elefante, mesmo quando ele te entrega uma bomba.

À Mônica Barbosa de Melo, minha co-orientadora pela ajuda no decorrer do projeto. Aos membros da banca por aceitarem meu convite.

Aos colegas José Luiz (Zélo), Paulo (Neb) e Diego (Didi) pelos momentos de divertimento e conversas aleatórias.

Às minhas discípulas e fiéis ajudantes Daiane (Dai) e Ana Carolina (Xuxa). Muito obrigado pela suportarem minha exploração.

Aos colegas de trabalho Ana Letícia (Ervilha), Carol Bondarik (Carolzinha), Débora, Denise, Flávia (Flor), Juliana Gabriel, Juliana (Magali), Mara, Milena, Regiane, Reginaldo (Rêgi), Renan, Rodrigo, Rose, Uiara e Victor.

Aos alunos da professora Edi: Bruna, Carol Svidnicki (Carol Paraná), Daniel (Dany Boy), Flávia (Elfo), Francine (Fran), Gleice, Jéssica, Nathália (Graviola), Paula, Priscila Zonzini (Pri), Priscila 2, Sueli, Thalita, Vanessa (Van) e Vanessa 2 (Vanessinha).

Aos colegas da Grandiosa Mansão Subako de Kobra: Adriano (Mandrake), Augusto (Kid), Bruno (Portuga), Diogo (Reverta), Edson (Menga), Erich, Guilherme (Kbça), Gustavo

(Amizade), Luis Eduardo (Wando), Marco (Remédio), Marcos (Borghe), Marcos (Toty), Roger (Skol), Tiago (Banana) e Tiago (Padre).

À minha família, principalmente a minha tia Arlete que tanto me ajudou durante o tempo que moro em Campinas.

À minha namorada Marjory, por me suportar durante os períodos de tensão pré-qualificação/relatórios/pré-banca/tese. Obrigado ainda por dividir comigo a sua família. Te amo Laninha.

Obrigado Dirlei, Marusha, Marlise. Obrigado Elza Schiavone Marcello por ser minha segunda mãe, sentirei sempre sua falta.

E por último, porém a pessoa mais importante de todas, eu agradeço à minha mãe. Maria Aparecida de Souza (Cidinha, dona Cida, mas para mim simplesmente mãe). Queria agradecer-lá por tanta coisa, mas seria necessário escrever uma nova tese para conseguir isso e mesmo assim não explicitaria toda minha gratidão por tudo que essa guerreira fez por mim. Mãezinha, te amo mais que tudo.

**SUMÁRIO**

---

<b>ABREVIATURAS</b>	<b>ix</b>
<b>RESUMO</b>	<b>xi</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>xiv</b>
<b>I- INTRODUÇÃO</b>	<b>17</b>
<b>II- OBJETIVOS</b>	<b>38</b>
<b>III- CASUÍSTICA</b>	<b>40</b>
<b>IV- MÉTODOS</b>	<b>45</b>
4.1- Obtenção das amostras de DNA	46
4.2- Extração de DNA genômico a partir de sangue total periférico	46
4.3- Quantificação do DNA genômico extraído	47
4.4- Verificação da integridade do DNA genômico extraído	48
4.5- Amplificação de fragmentos de DNA por reação de polimerase em cadeia – PCR	48
4.6- Amplificação do gene <i>PAX6</i>	49
4.7- Reação de seqüenciamento	51
4.8- Reação de <i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i> – <i>MLPA</i>	53
4.8.1- Amostra inicial	54
4.8.2- Técnica de <i>MLPA</i>	54
4.8.3- Desnaturação do DNA genômico e hibridização com sondas <i>SALSA MLPA</i>	55
4.8.4- Reação de Ligação	55
4.8.5- Reações da PCR Multiplex	55
4.8.6- Separação dos produtos amplificados por eletroforese capilar	57
4.8.7- Análise dos dados obtidos por <i>MLPA</i>	57
<b>V- RESULTADOS</b>	<b>59</b>
5.1- Mutação p.R240X	60
5.2- Alterações não descritas na literatura	61
5.3- SNPs descritos na literatura	63

5.4- Análise de MLPA ( <i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i> )	72
5.4.1- Alteração do gene <i>RCN1</i>	72
5.4.2- Alteração do gene <i>ELP4</i>	74
<b>VI- DISCUSSÃO</b>	<b>77</b>
6.1- Mutação p.R240X	78
6.2- Alterações não descritas	80
6.2.1- Alteração g.12083A>G e g.18914C>A	80
6.2.2- Alteração g.19207C>A e g.20130T>C	80
6.2.3- Alteração g.20902_20903insA	81
6.2.4- Alteração IVS11+33T>A	81
6.3- SNPs ( <i>single nucleotide polymorphisms</i> )	82
6.3.1- SNP – rs56139994 (IVS2+9G>A)	82
6.3.2- SNP – rs7936522	83
6.3.3- SNP - rs694617, SNP – rs5790867, SNP – rs3026368 e SNP – rs3026369	84
6.3.4- Repetições TG	85
6.3.5- SNP-rs2239789	88
6.3.6- SNP-rs667773	88
6.3.7SNP–3026393	88
6.4- Deleções – MLPA	89
<b>VII- CONCLUSÕES</b>	<b>92</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>95</b>
<b>ANEXO 1</b>	<b>109</b>
<b>ANEXO 2</b>	<b>111</b>
<b>ANEXO 3</b>	<b>113</b>

# ABREVIATURAS

CBMEG: Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética

CE: elemento conservado (do inglês *conserved element*)

EDTA- ácido etilenodiaminotetracético

FISH: do inglês *Fluorescent In Situ Hybridization*

g. - posição gênica

Sey- do inglês *small eye*

HB: do inglês *Homeobox*

HD: do inglês *homeo domain*

HMG- do inglês *High Mobility Group*

IVS- do inglês *intervening sequence*

LNK: segmento de ligação do gene *PAX6* entre o *paired domain* e o *homeodomain*

MGS: síndrome de *Morning Glory* (do inglês *Morning Glory Syndrome*)

MLPA: do inglês *Multiplex Ligation Probe-dependent Amplification*

p.- posição do aminoácido na proteína

pb: pares de bases

PB: do inglês *paired box*

PCR: reação em cadeia da polimerase (do inglês *Polymerase Chain Reaction*)

PD: do inglês *paired domain*

PST: região C-terminal do gene *PAX6* rica em aminoácidos prolina, serina e treonina

PTT: teste de proteína truncada (do inglês *protein truncation test*)

SNP- do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*

SSCP: do inglês *Single Strand Conformation Polymorphism*

STR: do inglês *short tandem repeat*

UERJ: Universidade Estadual do Rio de Janeiro

UFU: Universidade Estadual de Uberlândia

UNICAMP: Universidade Estadual de Campinas

UNIFESP/EPM: Universidade Federal de São Paulo/Escola Paulista de Medicina

# RESUMO

O gene *PAX6* é o principal gene para o controle da organização do sistema ocular durante a embriogênese. Este gene pertence a uma família de reguladores de transcrição denominada PAX, sendo que seus membros compartilham um domínio funcional de 128 aminoácidos chamado de *paired domain*. O *PAX6* é o mais bem estudado dessa família. O gene *PAX6* está localizado na banda 13 do braço curto do cromossomo 11 em humanos, e apresenta 14 *exons* sendo que os três primeiros e parte do quarto *exon* não são traduzidos. A proteína do *PAX6* possui dois domínios funcionais: o *paired domain* e o *homeo domain*, que são separados por um segmento de ligação denominado LNK e seguidos por uma região com importante função na ativação transcricional denominada PST. A proteína do gene *PAX6* é um fator de regulação transcricional altamente conservado com funções importantes para o desenvolvimento normal dos olhos e do sistema nervoso. Alterações no gene *PAX6* em humanos foram associadas ao fenótipo de aniridia, da síndrome de *Morning Glory (MGS)* e também de doenças associadas ao desenvolvimento ocular. A aniridia é um defeito congênito raro, a qual provoca uma formação incompleta ou a ausência da íris. Embora seus efeitos variem entre os indivíduos, pode causar perda de visão. A doença pode ser de herança autossômica dominante ou de manifestação esporádica. *MGS* é uma anomalia congênita do nervo óptico, comumente unilateral, podendo encontrar-se associada a estrabismo, ambliopia e nistagmo. Frequentemente essa síndrome pode encontrar-se associada a anomalias endócrinas, renais e do sistema nervoso central. Sendo assim, o projeto teve por objetivos a análise molecular do gene *PAX6* através de seqüenciamento e da técnica de MLPA em pacientes com aniridia e pacientes portadores da síndrome de *MGS*, a fim de se detectar mutações e/ou polimorfismos que pudessem estar ligados ao quadro clínico dos indivíduos. A casuística do projeto foi de três famílias com segregação aniridia, um indivíduo esporádico com aniridia e quatro indivíduos portadores da síndrome de *Morning Glory*. O grupo controle consistiu de 50 indivíduos triados como não tendo alterações oftalmológicas. Foi encontrada uma mutação p.R240X no gene *PAX6*, que causa uma troca de uma arginina por um *stop codon*, segregando nos indivíduos afetados da

Família 1 e assim explicando o fenótipo dos indivíduos. Essa mutação é a mais freqüente associada à aniridia, porém é a primeira vez que ela foi descrita na população brasileira. Também foram encontradas diversas alterações descritas e não descritas que necessitam de mais estudos para que possam ser associadas à manifestação do fenótipo dos indivíduos afetados. Além disso, foi observada pela técnica de MLPA, uma possível micro-deleção ou alteração nucleotídica no *exon 1* do gene *RCN1* encontrada nos filhos das Famílias 1 e 3 podendo estar envolvida na regulação 5' do gene *PAX6*. Outra possível micro-deleção ou alteração nucleotídica foi também observada no *exon 9* do gene *ELP4*, que pode estar associada a regulação 3' do gene *PAX6*. Esse estudo demonstrou que para a etiologia de aniridia e síndrome Morning Glory devem existir outros genes cuja expressão possa estar alterada durante o desenvolvimento.

# ABSTRACT

*PAX6* gene is the major gene in the control of eye organization during development. It belongs to a family of transcription regulators called PAX, formed by several members which share a 128 aminoacid functional domain called paired domain. *PAX6* is best studied within this family. In humans, it is located on chromosome 11p13 and is formed by 14 exons; the first three and part of the fourth are not translated. *PAX6* protein comprises two functional domains: the paired domain and the homeo domain which are separated by a linker called LNK and followed by an important region with transcriptional activity called PST. The *PAX6* protein is a highly conserved transcriptional regulator factor that is important for normal ocular and neural development. Mutations on human *PAX6* gene were associated to aniridia, Morning Glory Syndrome and other ocular diseases. Aniridia is rare birth defect which leads to an incomplete formation or the absence of the iris. Although their effects vary between individual, aniridia can cause loss of vision. The disease may be autosomal dominant or sporadic event. The Morning Glory Syndrome (MGS) is a congenital optic disk dysplasia, generally unilateral, which can be associated with strabismus, amblyopia and nystagmus. This syndrome may be often associated with endocrine, renal and central nervous system abnormalities. Thus the aim of this investigation was to evaluate the molecular composition of *PAX6* gene using direct sequencing and MLPA technique in patients with Aniridia and Morning Glory Syndrome, to detect mutations and/or polymorphisms associated with the patient's phenotypes. Were included in the study 1 family with segregation of aniridia, 1 family with Axenfeld-Rieger Syndrome, 1 sporadic individual with aniridia and 4 individuals carrying MGS. The control group comprised 50 individuals considered ophthalmologically normal. The nonsense mutation p.R240X was found in the *PAX6* gene, segregating with the affected members in family 1, what explains their phenotypes. This mutation is one of the most frequent nonsense mutations associated with the aniridia, however this is the first report on a *PAX6* gene mutation familial case of aniridia in Brazil. Several described and non-described nucleotide variations were found, but additional studies are required to correlate them to the

phenotype of affected individuals. Furthermore, the MLPA technique showed possible micro-deletions or mutations in exon 1 of *RCN1* gene, located 5' to *PAX6*. This result was observed in both male children of families 1 and 3. Other possible micro-deletion or mutation was observed in exon 9 of *ELP4* gene, which can be associated to 3' regulation of *PAX6* gene. This study demonstrated that the involvement of other gene whose expressions may be altered during the development cannot be excluded for the etiology of aniridia and Morning Glory Syndrome.

# I- INTRODUÇÃO

Os genes *PAX* fazem parte de uma grande família de reguladores de transcrição. As proteínas codificadas por esses genes caracterizam-se por compartilhar um domínio de 128 aminoácidos de ligação ao DNA (*paired box*) e são os principais controladores dos processos de desenvolvimento, especialmente do desenvolvimento do sistema nervoso central tanto em vertebrados quanto em invertebrados. Nove membros da família são conhecidos em camundongos e humanos, dos quais o *PAX6* é um dos mais estudados (Wang *et al.*, 2008). Os genes *PAX* dividem-se em quatro sub-famílias de acordo com a presença ou ausência de um octapeptídeo e do *homeobox* e também pelo tipo do *homeobox* como mostra a Figura 1.

Uma característica comum entre todas as proteínas Pax é um *paired-domain* (PD) N-terminal, que compreende um motivo de ligação ao DNA que reconhece uma seqüência consenso específica, (G/T)T(T/C)(C/A)(C/T)(G/C)(G/C) (Lang *et al.*, 2007), sendo que o *PAX6* se liga especificamente ao motivo (TTCACGC).

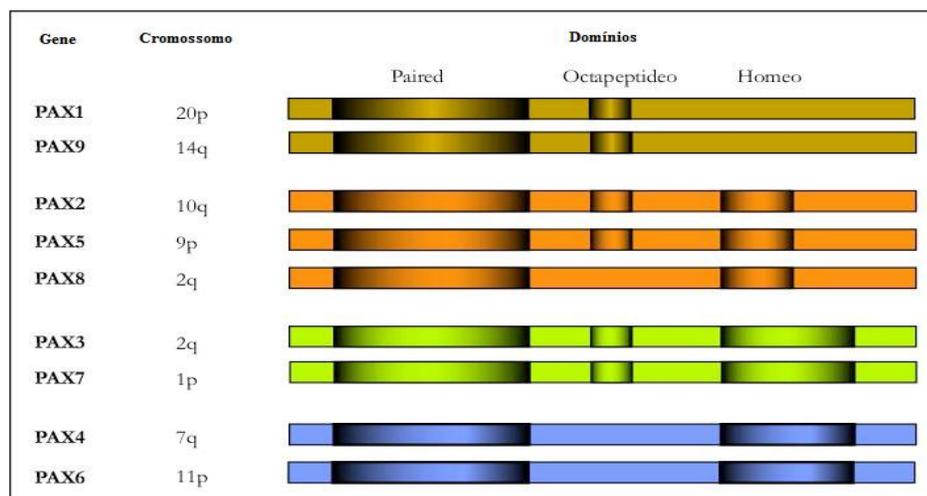


Figura 1: Estrutura modular dos membros da família PAX. Todos os membros dessa família compartilham um domínio de ligação ao DNA de 128 aminoácidos denominado *paired-box*. Essa família é dividida em quatro grupos: I (PAX1/9), II (PAX2/5/8), III (PAX3/7) e IV (PAX4/6). Os três primeiros grupos possuem um octapeptídeo, e apenas os grupos III e IV possuem um homeodomínio. O grupo II apresenta um homeodomínio parcial (retirado de Béland e Bouchard, 2006).

Todos os genes *PAX* estão envolvidos com o desenvolvimento embrionário e a maioria para de se expressar ao nascimento. Cada subfamília forma uma rede complexa de regulação de transcrição sendo que o *PAX6*, além de regular vários genes, também pode se auto-regular, como mostra o esquema abaixo (Figura 2).

A família gênica *Pax* codifica um conjunto de fatores de transcrição que compartilham um *paired-domain*, que desempenham papel essencial regulando a proliferação, diferenciação, apoptose, migração celular e manutenção de células-tronco. A expressão dos genes *Pax* é fortemente controlada e está associada com a demarcação de fronteiras durante a especificação e o desenvolvimento tecidual. Auto-regulação e inter-regulação são mecanismos frequentemente empregados para realizar um controle preciso da expressão dos domínios *Pax* em uma variedade de tecidos incluindo o olho, o sistema nervoso central, os rins, o pâncreas, o sistema esquelético, os músculos, os dentes e o timo.

Mutações nos genes *PAX* causam distúrbios que envolvem o desenvolvimento incompleto de tecidos em que um determinado gene *PAX* é expresso. Além disso, a superexpressão de genes *PAX* foi observada em uma variedade de cânceres. Acredita-se que a função de proteção celular dos genes *PAX* possa evitar a morte celular e permitir o crescimento tumoral.

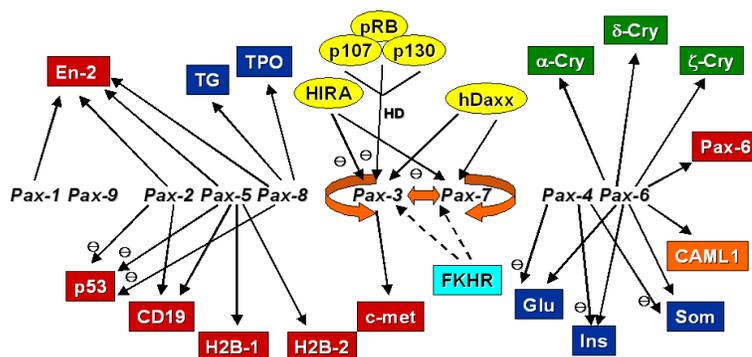


Figura 2: Esquema demonstrando as interações dos vários membros da família *PAX*. Além de interagir com outros genes o *PAX6* pode se auto-regular (retirado de <http://www.gene-regulation.com/images/relation.png>).

O *PAX6* tem sido considerado como o principal gene para o controle da organização do sistema ocular. Uma proposta de origem monofilética sugere ser ele o responsável pelo desenvolvimento do olho de insetos, ocelos de acídias e também por olhos complexos de cefalópodes e vertebrados (Halder *et al.*, 1995; Gehring, 1996) (Figura 3). De acordo com pesquisas recentes, deficiências no gene *PAX6* resultam não apenas em anormalidades do olho, mas possivelmente do cérebro e do pâncreas (Glaser *et al.*, 1994; Talamillo *et al.*, 2003; Yasuda *et al.*, 2002; Fischbach *et al.*, 2005).

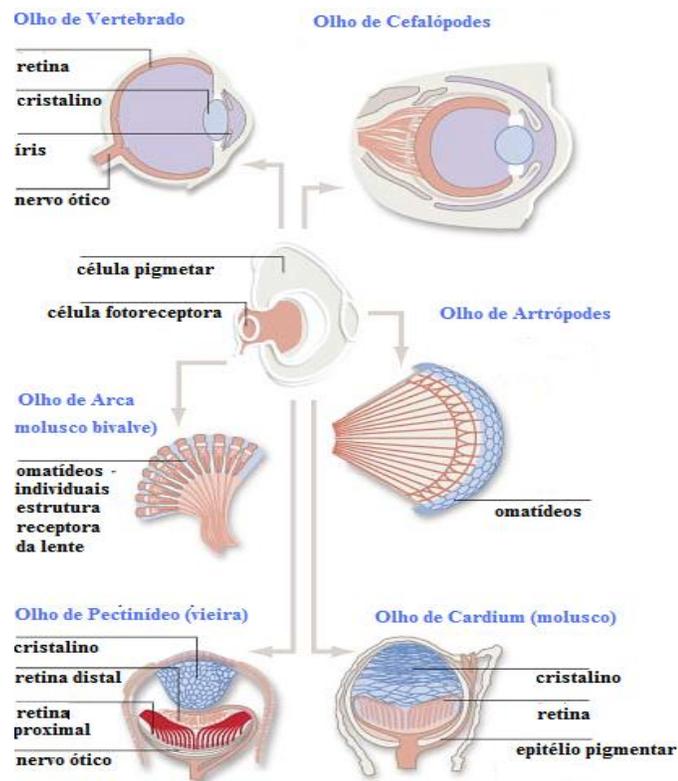


Figura 3: Propõe-se que o olho tenha evoluído em 65 ocasiões diferentes, porém evidências genéticas recentes sugerem que isso ocorreu apenas uma vez na história evolutiva. Um olho ancestral (centro da figura) teria dado origem às diversas formas de olhos atuais (adaptado de:

<http://www.newscientist.com/data/images/archive/2494/24941701.jpg>).

Logo após a identificação do *Pax6* em camundongos, o homólogo *PAX6* humano foi isolado por clonagem posicional como candidato ao gene responsável por

uma anomalia do olho humano, a aniridia (Ton *et al.*, 1991). O fenótipo *Small eye* em camundongos já havia sido considerado como uma condição similar à aniridia humana, através de dados de mapeamento (Glaser *et al.*, 1990). Tanto a aniridia quanto o *Small eye* têm em comum a herança autossômica dominante e o fenótipo compreendendo hipoplasia da íris e opacificação da córnea com freqüente associação à catarata. Em camundongos esses fenótipos são acompanhados da redução do tamanho do olho, a chamada microftalmia (Figura 4).

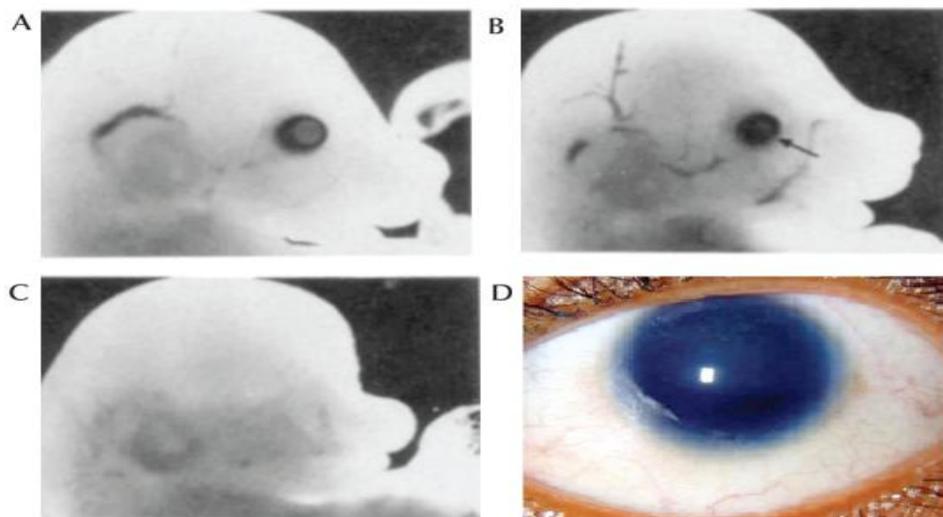


Figura 4: O gene *Pax6* controla o desenvolvimento do olho em diversas espécies. (A) Embrião de camundongo *wild-type* com o olho normal. (B) Embrião heterozigoto de um alelo mutante do *Pax6* (a condição causada é chamada de *Small-eye [Sey]* em camundongos) que apresenta o olho com tamanho reduzido. (C) Um embrião homozigoto para a mutação *Sey*, no qual os olhos, juntamente com o nariz estão completamente ausentes. (D) Humanos heterozigotos para mutações no *PAX6* podem apresentar uma condição chamada aniridia, que tem como uma de suas características principais a mal formação ou ausência da íris (modificado de Halder *et al.*, 2005 e Gehring, 2005).

Uma vez que o *PAX6* foi identificado como gene candidato para a aniridia em humanos e, por analogia, para *Small eye* em camundongos, mutações de ponto nesse gene foram identificadas em indivíduos com este fenótipo. A primeira mutação no *Pax6* foi definida em dois alelos *Small eye* de camundongo (Hill *et al.*, 1991). Subseqüentemente, foram identificadas mutações em pacientes com aniridia (Jordan *et al.*, 1992; Glaser *et al.*, 1992). Camundongos homocigotos para *Small eye* morrem pouco depois do nascimento e não desenvolvem olhos, nem cavidades nasais, além de apresentarem defeitos cerebrais (Hill *et al.*, 1991). Mutantes homocigotos humanos de mutações no gene *PAX6* apresentam um fenótipo parecido em recém-nascidos, com completa ausência de olhos e das aberturas nasais (Figura 5) (Hodgson e Saunders, 1980; Glaser *et al.*, 1994).

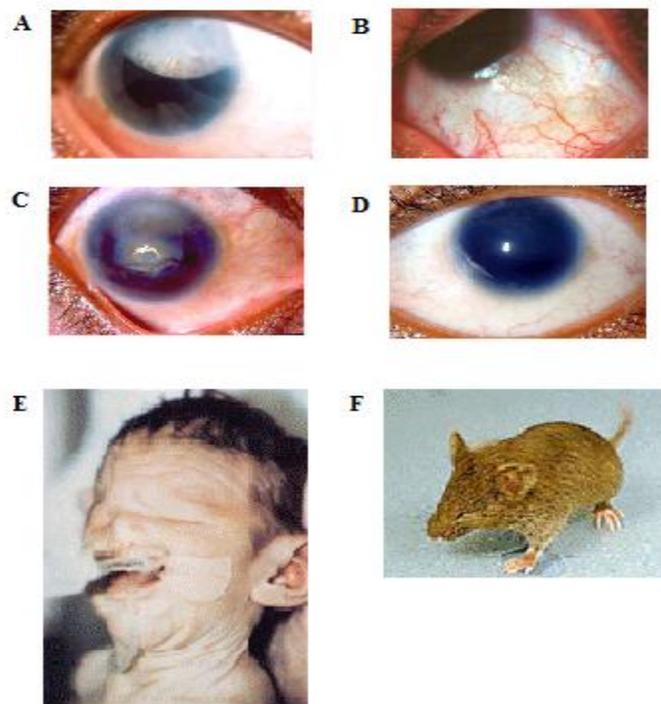


Figura 5: A, B, C e D apresentam aniridia com as seguintes associações - (A) esclerocórnea e nistagmo, (B) hipoplasia foveal, (C) microcórnea e catarata e (D) lente ectópica. (E) Apresenta um indivíduo com ausência dos olhos e cavidades nasais. (F) Camundongo sem os olhos.

O padrão de expressão deste gene em mamíferos é principalmente estudado em camundongos. A primeira evidência de sua atividade é detectada na neuroectoderme no oitavo dia do desenvolvimento embrionário. Com 8,5 dias, a expressão já é observada em uma depressão do prosencéfalo, que eventualmente dará ascensão ao copo óptico. Subseqüentemente, a expressão é vista no nariz e olhos em desenvolvimento e em regiões específicas do prosencéfalo, rombencéfalo e tubo neural (Haubst *et al.*, 2004; Grindley *et al.*, 1995; Walther *et al.*, 1991). No adulto, a expressão tem sido observada no olho, cerebelo e pâncreas (Ton *et al.*, 1992; Turque *et al.*, 1991; Stoykova e Gruss, 1994).

Genes homólogos ao *PAX6* humano foram identificados em ratos e outros vertebrados como peixe-zebra ou paulistinha (*Brachydanio rerio*), codorna (*Coturnix coturnix*), galinha (*Gallus gallus*), sapo (*Xenopus laevis*) e, também nos invertebrados: ouriço do mar (*Paracentrotus lividus*), mosca (*Drosophila melanogaster*), verme (*Caenorhabditis elegans*), verme (*Lineus sanguineus*), planária (*Dugesia tigrina*), lula (*Loligo opalescens*) e ascídia (*Phallusia mammilata*) (Prosser e Heyningen, 1998).

Baseadas nos conhecimentos atuais sobre o gene *PAX6*, duas hipóteses são consideradas para seu possível papel no desenvolvimento. Uma propõe ser esse o gene responsável pela organogênese e pela regulação do desenvolvimento do olho, enquanto a outra, o vê como um gene modulador, expresso na cabeça, freqüentemente auxiliando na regulação do desenvolvimento do olho, possivelmente por ser a cabeça a região onde os olhos evoluíram na maioria dos animais (Harris, 1997). Não existem evidências suficientes para definir qual hipótese é correta, entretanto sabe-se que o gene *PAX6* tem um papel fundamental no desenvolvimento dos olhos em diversos organismos.

Localizado no cromossomo 11p13 em humanos, esse gene é transcrito da fita antissense cuja fita sense é transcrito os genes *ELP4*, *RCN1* e *WT1* que são seus vizinhos mais próximos. O *PAX6* apresenta 14 *exons* numa extensão genômica de 23 kb e seu cDNA é de 2,7 kb, determinado por estudo de *Northern Blotting* (Prosser e Heyningen, 1998) (Figura 6). Sua transcrição pode dar origem a uma gama de nove transcritos diferentes devido a *splicings* alternativos, sendo que os três primeiros *exons* e uma parte do quarto não são traduzidos (Figura 7).

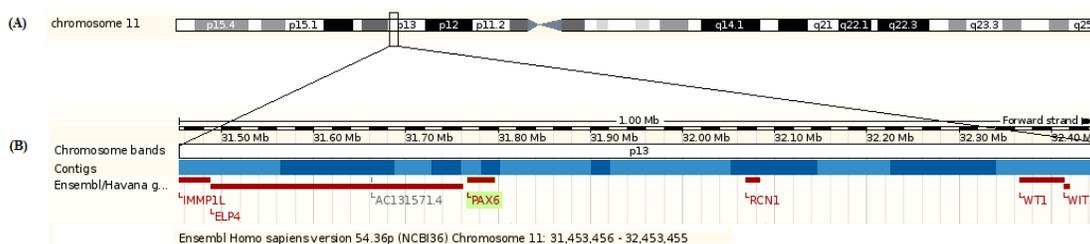


Figura 6: Estrutura do cromossomo 11 humano (A). Em detalhe parte da banda 13 do cromossomo 11, mostrando os genes *PAX6*, *ELP4*, *RCN1* e *WT1*.

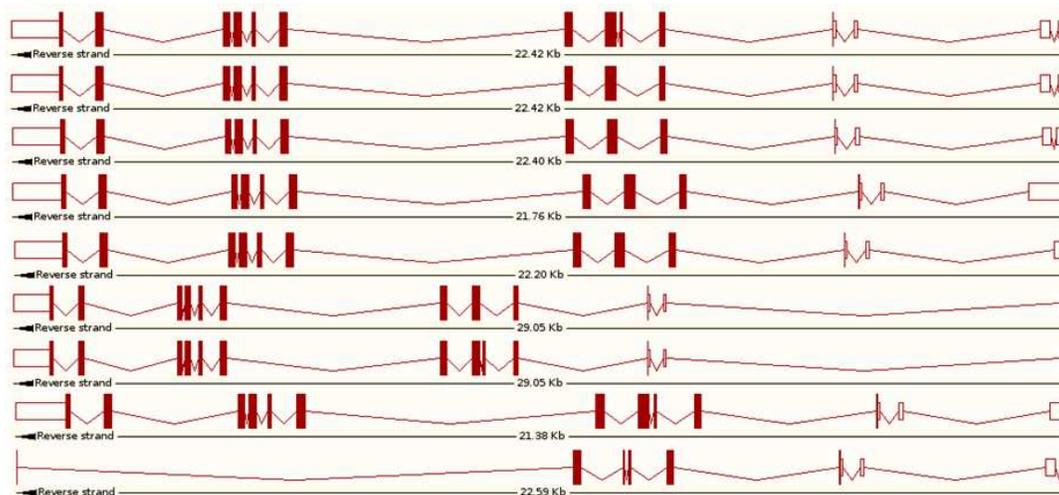


Figura 7: Ilustração dos nove transcritos diferentes gene do *PAX6* produzidos por *splicings* alternativos. Os três primeiros *exons* e parte do quarto não são traduzidos.

A proteína do *PAX6* humana tem 422-436 aminoácidos, dependendo da inclusão ou não de um *exon* alternativo. Possui dois domínios funcionais: o *paired domain* (PD) que é composto por 128 aminoácidos (códon 4-131) e o outro é o *homeodomain* (HD) de 60 aminoácidos (códon 210-269). Esses domínios são separados por um segmento de ligação (LNK) de 78 aminoácidos (códon 132-209) e seguido por 153 aminoácidos (códon 270-422) ricos em prolina, serina e treonina na região C-terminal (PST) com importante função na ativação transcricional, uma vez que alterações dessa região podem apresentar tanto uma atividade negativa, quanto positiva (Figura 8) (Glaser *et al.*, 1994; Glardon *et al.*, 1997; Prosser e Heyningen, 1998; Tzoulaki *et al.*, 2005).

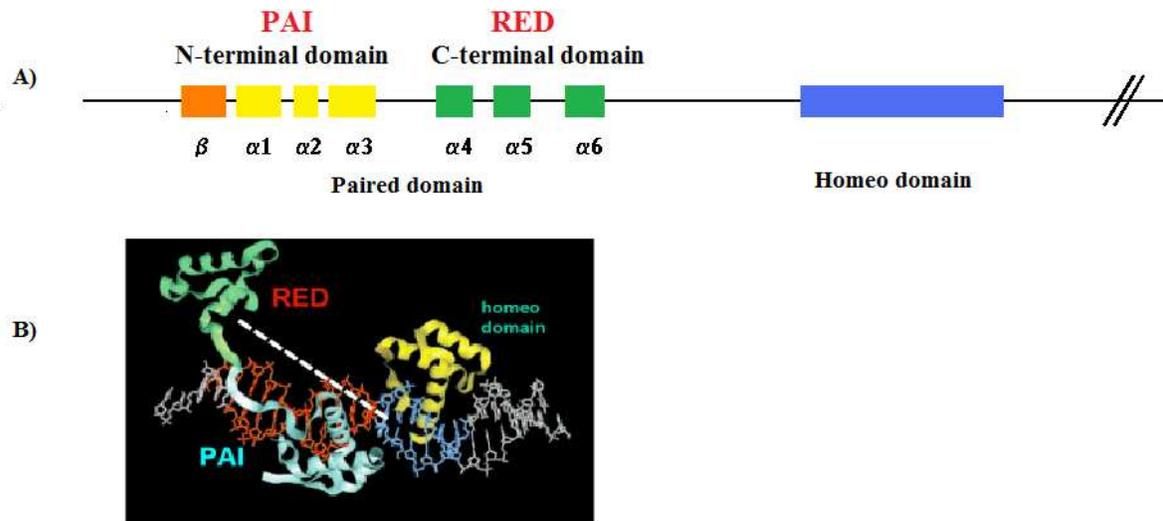


Figura 8: Domínios da proteína PAX6. A) PAI (corresponde ao sub-domínio N-terminal do *paired-domain* composto por 1 folha  $\beta$  e 4  $\alpha$ -hélices), RED (corresponde ao sub-domínio C-terminal do *paired-domain* composto por 3  $\alpha$ -hélices) e B) Foto da estrutura tridimensional da proteína PAX6, mostrando seus domínios de ligação ao DNA (adaptado de Jun *et al.*, 1996).

Proteínas PAX também podem se ligar a outras proteínas através do *paired-domain*. Um importante exemplo disso é a interação do *paired-domain* com o domínio HMG das proteínas SOX (Inoue *et al.*, 2007).

O desenvolvimento do tecido do cristalino é induzido pela estreita aposição de rudimentos da retina (copo óptico) e esse processo indutivo corresponde a ativação do *Sox2* no domínio da superfície da ectoderme já expressando *Pax6* (Kamachi *et al.*, 1998). Anteriormente a isso o gene lente-específico  $\delta$ -*crystallin* é ativado pela ligação cooperativa de PAX6 e SOX2 ao seu elemento acentuador específico (Kamachi *et al.*, 2001). Essas linhas de evidências indicam a contribuição principal das alças co-regulatórias formadas pelos genes *Pax6* e *Sox2* na regulação do desenvolvimento do cristalino (Kondoh *et al.*, 2004) e sugere o envolvimento de alças regulatórias análogas no desenvolvimento da retina.

O gene *PAX6* comumente produz duas isoformas da proteína por *splicing* alternativo do pré-mRNA, denominadas PAX6(-5a) e PAX6(+5a) (Azuma *et al.*, 2005). A

forma PAX6(+5a) difere da PAX6(-5a) pela inserção do *exon* 5a que codifica 14 aminoácidos no *paired-domain* (Xu *et al.*, 1995; Czerny *et al.*, 1993). As duas isoformas, PAX6(-5a) e PAX6(+5a), apresentam propriedades distintas de ligação ao DNA (Epstein *et al.*, 1994a; Yamaguchi *et al.*, 1997) e suas seqüências consenso de ligação são P6CON e 5aCON, respectivamente (Figura 9) (Epstein *et al.*, 1994b; Pinson *et al.*, 2005).

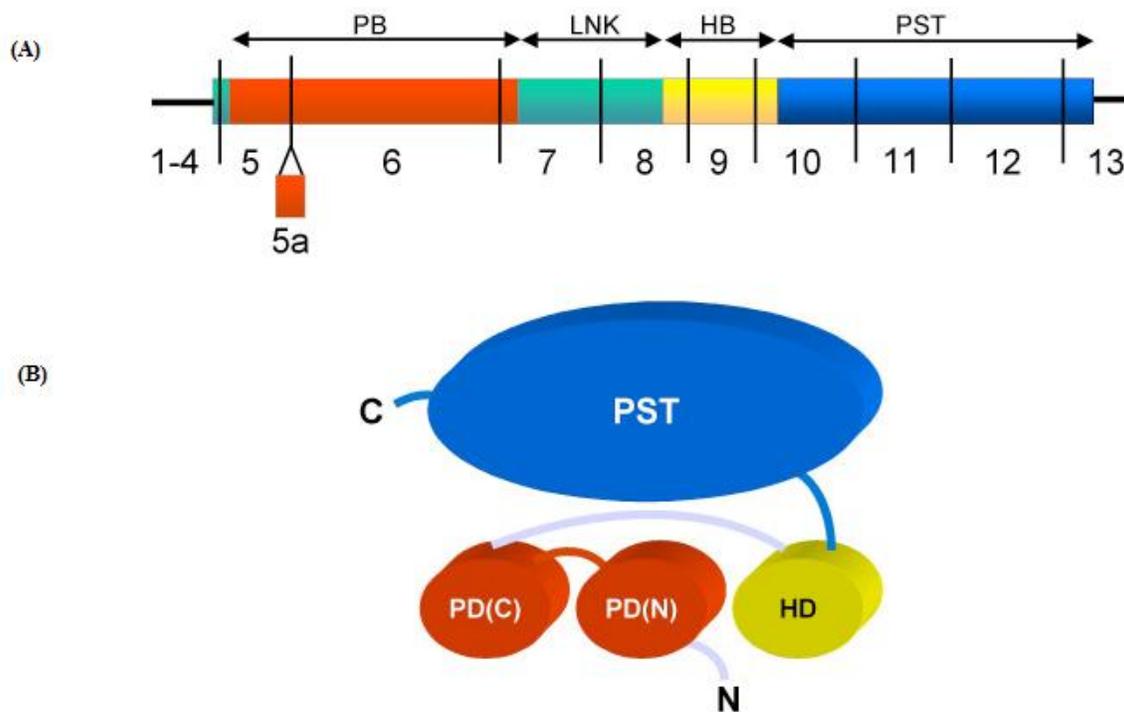


Figura 9: (A) Estrutura do gene *PAX6*, delimitando-se os *exons* e também as regiões da proteína – PB (*paired-box*), LNK (*segmento de ligação*), HB (*homeobox*) e PST (*região rica em prolina, serina e treonina*). A linha horizontal fina mostra as regiões não traduzidas, mostrando também a possível inserção do *exon* 5a no *paired-domain*. (B) Esquema da proteína PAX6 - PST (*domínio PST*), HD (*homeodomínio*), PD(C) (*paired-domínio subdomínio C-terminal*), PD(N) (*paired-domínio subdomínio N-terminal*). (retirado de Tzoulaki *et al.*, 2005).

Estudos *in vitro* e *in vivo* da atividade de PAX6(-5a) e PAX6(+5a) evidenciam que essas isoformas apresentam funções distintas em mamíferos e que devem estar em um equilíbrio estequiométrico; quando super-expressas agem sobre diferentes conjuntos de

genes. Por exemplo, no olho murino, a deleção constitutiva do *exon 5a*, portanto a super-produção de PAX6(-5a), leva à hipoplasia da íris, acompanhada de defeitos no desenvolvimento da córnea, cristalino e retina (Pinson *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2002). Inversamente, a super-expressão do PAX6(+5a) no cristalino de camundongos leva a formação de catarata e ao aumento do número de moléculas de adesão celular (Pinson *et al.*, 2006; Duncan *et al.*, 2000). Por outro lado, células cerebrais de mamíferos reduzem sua proliferação em resposta à super-expressão de ambas as isoformas, entretanto ocorre uma diminuição no processo de neurogênese quando a proteína PAX6(-5a) é super-expressa (Pinson *et al.*, 2005).

Um estudo da regulação transcricional do PAX6 identificou múltiplos elementos regulatórios de ação *cis* com funções variadas em diferentes linhagens de células de camundongos (Xu *et al.*, 1997). A análise da seqüência genômica de DNA mostrou que o promotor tem uma TATA *like-box* a -26 pares de base e duas CCAAT posicionadas a -70 e -100 pares de base, além de uma região de 92 pares de base (-62 a +30), necessária para a atividade basal do promotor (Xu *et al.*, 1997).

Dois promotores são responsáveis pela expressão majoritária do PAX6. Eles são conhecidos como P0 e P1 em codorna e camundongo (Pinson *et al.*, 2006; Anderson *et al.*, 2002) e seus homólogos em humanos são PA e PB (Pinson *et al.*, 2006; Okladnova *et al.*, 1998). Uma série de experimentos indicou que, ao serem isolados e clonados em plasmídios repórteres, esses elementos podem ser limitados pelas próprias proteínas PAX6. Quando introduzidos em células da neuro-retina de codorna, construções expressando homólogos de PAX6 aumentaram a atividade de construções contendo genes repórteres dirigidos pelos promotores P0 ou P1 (Pinson *et al.*, 2006; Plaza *et al.*, 1993 e Plaza *et al.*, 1995). Similarmente, proteínas PAX6 humanas afetaram a atividade do promotor PB, embora a natureza dos efeitos seja variável entre as linhagens celulares (Pinson *et al.*, 2006; Okladnova *et al.*, 1998). Esses estudos sugerem que as proteínas PAX6 podem regular positivamente o próprio gene.

Elementos de controle *upstream* e intragênicos têm sido definidos geralmente por *transgenesis*, entretanto casos de aniridia onde o gene PAX6 permanece intacto, enquanto ocorre rearranjo cromossômico *downstream*, sugerem que uma região adicional de controle

de ação *cis* seja requerida para uma correta expressão gênica. Kleinjan e colaboradores (2001) identificaram que a região de cerca de 150 kb distal ao promotor P1 de *PAX6* contém elementos regulatórios, indicando assim que o domínio funcional do gene não envolve somente a região transcrita.

O gene *PAX6* usa três sítios de poliadenilação principais no tecido ocular do feto localizados a 573 pb, 800 pb e 967 pb depois do início do exon 13, que podem estar associados ao ponto de quebra 3' terminal do transcrito do *PAX6* (Lauderdale *et al.*, 2000).

De acordo com um estudo recente, que comparou o genoma de *Homo sapiens* e *Fugu rubripens*, foi identificado um elemento funcional altamente conservado no gene *ELP4* (*elongation protein 4*) que está localizado *downstream* ao *PAX6* (Woolfe *et al.*, 2005).

Em outra análise comparativa entre a sequência genômica humana e a do baiacu (*Fugu sp.*) foram encontradas similaridades em três regiões do *intron 7*, localização importante entre o *paired-domain* e o *homeodomain*. A análise comparativa deste *intron* entre o gene humano e o murino apresentou quatro elementos conservados (três dos quais encontrados na primeira análise comparativa). Estudos *in vitro* determinaram que o elemento conservado 1 (CE1) regula a expressão gênica no desenvolvimento ocular tardio, CE2 regula a expressão gênica no diencéfalo, CE3 regula a expressão gênica no romboencéfalo e o transcrito do CE4 não apresenta função definida. O estudo de CE4 demonstrou que juntamente com os outros elementos conservados, este pode interferir no aparecimento de um novo transcrito iniciado em uma metionina no *exon 8*, anterior ao *homeodomain*, formando uma proteína de 221 aminoácidos. Apesar de indefinida a importância desse transcrito o estudo em camundongo indicou que o sítio de reconhecimento para o início da transcrição localiza-se em uma citosina a 839 pb *downstream* do início do *exon 7* (Kleinjan *et al.*, 2004). As funções isoladas e combinadas do *paired domain* e do *homeodomain* não estão claramente determinadas para o gene *PAX6*, o que não permite determinar a função de proteínas truncadas na região N-terminal (Kleinjan *et al.*, 2004).

Mutações em várias posições dentro do *PAX6* dão origem a efeitos de dose do gene que apóiam a hipótese em que o *PAX6* regularia a expressão gênica durante o desenvolvimento por meio de gradientes de concentração com outros fatores de transcrição.

Em uma família, a interrupção da proteína PAX6 no domínio PST causada por uma mutação de ponto no *exon* 12 levou à manifestação de catarata e à diminuição da acuidade visual no pai; a interrupção do *paired-domain* causada por uma mutação de ponto no *exon* 6 levou à ausência da íris, catarata, diminuição severa na acuidade visual e outras mal formações oculares na mãe; e uma filha heterozigota composta, com a cópia mutada do *PAX6* de cada um dos pais morreu 8 dias após o nascimento com graves defeitos no sistema nervoso central, defeitos craniofaciais e ausência dos olhos (Glaser *et al.*, 1994).

A análise molecular do gene *PAX6* tem demonstrado que 89,9% das mutações estão associadas a pacientes com aniridia e, 10,1% das mutações estão associadas a pacientes com outros fenótipos, incluindo hipoplasia foveal, microftalmia e defeitos no nervo ótico (Tzoulaki *et al.*, 2005).

A aniridia pode ser causada por seis diferentes categorias de mutações no gene *PAX6*, incluindo mutações *nonsense*, *splicing*, inserções e deleções com mudança no quadro de leitura, inserções e deleções sem mudança no quadro de leitura, mutações *missense* e mutações *run-on* (Tzoulaki *et al.*, 2005). Normalmente o quadro mais grave está associado às mutações *nonsense*, *splicing*, *frameshift*, sendo a grande maioria das mutações *missense* responsável por quadros menos graves ou por quadros diferentes de aniridia (Figura 10).

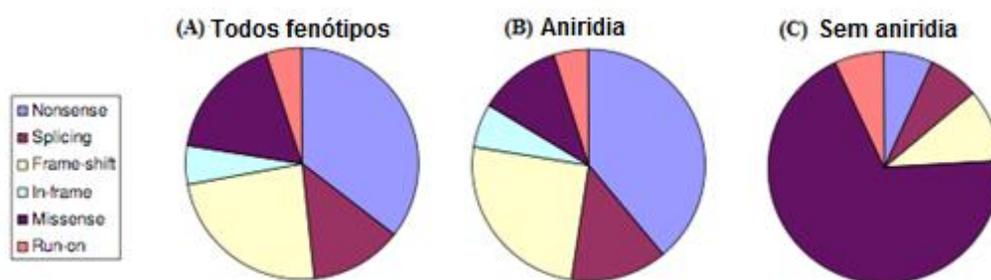


Figura 10: Distribuição de diferentes tipos de mutações encontradas no banco de dados (*PAX6 Allelic Variant Database*). (A) Todas as mutações associadas a doenças do banco de dados. (B) Mutações associadas à aniridia. (C) Mutações associadas a outros fenótipos (retirado de Tzoulaki *et al.*, 2005).

Amplios rearranjos cromossômicos também podem ser atribuídos como causa do fenótipo (Prosser e Heyningen, 1998). No entanto, uma proporção significativa deste tipo de anormalidades consiste de deleções submicroscópicas, que podem ser observadas em alguns casos usando a técnica de FISH (*fluorescence in situ hybridization*) (Crolla e Heyningen, 2002).

Além de mutações localizadas dentro do *PAX6* e deleções incluindo o gene ou parte dele, casos esporádicos de aniridia têm sido associados a deleções que não envolvem a estrutura do gene, mas estão associadas à remoção de elementos com funções transcricionais (Lauderdale *et al.*, 2000). Tais deleções foram encontradas na região 3' do gene *PAX6*, que foram consideradas importantes para sua expressão por conter, provavelmente, seqüências reguladoras de transcrição e/ou organizadoras de cromatina (Lauderdale *et al.*, 2000). Mais tarde, D'Elia e colaboradores (2007) descreveram um caso familiar de aniridia com deleção submicroscópica envolvendo a remoção do gene *ELP4*, associando assim a haploinsuficiência deste ao fenótipo de aniridia.

Por outro lado, deleções submicroscópicas na região 5' do gene *PAX6* envolvendo o gene *RCN1* têm sido relacionadas com o fenótipo de microftalmia em camundongos (Favor, 2009). O gene *RCN1* codifica uma proteína de ligação ao CA(+2) (Hilioti e Cunningham, 2003), localizada no retículo endoplasmático e participa da via secretória sendo expresso no olho.

Em humanos, um ponto de quebra no cromossomo 11 foi detectado em paciente com a síndrome WAGR (*Wilms' Tumor – Aniridia - Genitourinary Anomalies - Mental Retardation Syndrome*) e a síndrome de Potocki-Shaffer entre os genes *PAX6* e *RCN1*, sendo que o *PAX6* permaneceu intacto (Almind *et al.* 2009). Sugere-se que a deleção do gene *RCN1* está associada à regulação 5' do gene *PAX6*, podendo contribuir para os fenótipos oculares desse indivíduo que incluem catarata e ptose palpebral (Almind *et al.*, 2009).

Como já citado anteriormente, a aniridia é um defeito congênito bastante raro, com frequência populacional de cerca de 1 em 64.000 a 1 em 96.000 (Yuan *et al.*, 2007). Na

maioria dos casos provoca uma formação incompleta ou mesmo a ausência da íris e, quase sempre, é uma condição bilateral (Figura 5) (Prosser e Heyningen, 1998; Zhu *et al.*, 2006).

Os sintomas principais são a fotofobia e a diminuição da acuidade visual para valores entre 10-20%, que se agrava no caso de estar associada a outras lesões oculares. Embora seus efeitos fenotípicos variem entre os indivíduos, a aniridia pode causar perda de visão, usualmente bilateral. Pode também encontrar-se associada a nistagmo, catarata, degeneração da córnea, estrabismo, ambliopia, luxação do cristalino e hipoplasia do nervo óptico. Muito ocasionalmente, o glaucoma pode estar presente ao nascimento, porém se desenvolve em maior frequência da pré-adolescência em diante e, se não tratado, pode levar à perda da visão residual e até a necessidade de remoção dos olhos (Hanson *et al.*, 1994a). No primeiro congresso internacional em aniridia realizado em Madrid, Espanha, no ano de 2002, um estudo da associação Espanhola ([www.aniridia.com](http://www.aniridia.com)) demonstrou que 60% dos casos deste defeito congênito estão associados à catarata, 30% ao glaucoma, 20% às alterações da córnea, 15% ao estrabismo, 2% ao tumor de Wilms e 5% a outros problemas.

A aniridia pode ser herdada na forma autossômica dominante ou surgir de forma esporádica. Aproximadamente dois terços dos casos reportados são de familiares com alto grau de penetrância, mas com expressividade variável (Prosser e Heyningen, 1998). O terço restante corresponde aos casos esporádicos, sem histórico familiar prévio, porém alguns desses indivíduos podem manifestar a herança dominante em gerações subsequentes (Prosser e Heyningen, 1998). A aniridia tem sido descrita como uma condição semi-dominante, em que o mutante heterozigoto é afetado menos gravemente do que o homozigoto (Prosser e Heyningen, 1998).

Primeiramente, Ferrell e colaboradores (1980) haviam definido que a aniridia tipo I (AN1) era resultante de alterações no braço curto do cromossomo 2. Entretanto, em um estudo posterior o mesmo grupo de pesquisa verificou por análise de ligação que o fenótipo de aniridia está associado a alterações no cromossomo 11p13 (Lyons *et al.*, 1992). Realmente havia sido registrado em 1991 que a doença fora associada a alterações no gene *PAX6* que está localizado neste segmento cromossômico (Ton *et al.*, 1991).

Outras síndromes genéticas têm a aniridia ou a mal formação da íris como sintoma associado: a síndrome WAGR (*Wilms' Tumor – Aniridia - Genitourinary Anomalies - Mental Retardation Syndrome*), a síndrome de Gillespie e a síndrome de Axenfeld-Rieger.

A associação entre tumor de Wilms, aniridia, anormalidades urogenitais e retardo mental foi descrita pela primeira vez em 1964 por Miller e colaboradores (Miller *et al.*, 1964). A síndrome WAGR é uma condição genética muito rara, onde os principais sintomas são resultado da deleção da banda 13 do braço curto do cromossomo 11 (11p13) (Riccardi *et al.*, 1978; Francke *et al.*, 1979). Essa deleção normalmente abrange diversos genes contíguos, incluindo o gene *PAX6* (responsável pelo desenvolvimento ocular) e o gene *WT1* (gene do tumor de Wilms), resultando tanto em aniridia quanto em aumento do risco para o tumor de Wilms (Almind *et al.*, 2009). As anormalidades no gene *WT1* também podem ser responsáveis pelas anormalidades genitais e nefropatites freqüentemente vistas nessa condição (Fantes *et al.*, 1992; Hanson *et al.*, 1994a; Tzoulaki *et al.*, 2005).

A síndrome de Gillespie é uma doença genética extremamente rara que afeta o cérebro e os olhos em indivíduos de ambos os sexos. As principais características da síndrome são a aniridia parcial bilateral, hipoplasia foveal, nistagmo e hipoplasia cerebelar. Foi identificada pela primeira vez em 1965 e desde então apenas 21 casos foram reportados, sendo nove casos esporádicos e 12 casos familiares divididos em cinco famílias. Pacientes com a síndrome de Gillespie apresentam aniridia parcial bilateral, entretanto não foram encontradas mutações no gene *PAX6*, o que sugere uma condição clínica similar, mas com origem diferente (Dollfus *et al.*, 1998). Como as bases genéticas para essa síndrome permanecem indeterminadas e os casos familiares demonstram-se heterogêneos, as duas formas de herança autossômica são consideradas para essa síndrome, a herança autossômica recessiva e a dominante.

Outra anomalia que pode ser associada a deleções no gene *PAX6* é a síndrome de Axenfeld-Rieger que é uma condição multi-sistêmica rara transmitida sob padrão de herança autossômico dominante, com penetrância completa, mas expressividade variável (Hjalt *et al.*, 2005).

Os defeitos oculares clássicos da síndrome de Axenfeld-Rieger incluem a hipoplasia da íris, além de outras características menos frequentes como a catarata, descolamento da retina e microcórnea (Figura 11) (Spallone, 1989; Kamińska *et al.*, 2007). Há também casos de indivíduos portadores da síndrome de Axenfeld-Rieger descritos na literatura, onde além de outras anomalias oculares os pacientes apresentavam aniridia associada aos demais sintomas (Gould e John, 2002; Dandan *et al.*, 2008).

Dentre as anomalias sistêmicas associadas à síndrome está a mal formação facial, anormalidades dentais e pele periumbilical sobressalente. Aproximadamente metade dos indivíduos afetados pela síndrome de Axenfeld-Rieger também desenvolvem glaucoma (Shields, 1983; Alward, 2000).

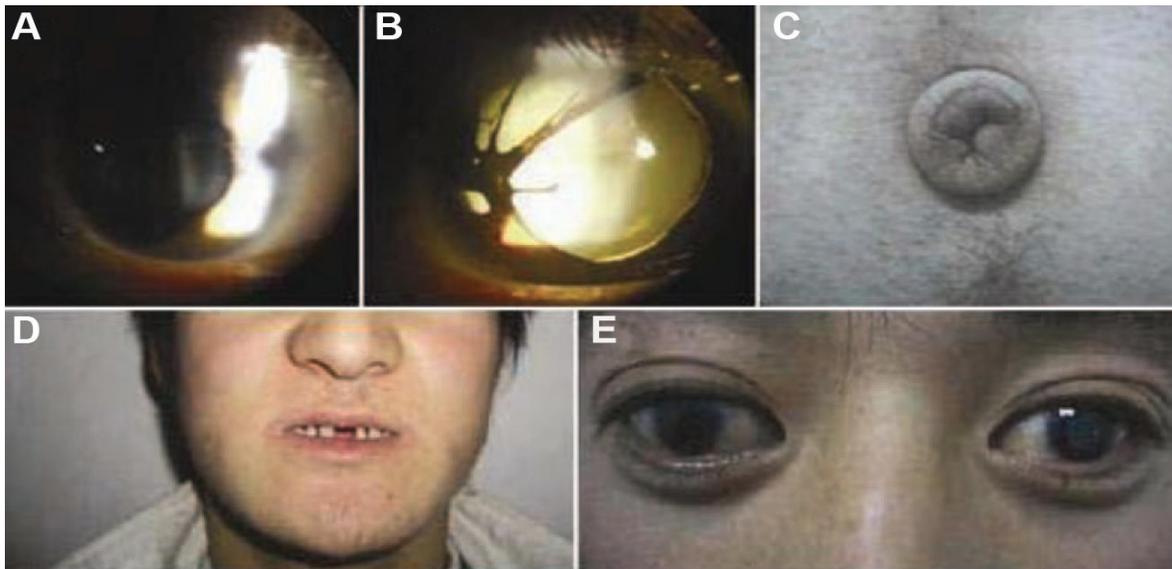


Figura 11: Características oculares e sistêmicas de um indivíduo com síndrome de Axenfeld-Rieger. (A) Fotografia de lâmpada de fenda mostra hipoplasia da íris e corectopia associada com aniridia parcial no olho direito. (B) Atrofia da íris associada com catarata congênita no olho esquerdo. (C) Anomalia sistêmica: pele periumbilical sobressalente. (D) Anormalidades dentárias e lábio inferior protudente. (E) Telecanto (retirado de Dandan *et al.*, 2008).

A incidência da síndrome de Axenfeld-Rieger é estimada em 1: 200.000 (Alkemade, 1969). Mutações associadas com a expressão do fenótipo da síndrome de Axenfeld-Rieger foram encontradas predominantemente nos genes *PITX2* (paired-like homeodomain transcription factor 2; 4q25) e *FOXC1* (forkhead box C1; 6p25) (Semina *et al.*, 1996; Lines *et al.*, 2004; Perveen *et al.*, 2000; Komatireddy *et al.*, 2003; Honkanen *et al.*, 2003). Porém a deleção do gene *PAX6* foi descrita por Riise e colaboradores (2001). Além destes, o gene *MAF* (v-MAF avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog; 16q24) e um gene ainda não identificado no cromossomo 13 (13q14) têm sido implicados como responsáveis pela síndrome (Lines *et al.*, 2002; Jamieson *et al.*, 2002).

Uma interação importante que não pode deixar de ser citada é a repressão recíproca da transcrição dos genes *PAX2* e *PAX6* (Azuma *et al.*, 2003). Essa repressão foi observada quando uma quantidade crescente das construções repórteres de *PAX2* e *PAX6* foram transfectadas em células P19 de carcinoma embrionário de camundongo. A expressão da construção repórter de um dos genes diminuía conforme a dose transfectada do outro fosse aumentada, sugerindo a repressão recíproca da expressão gênica (Schwarz *et al.*, 2000; Azuma *et al.*, 2003). Mutações no gene *PAX2* foram previamente descritas em pacientes com hipoplasia do nervo ótico e coloboma, o que sugere que a falha da regulação *PAX6-PAX2* pode afetar a manifestação fenotípica dessas anomalias. Várias etapas são requeridas para a formação do nervo ótico, assim os genes *PAX2* e *PAX6* podem cooperar na formação deste e, ocasionalmente compartilhar as funções, como por exemplo, a abertura e fechamento da fissura embrionária, sugerindo assim que mutações em cada um dos genes podem causar mudanças fenotípicas similares (Azuma *et al.*, 2003).

Exemplificando essa interação *PAX6-PAX2*, está descrita na literatura a síndrome *Morning Glory* (MGS), nome dado em analogia à flor de mesmo nome, a qual se trata de uma displasia óptica congênita que é caracterizada por um aumento da papila óptica, disco óptico em forma de funil e uma pigmentação elevada do anel do tecido peripapilar, descrita pela primeira vez em 1970 (Figura 12) (Kindler, 1970).

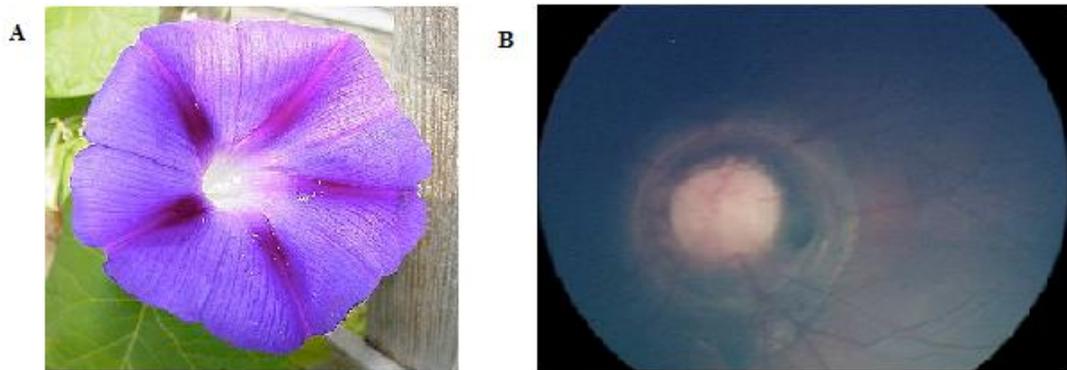


Figura 12: (A) Flor *Morning Glory*. (B) Olho apresentando o fenótipo de *Morning Glory*.

Freqüentemente afeta indivíduos do sexo feminino, sendo comumente unilateral. O diagnóstico pode se estabelecer pela apresentação de estrabismo, ambliopia, nistagmo ou leucocoria. Está freqüentemente associada a anomalias graves do sistema nervoso central e também a anomalias endócrinas, renais e respiratórias, como coloboma, defeitos cardíacos, crescimento retardado e anomalias auditivas. Em alguns casos pode-se, também, observar hipertelorismo ou fenda de palato. Há o aumento do risco de descolamento de retina. A síndrome *Morning Glory* pode, ainda, estar associada com encefalocele basal e hipopituitarismo. A encefalocele basal é uma mal formação oculta e esporádica, descrita em 67,7% dos casos de *Morning Glory*, geralmente associada com defeitos da linha média, tal como fenda palatal e agenesia do corpo caloso, anomalias do disco óptico e cerebrais e distúrbios hormonais (Minotto *et al.*, 2007). Mutações no gene *PAX6* foram identificadas em famílias com síndrome de *Morning Glory*. Uma substituição C/T foi identificada no gene de um paciente com MGS, resultando na alteração P68S (Azuma *et al.*, 2003). Um estudo verificou que o gene *PAX6* com a alteração P68S em homozigose, não reprimiu o promotor do *PAX2*, ao contrário do *PAX6* normal (*wild-type*). Falhas na repressão *PAX6-PAX2* podem sugerir a manifestação dessa anomalia (Azuma *et al.*, 2003), uma vez que *PAX2* controla o padrão de expressão de genes incluindo outros membros da família PAX (Benetti *et al.*, 2007).

Mutações no gene *PAX6* têm sido descritas em um número crescente de pacientes com fenótipos variados de aniridia e em um caso de Anomalia de Peters. São 408 registros

de alterações do gene *PAX6* humano que foram coletadas e colocadas em um banco de dados interativo (<http://pax6.hgu.mrc.ac.uk/>), para análise das mutações (Brown *et al.*, 1998; Tzoulaki *et al.*, 2005). A maioria dessas mutações resulta em término prematuro da tradução em um dos alelos, sugerindo que a haploinsuficiência do gene pode causar o fenótipo de aniridia (Fisher e Scambler, 1994; Martha *et al.*, 1994). Desses 408 registros, 307 se referem a mutações únicas, dentre essas 267 são mutações na região codificante do gene, estando associadas a malformações congênitas do olho e divididas em seis categorias: mutações *nonsense*, mutações de *splicing*, deleções ou inserções de mudança de *frame*, deleções e inserções em *frame*, mutações *missense* e mutações *run-on* (Tzoulaki *et al.*, 2005), sendo 45,0% destas mutações no *paired domain*, 11,7% no *homeodomain*, 13,0% na região LNK e 17,3% na PST ([http://pax6.hgu.mrc.ac.uk](http://pax6.hgu.mrc.ac.uk/)).

Diversos métodos têm sido empregados para detecção de mutações no gene *PAX6*: SSCP (*single-strand conformation polymorphism*), análise de heteroduplex (Jordan *et al.*, 1992), clivagem química, *mismatch*, PTT (teste de proteína truncada) (Axton *et al.*, 1997) e RT-PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*) (Hanson *et al.*, 1994b).

A técnica denominada *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (Amplificação de Múltiplas Sondas Dependente de Ligação) é um método sensível, econômico, rápido e simples, que visa à quantificação relativa, quanto ao número de cópias, de mais de 50 sequências de ácidos nucleicos em um único experimento, sendo capaz de detectar deleções e duplicações de diversos genes, além de mutações de ponto conhecidas (Schouten *et al.*, 2002; Sørensen *et al.*, 2008).

Em pacientes com aniridia, a técnica de MLPA tem sido empregada para aumentar o poder de diagnóstico para esses indivíduos, uma vez que nem todos os casos de aniridia podem ser explicados por mutações no gene *PAX6*, permitindo a busca por micro e macro deleções no gene e na região cromossômica onde se localiza (Redeker *et al.* 2008).

Apesar de não ser possível a cura de pacientes com doenças ligadas aos defeitos do gene *PAX6*, o estudo molecular do gene *PAX6* nesses pacientes torna-se fundamental para o aconselhamento genético das famílias. Considerando que a análise desses pacientes no Brasil está concentrada em estudos clínicos, o estudo do gene complementará e consolidará o diagnóstico. Como o gene pode apresentar vários transcritos, a identificação de variantes

nucleotídicas em pacientes com aniridia pode indicar possíveis alterações na produção de alguns desses transcritos e auxiliar na elucidação da importância desses transcritos para o fenótipo. Além disso, várias alterações vêm sendo descritas como polimorfismos, entretanto a maioria não apresenta validação nem estudo de frequência em populações. Por conseguinte a análise de frequência torna-se fundamental para se determinar se a alteração realmente pode ser considerada um polimorfismo sem implicações no fenótipo.

## **II- OBJETIVOS**

O objetivo central do projeto é identificar mutações e/ou polimorfismos no gene *PAX6* de famílias com indivíduos portadores de aniridia, pacientes portadores da Síndrome de *Morning Glory* e em um grupo controle considerado oftalmologicamente normal visando à estimativa da frequência das variações nucleotídicas na população e/ou a detecção de desvio de ligação de alguma variação específica com os quadros clínicos.

Objetivos específicos:

Analisar a sequência do gene *PAX6* através de:

- Desenho de *primers* específicos para todos os transcritos do gene *PAX6*;
- Amplificação por PCR (*polymerase chain reaction*) e sequenciamento dos *exons* codificantes e não codificantes;
- Análise da variação do número de cópias gênicas dos pacientes utilizando a técnica de *MLPA*;
- Estimativa da frequência de alterações nucleotídicas (SNPs, *Single Nucleotide Polymorphisms*) previamente descritas e/ou novos polimorfismos nos alelos dos pacientes e dos grupos de controles;
- Estimativa de ligação destas alterações com alelos afetados.

## **III- CASUÍSTICA**

Foram incluídas inicialmente duas famílias (Família 1: pai-AN1P, mãe-AN1M, filha AN1- AN1X1, filha 2- AN1X2 e filho- AN1Y. Família 2: pai-AN2P, mãe-AN2M e filha-AN2X) com suspeita de aniridia, porém o diagnóstico clínico posterior da família 2 revelou se tratar de casos da Síndrome de Axenfel-Rieger associada a distrofia endotelial de Fuchs; e 4 pacientes com a Síndrome de *Morning-Glory* (MG 1, 2, 3 e 4). Posteriormente, foram incluídos uma família (Família 3: pai-AN3P, mãe-AN3M e filho-AN3Y) e um paciente esporádico com aniridia (AN4). O grupo controle consistiu de 50 indivíduos considerados normais oftalmologicamente, totalizando 100 alelos.

A Família 1, proveniente do Departamento de Oftalmologia da Universidade Federal de Uberlândia (UFU – Brasil), foi encaminhada para a análise molecular do gene *PAX6* por apresentar diagnóstico de aniridia em duas gerações (Mãe e filhos). Os dados clínicos desta família estão apresentados no quadro 1.

A família 2, proveniente da Departamento de Oftalmologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ – Brasil), foi encaminhada para investigação do gene *PAX6*, porém o diagnóstico clínico confirmado posteriormente nos indivíduos afetados (mãe e filha) foi da Síndrome de Axenfeld-Rieger associada a distrofia corneana endotelial (distrofia endotelial de Fuchs). Os demais dados clínicos são apresentados no quadro 2.

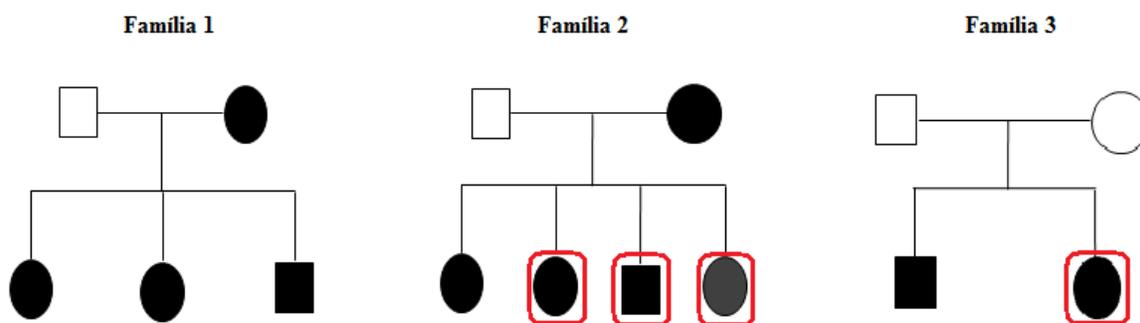


Figura 13. Heredograma das famílias da casuística. Os indivíduos enquadrados em vermelho não foram analisados durante a execução do projeto.

	Data de nascimento	AV	Refração	Biomicroscopia	Fundoscopia	Pressão intraocular (mmHg)
<b>Mãe</b>	09/20/1968	OD: mm	OD: +11,50 D – mm	OD e OE: aniridia, afacia, opacificação corneana	OD: comprometido pela opacificação corneana	OD: 18
		OE: 1.m	OE: +12,00 D - 20/200		OE: escavação 0,3	OE: 16
<b>Filha 1</b>	04/17/1987	OD: 1.m	OD: +5,00 D - 20/400	OD e OE: aniridia, catarata cortical posterior	OD e OE: escavação 0,3	OD e OE: 13
		OE: 2.m	OE: +4,00 D - 20/200			
<b>Filha 2</b>	06/25/1985	OD: pl	OD: impossível – pl	OD e OE: aniridia, nistagmo	OD: NR	OD e OE: 12
		OE: 20/200	OE: +0,50 = -2,50 85' - 20/80p	OD: catarata	OE: escavação 0,3	
<b>Filho</b>	04/13/1988	OD: 3m	OD: +2,50 D	OD e OE: aniridia, subluxação do cristalino, nistagmo	OD e OE: escavação 0,4	OD e OE: 12
		OE: 3m	OE: +2,50 D			

Quadro 1. Dados clínicos dos membros afetados por aniridia da Família 1. AV: acuidade visual; m: metros mm: movimento de mão; pl: percepção de luz; D: diotropia; NR: não realizado; OD: olho direito; OE: olho esquerdo.

	Idade (anos)	AV	Biomicroscopia	Gonioscopia	Pressão intraocular (mmHg)	Fundoscopia
Mãe	56	OD: 20/25 OE: 20/50	OD e OE: embriotoxo posterior, <i>guttata</i> com edema corneano e dobras na membrana Descemet	Impossível	OD: 12 OE: 14	Sem sinais de danos do nervo óptico
Filha	27	OD e OE: 20/20	OD e OE: nasal e temporal embriotoxo posterior	Vertente Iridocorneal e linha de Schwalbe proeminente	OD: 15 OE: 16	Sem sinais de danos do nervo óptico

Quadro 2. Dados clínicos dos membros afetados pela Síndrome de Axenfeld-Rieger da Família 2. AV: acuidade visual; OD: olho direito; OE: olho esquerdo. Não foi possível a leitura da gonioscopia devido ao edema corneano.

A Família 3, proveniente do Depto. Oftalmologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP – Brasil) foi encaminhada para a análise molecular do gene *PAX6* por apresentar indivíduos com fenótipo de aniridia. O pai e mãe dessa família são oftalmologicamente normais, sem alterações na córnea, íris, fundo de olho e sem catarata. No filho da Família 3, por sua vez, foi constatada a aniridia parcial bilateral sendo que ao nascimento apresentava-se bftalmo (tamanho do olho aumentado) e com diâmetros da córnea de 13 e 13,5 mm no olho direito e no esquerdo, respectivamente, apresentando opacidades estromais bilateralmente. A pressão intraocular era de 26 mmHg no olho direito e 28 mmHg no olho esquerdo. Aos oito anos de idade realizou uma trabeculectomia bilateral controlando a pressão intraocular que passou a ser de 12 mmHg em ambos os olhos. Porém, as outras características se mantiveram.

O indivíduo esporádico com Aniridia, proveniente da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP/EPM – Brasil), foi encaminhado para análise molecular após apresentar um histórico de aniridia bilateral e catarata congênita aos sete meses e 25 dias de idade.

Dos pacientes com a síndrome *Morning Glory*, dois são provenientes da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP/EPM – Brasil) (MG1 e MG3) e um proveniente da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP – Brasil) (MG2), foram encaminhados à

clínica de endocrinologia pediátrica devido à baixa estatura. Os exames oftalmológicos e retinografia mostraram anormalidades típicas de MGS, compreendendo um disco óptico com uma coanóide aumentada e aspecto de taça, com uma pigmentação rosa e uma massa central branca, o que esconde o caminho dos vasos ao interior do disco.

Todos os pacientes nasceram a termo após o período de gestação. Os pacientes MG1 e MG3 tinham histórico médico sem registros de eventos anteriores, mas o paciente MG2 apresentou falha de crescimento e retardo no desenvolvimento psicomotor, começando no primeiro ano de vida. O paciente MG2 ainda mostrou uma disfunção ocular progressiva e perdeu a visão no olho direito. Nenhum dos familiares apresentou histórico de distúrbios hormonais ou anomalias congênitas. Os demais dados clínicos estão apresentados no quadro 3.

O paciente MG4 proveniente da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP – Brasil) foi encaminhado pela primeira vez aos 32 anos com hipogonadismo hipogonadotrófico e hipotireoidismo central. Este paciente apresentou glaucoma aos três anos de idade e nefrite aos nove anos. A hipótese diagnóstica foi de Síndrome de *Morning-Glory*.

	MG1	MG2	MG3
<b>Idade (anos)</b>	8	8	12,2
<b>Acuidade Visual</b>	20/400	15/400	20/400
<b>Estrabismo</b>	+	+	-
<b>Hipertelorismo ocular</b>	-	+	-
<b>Microftalmia</b>	-	-	+

Quadro 3: Dados clínicos dos pacientes com a síndrome *Morning Glory*.

## **IV- MÉTODOS**

#### 4.1- Obtenção das amostras de DNA

Foram utilizadas amostras de DNA genômico extraídas a partir de sangue total periférico dos pacientes e de seus familiares. Foram colhidos de 10 a 20 mL de sangue periférico em tubos cônicos, contendo 10% do anti-coagulante etilenediaminotetracetato dissódico 2H<sub>2</sub>O (EDTA) 0,5 M pH 8,0.

#### 4.2- Extração de DNA genômico a partir de sangue total periférico

Para a extração de DNA foi empregado o método de lise com Proteinase K (Boehringer Mannheim, Germany) padronizada no laboratório de Genética Molecular Humana - CBMEG:

- Para lise das hemácias foi adicionada solução A ao sangue coletado até completar o volume de 50 mL (adiciona-se de 30 a 40 mL da solução A), permanecendo o homogeneizado em gelo por 30 minutos;
- Centrifugou-se a 2.000 rpm por 15 minutos a 4°C;
- O sobrenadante foi descartado e o precipitado (*pellet*) ressuspensionado em 35 mL de solução A. Esta operação foi repetida até o *pellet* ficar livre de hemácias lisadas;
- O *pellet* então foi ressuspensionado em solução B diluída 1x;
- Acrescentou-se 250 µL de solução C recém-preparada, contendo proteinase K;
- O *pellet* com as soluções foi incubado a 37°C por aproximadamente 18 horas;
- Para extração de DNA dos leucócitos foram adicionados 1,25 mL de TE 1x (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0) e igual volume de fenol saturado com Tris-HCl 10 mM pH 8,0;
- Homogeneizou-se a mistura por inversão lenta do tubo durante 5 minutos;
- Para separação e recuperação da fase aquosa (superior) o tubo foi centrifugado a 2.500 rpm por 15 minutos à temperatura ambiente;
- Acrescentou-se à fase aquosa igual volume de fenol saturado com Tris-HCl 10 mM pH 8,0, após leve agitação por 5 minutos, foi novamente centrifugado;
- O procedimento foi repetido com solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1, v:v:v) e por último com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v:v).

- Para precipitação do DNA, acrescentou-se 0,1 volume de acetato de sódio 3 M pH 5,5 e 2,5 volumes de etanol absoluto gelado.
- O DNA precipitado foi então recuperado com auxílio de uma haste plástica esterilizada e lavado com etanol 70%, para retirada do excesso de sal, antes de ser ressuspenso em TE 1x (200 a 500 µL).

A concentração de DNA foi obtida através de leitura de absorvância óptica a 260 nm em espectrofotômetro e a integridade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 0,8% em TBE (Tris, ácido bórico e EDTA 0,2 M pH 8,0).

Solução A	Solução B	Solução C
MgCl <sub>2</sub> – 5 mM	Na <sub>2</sub> EDTA – 20 mM	Solução B – 0,5x
Sacarose – 0,32 M	NaCl – 20 mM	SDS – 5%
Tris-HCl pH 8,0 – 10 mM	Tris-HCl pH 8,0 – 20 mM	Proteinase K – 1 mg/ml
Triton X100 – 1%		

Quadro 4. Composição das soluções utilizadas durante a extração de DNA genômico a partir de sangue total (item dos Métodos).

#### 4.3- Quantificação do DNA genômico extraído

A quantificação do DNA extraído foi obtida por leitura de absorvância óptica a 260 nm em espectrofotômetro *DU-65 Spectrophotometer* (Beckman, Estados Unidos). Água destilada foi utilizada como amostra referência (branco) para calibrar o aparelho, 10 µL da amostra de DNA foi diluída em 490 µL de água destilada (fator de diluição = 50), para análise.

A concentração das amostras foi obtida por:

$$[\text{DNA } (\mu\text{g/ mL})] = 50 \times \text{Absorvância } 260 \times \text{fator de diluição}$$

#### **4.4- Verificação da integridade do DNA genômico extraído**

A integridade do DNA genômico extraído foi verificada por meio da realização de eletroforese em gel de agarose 0,8% em TBE 1x, preparado segundo protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989).

As amostras foram aplicadas no gel juntamente com tampão de corrida (0,25% de azul de bromofenol; 50% glicose) na razão de 6:1. As condições de eletroforese variaram entre 90 a 110 V. Os marcadores de peso molecular utilizados foram DNA *ladder* de 1 Kb, 1 Kb plus ou 100 pb (Invitrogen Corporation, Estados Unidos), em concentração de 0,15 µg/µL. O gel foi imerso em solução diluída de brometo de etídio (0,5 µL/mL de água destilada) durante 15 minutos, sendo visualizado em transluminador de luz ultravioleta e fotografado utilizando uma câmera digital acoplada a um computador (*Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System-EDAS*, Kodak Digital Science, Estados Unidos).

#### **4.5- Amplificação de fragmentos de DNA por reação de polimerase em cadeia - PCR**

As reações de polimerização em cadeia (PCR) foram realizadas para amplificação de todos os fragmentos do gene para o posterior seqüenciamento. A reação básica utilizada está detalhada no Quadro 5.

Reagentes	[ ] final	Ciclo geral
DNA genômico	1,0 – 2,0 µg	94°C – 5 minutos
Tampão Invitrogen (10x)	1x	30 ciclos de:
MgCL <sub>2</sub> 50 mM (Invitrogen)	1,5 mM	94°C – 1 minuto
dNTP 2 mM (Invitrogen)	0,1 mM	Tmédia do par de <i>primers</i> – 1 minuto
<i>Primer</i> direto	20 pmoles	72°C - 2 minutos
<i>Primer</i> reverso	20 pmoles	72°C - 10 minutos
Enzima <i>Taq DNA polymerase recombinant</i> (5 U/µl, Invitrogen)	2,0 U	
H <sub>2</sub> O deionizada	q.s.p. 50 µl	

Quadro 5. Reagentes utilizados para reação de PCR com enzima *recombinant Taq DNA polymerase* (Invitrogen Corporation, Estados Unidos), e ciclo utilizado para amplificação.

#### 4.6- Amplificação do gene *PAX6*

Neste trabalho foram utilizados os *primers* mostrados no quadro 6 para a amplificação de todos os 14 *exons* e junções *exon-intron* do gene *PAX6*. O *intron* 4 do gene *PAX6* foi dividido em 5 fragmentos de amplificação devido a sua longa extensão. Os *exons* 6 e 7 e os *exons* 11 e 12 foram reunidos, respectivamente, em dois fragmentos de amplificação devido às suas pequenas extensões.

Os ciclos utilizados para as PCRs dependeram do fragmento a ser amplificado e dos pares de *primers* utilizados (tempo de extensão e a ligação dos *primers* ao fragmento variaram com base na temperatura média de *melting* cada par de *primers*).

Primer	Sequência do primer (5'→3')	Tm <sup>2</sup> (°C)	Localização	Tamanho Fragmento
P0s <sup>1</sup>	ACTCTAGCCGCCATGACGTC	61,5	Início promotor P0	451 pb <sup>3</sup>
P0as <sup>1</sup>	GCACACTCGGCAAAGACAAG	60,5	Fim promotor P0	
P1s	GCTGTCCTGGAGTTGGCAAG	61,8	Início promotor P1	423 pb
P1as	TCAAACCCACTAATCACTCCG	59,3	Fim promotor P1	
Ex1s	TCATATTCAAACAAACGGACC	57,1	Início do <i>exon</i> 1	368 pb
Ex1as	AAGAGTGTGGGTGAGGGAAGT	59,1	Final do <i>exon</i> 1	
Ex2s	TTATCTCTCACTCTCCAGCCG	58,7	Início do <i>exon</i> 2	306 pb
Ex2as	GGAGACCTGTCTGAATATTGC	55,4	Final do <i>exon</i> 2	
Ex3s	TGTGGGTGTAATGCTGGGACT	61,6	Início do <i>exon</i> 3	407 pb
Ex3as	GAATATCCCAATCTGTTTCCC	61,5	Final do <i>exon</i> 3	
Ex4s	TTGGGAGTTCAGGCCTACCT	60,4	Início do <i>exon</i> 4	323 pb
Ex4as	CCAGTATCGAGAAGAGCCAAG	58,6	Final do <i>exon</i> 4	
Ex5.1s	TCAAACCTTGACGTGCAGCTAG	58,3	<i>Intron</i> 4	391 pb
Ex5.1as	ATAGTGTTCCCCATCCCTCCT	60,9	<i>Intron</i> 4	
Ex5.2s	CTAAGGTTGGACCACAGGGAT	59,9	<i>Intron</i> 4	415 pb
Ex5.2as	TCCAGAAATGTTTCCATCACC	58,8	<i>Intron</i> 4	
Ex5.3s	ACATACTGGCTGCTCTGGTTG	59,3	<i>Intron</i> 4	358 pb
Ex5.3as	CTACAGCCATAACCCCAGCAG	61,6	<i>Intron</i> 4	
Ex5.4s	TGGCTGCAGTGTTTATGAAGA	58,4	<i>Intron</i> 4	450 pb
Ex5.4as	CACCACCGAGCTGATTCCTC	61,6	<i>Intron</i> 4	
Ex5s	TCTTCTTCCTCTTCACTCTGC	55,2	Início do <i>exon</i> 5	391 pb
Ex5as	TGAAAGAGATAGGGAAGGATG	55,5	Final do <i>exon</i> 5	
Ex6s	ATTTATCTACTTCGTTTTGATGC	56,0	Início do <i>exon</i> 6	632 pb
Ex7as	AGAGGGTGGGAGGAGGTAAG	61,0	Final do <i>exon</i> 7	
Ex8s	AGCTGAGATGGGTGACTGTGT	57,8	Início do <i>exon</i> 8	280 pb

Ex8as	AAGGGATGCACATATGGAGAG	58,3	Final do <i>exon</i> 8	
Ex9s	GGGAATGTTTTGGTGAGGCT	60,6	Início do <i>exon</i> 9	
Ex9as	ACCTCCAACCAATTCCTTTA	60,1	Final do <i>exon</i> 9	697 pb
Ex10s	GGAACCAGTTTGATGCACAGT	58,8	Início do <i>exon</i> 10	
Ex10as	GCAGCAGAGCATTAGCAGAC	59,7	Final do <i>exon</i> 10	301 pb
Ex11s	GTCTGCTAAATGCTCTGCTGC	59,7	Início do <i>exon</i> 11	
Ex12as	AGCTCTCAAGGGTGCAGACAC	60,6	Final do <i>exon</i> 12	578 pb
Ex13s	TGGCTGTGTGATGTGTTCTC	59,9	Início do <i>exon</i> 13	
Ex13as	AGAAAAGTGCAGTCTCAGGC	58,2	Final do <i>exon</i> 13	462 pb
Ex14s	CCATGTCTGTTTCTCAAAGGGA	61,0	Início do <i>exon</i> 14	
Ex14as	CCCAGTGGTACAATACAGGA	59,0	Final do <i>exon</i> 14	294 pb

Quadro 6. Sequência e localização dos *primers* utilizados para seleção do gene *PAX6*. <sup>1</sup>s = *sense* ou direto; as = *antisense* ou reverso. <sup>2</sup>T<sub>m</sub> = temperatura de *melting* do *primer*, <sup>3</sup>pb = pares de bases.

#### 4.7- Reação de seqüenciamento

Os produtos das PCRs do gene *PAX6*, foram purificados utilizando o *Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System* (Promega Corporation, Estados Unidos). Após a purificação as amostras foram quantificadas usando o marcador de peso molecular *Low mass DNA ladder* (Gibco®Invitrogen Corporation, Estados Unidos) para serem seqüenciadas.

Os fragmentos do gene *PAX6* que foram gerados a partir da amplificação por PCR foram seqüenciados utilizando os *primers* mostrados no quadro 6.

As reações de seqüenciamento foram realizadas utilizando o *kit ABI PRISM Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystem-Applera Corporation, Estados Unidos), conforme descrito a seguir:

DNA (produto de PCR purificado).....	40 - 80 ng
Tampão <i>Big Dye</i> 5x (fornecido pelo fabricante).....	2 µl
<i>Big Dye</i> (fornecido pelo fabricante).....	.2 µl
<i>Primer</i> direto ou reverso (5 mM/µl).....	1 µl
H <sub>2</sub> O ultra-pura.....	q.s.p. 10 µl

Ciclo geral da reação de seqüenciamento:

96 °C – 1 minuto

30 ciclos: { 96 °C – 10 segundos  
57 °C – 5 segundos  
60°C – 4 minutos }

Após a reação de seqüenciamento as amostras foram precipitadas com 80 µl de etanol 80% gelado e incubadas à temperatura ambiente por 15 minutos. Foi realizada, então, uma centrifugação de 45 minutos a 3.700 rpm, após a qual o sobrenadante foi descartado, sendo adicionado 150 µl de etanol 70% gelado. Uma nova centrifugação foi realizada com as amostras, desta vez por 10 minutos a 3.700 rpm. Para finalizar, o sobrenadante foi descartado e as amostras armazenadas a -20°C. O produto da reação de seqüenciamento purificado foi ressuspendido em 10 µl de *Hi-Di Formamide* (Applied Biosystem-Applera Corporation, Estados Unidos), sendo em seguida vigorosamente agitado e posteriormente desnaturado a 94°C por 5 minutos. As seqüências dos fragmentos amplificados foram obtidas em um seqüenciador automático *ABI PRISM 3700 DNA Analyzer* ou *ABI PRISM 310 DNA Analyzer* (Applied Biosystem-Applera Corporation, Estados Unidos).

As seqüências obtidas foram analisadas e comparadas com as seqüências normais dos genes com o auxílio dos programas *Chromas Lite*® ([http://www.technelysium.com.au/chromas\\_lite.html](http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html), versão reduzida de livre acesso) para visualização do eletroferograma e *Gene Runner*® v3.01 (<http://www.generunner.net/>, software livre) ou CLC Viewer 6.1 (CLC bio A/S, software livre) para comparação das

seqüências obtidas com a seqüência padrão do gene *PAX6* (*Ensembl*, no. ENSG00000007372).

#### **4.8- Reação de *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* – MLPA**

A técnica denominada *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (Amplificação de Múltiplas Sondas Dependente de Ligação) é um método sensível, econômico, rápido e simples, que visa a quantificação relativa, quanto ao número de cópias, de mais de 50 seqüências de ácidos nucleicos em um único experimento, sendo capaz de detectar deleções e duplicações de diversos genes, além de mutações de ponto conhecidas (Schouten *et al.*, 2002; Sørensen *et al.*, 2008).

Descrita por Schouten e colaboradores em 2002 e posteriormente comercializada pela empresa MRC Holland (143), a técnica de *MLPA* se baseia em um princípio simples, em que a amostra de DNA genômico é hibridizada a uma mistura de sondas, com amplificação posterior dos produtos de ligação por PCR, utilizando um par universal de *primers*. Os fragmentos finais são separados e lidos em aparelho de eletroforese capilar, sendo possível a quantificação relativa de cópias gênicas (Schouten *et al.*, 2002).

O método de *MLPA* é constituído por quatro fases: Desnaturação, Hibridização, Ligação e Amplificação. Nas duas primeiras fases, o DNA genômico é desnaturado a uma determinada temperatura e hibridizado a uma mistura de sondas (cada uma específica para a região a ser estudada). Cada sonda é formada por dois oligonucleotídeos, constituídos da seguinte maneira:

Oligonucleotídeo A: possui um tamanho variável de 50-60 pb e contém um marcador fluorescente (para reconhecimento), seguido de uma seqüência homóloga ao primer universal X (correspondendo à região pela qual esses *primers* universais serão anelados, posteriormente), além da seqüência de hibridização homóloga ao DNA-alvo.

Oligonucleotídeo B: possui um tamanho variável entre 60-450 pb e contém uma seqüência homóloga ao *primer* universal Y, seguido de uma seqüência-coringa (com extensão diferente para cada sonda, o que definirá o tamanho a partir do qual o fragmento final poderá ser diferenciado dos demais) e uma seqüência de hibridização homóloga ao DNA-alvo.

Esses oligonucleotídeos, quando submetidos à temperatura de anelamento, hibridizam-se a sequências complementares ao DNA-alvo e, a seguir, em temperatura ambiente, são unidos por uma enzima ligase dependente de temperatura (Fase de Ligação), formando um fragmento único.

Dessa forma, como resultados da reação de ligação são obtidos fragmentos únicos, com a seguinte disposição: fluoróforo – região de ligação ao *primer* universal – sequência complementar ao DNA alvo – sequência-coringa – região de ligação ao *primer* universal (Schouten *et al.*, 2002).

Após a ligação, inicia-se a fase de amplificação, na qual os fragmentos formados pelas duas sondas, agora unidas, são amplificados por PCR, utilizando-se *primers* universais que se anelam às sequências não-homólogas situadas nas duas extremidades dos produtos de ligação (Schouten *et al.*, 2002).

Em seguida, tais produtos são separados em aparelho de eletroforese capilar e podem ser analisados em relação aos controles sem alteração, a partir de programa específico de genotipagem. Dados de área ou altura de pico de cada produto de amplificação podem ser utilizados na normalização, e refletem o número relativo de cópias de cada sequência-alvo, permitindo, por exemplo, que o número de cópias localizadas nas extremidades cromossômicas que sofreram deleção ou duplicação seja identificado (Schouten *et al.*, 2002).

#### **4.8.1- Amostra inicial**

Inicialmente, para a padronização da técnica de MLPA, foram utilizadas amostras de DNAs de controles clinicamente sem alterações oftalmológicas e de controles do Laboratório de Genética Humana – CBMEG.

#### **4.8.2- Técnica de MLPA**

O kit utilizado para a realização deste experimento foi o SALSA MLPA P219-B1, composto por 43 sondas que geraram fragmentos de 130 pb a 463 pb, divididas em sete sondas de referência, 33 sondas para o braço curto do cromossomo 11, dessas, 13

específicas para o gene *PAX6* e, três sondas para o gene *SOX2*, localizado no cromossomo 3 (MRC-Holland, Amsterdã, Holanda; <http://www.mrc-holland.com>).

O protocolo utilizado encontra-se em conformidade ao descrito por Schouten *et al.*, (2002) com modificações mínimas.

#### **4.8.3- Desnaturação do DNA genômico e hibridização com sondas *SALSA MLPA***

O DNA genômico foi diluído com TE 1X para que atingisse a concentração final de 400 ng em 5 µL. Os DNAs diluídos foram aquecidos a 98°C e resfriados a 25°C, em seguida foi adicionada a mistura de 1,5 µl *SALSA Probe-mix* e 1,5 µl de *MLPA buffer* em cada tubo. Em seguida as amostras foram misturadas cuidadosamente e incubadas a 95°C por um minuto e 16 horas a 60°C no termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient (Eppendorf North America Inc) (Figura 13, ítem A e B).

#### **4.8.4- Reação de Ligação**

A temperatura do termociclador foi reduzida a 54°C, quando 32 µl de Mix Ligase-65 foram acrescentados a cada amostra, com posterior ressuspensão da mistura. Para a obtenção do Mix Ligase foram misturados 3 µl de Ligase-65 *buffer A*, 3 µl Ligase-65 *buffer B*, 25 µl de H<sub>2</sub>O e 1 µl Ligase-65.

Em seguida, as amostras permaneceram incubadas a uma temperatura de 54°C por 15 minutos e a 98°C por 5 minutos.

#### **4.8.5- Reações da PCR Multiplex**

Foram adicionados 4 µL 10X *SALSA PCR buffer*, 26 µl de H<sub>2</sub>O, 10 µl da reação de ligação de *MLPA* a novos tubos (para cada amostra), que ficaram mantidos em termociclador a 60°C.

Em seguida, 10 µl de *Mix Polymerase* foram acrescentados a cada tubo, para assim iniciar a reação de PCR, segundo o protocolo de 30 segundos-95°C; 30 segundos-60°C; 60

segundos-72°C, por 35 ciclos. Por fim, as amostras foram incubadas a 72°C, durante 20 minutos.

Para o *Mix Polymerase* foram necessários 2 µl de *SALSA PCR-primers*, 2 µl *SALSA Enzyme Dilution buffer*, 5,5 µl de H<sub>2</sub>O e 0,5 µl de *SALSA Polymerase*.

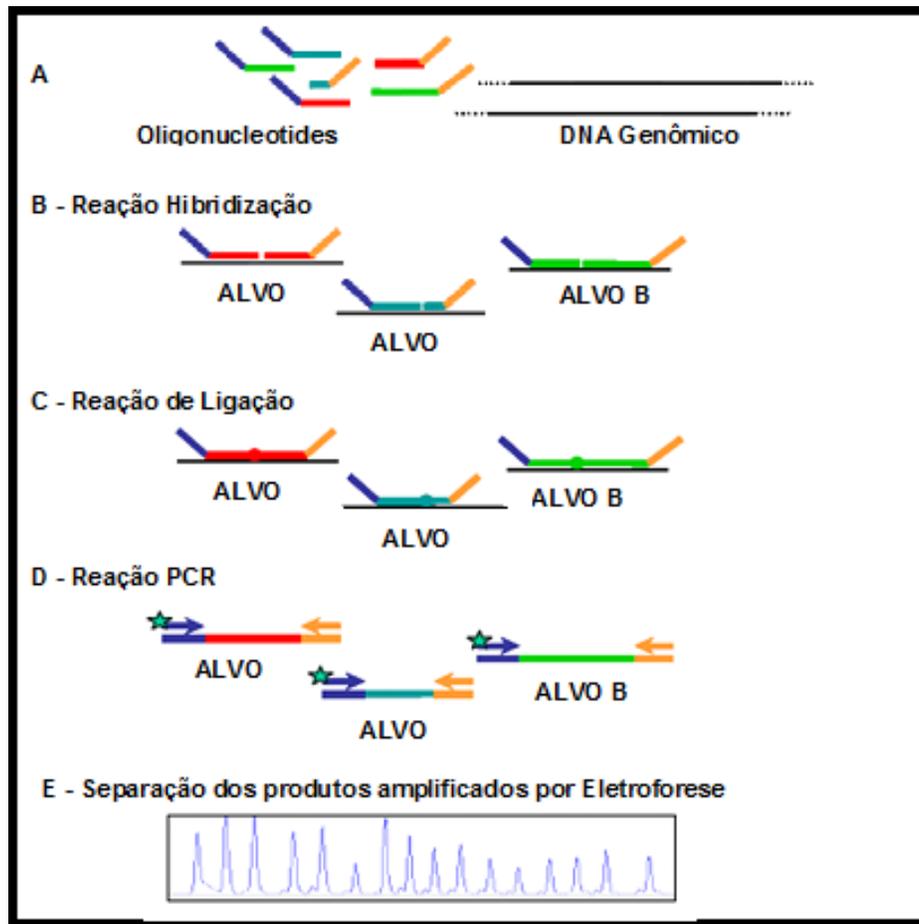


Figura 14: A) Oligonucleotídeos sintéticos que compõem o kit P219-B1 e DNA genômico; B) Hibridização adjacente dos pares de sondas de MLPA nas sequências alvo; C) Reação de Ligação onde ocorre a união das sondas adjacentes com a enzima ligase; D) Reação de PCR Multiplex amplificação com *primers* universais gerando 33 fragmentos de tamanhos diferentes, somente o *primer* direto é marcado com o corante FAM; E) Separação por eletroforese Capilar dos fragmentos amplificados.

#### 4.8.6- Separação dos produtos amplificados por eletroforese capilar

Os produtos de PCR foram identificados por meio do equipamento ABI-Prism 310 Genetic Analyser (Applied, Biosystems), com filtros de fluorescência específicos, seguindo o protocolo desenvolvido por MRC Holland b. v2; 1-6-2007: Salsa 6-FAM PCR primer-dNTP mix.

Posteriormente à reação de PCR foram misturados às amostras 0,75 µl da reação de PCR, 0,75 µL de água, 0,5 µL de 500 ROX, 13,5 µl Formamida Hi-Di, em seguida, desnaturados a 95°C por 5 minutos e resfriados em gelo. A leitura foi realizada no equipamento de eletroforese capilar ABI-Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems – Applera Corporation, Estados Unidos) com as seguintes configurações:

- Padrão Interno: conjunto de filtros D - 500ROX\* (ABI nr. 401734)
- Comprimento do capilar: 47 cm (ABI nr. 402839);
- Polímero: POP-4
- Tempo de eletroforese: 30 min;
- Voltagem de eletroforese: 15 kV;
- Temperatura de eletroforese: 60°C;
- Volume de preenchimento do capilar: 184 vezes;
- Voltagem de pré-eletroforese: 15 kV;
- Tempo de pré-eletroforese: 180 s;
- Voltagem de injeção: 3.0 kV;
- Tempo de injeção: 10-30 s;
- Tempo de espera: 1 s.

Os tamanhos dos fragmentos foram visualizados utilizando-se o *software* GeneScan (Applied Biosystems) (Figura 13, ítem E).

#### 4.8.7- Análise dos dados obtidos por MLPA

Foi utilizado o *software* Coffalyser MLPA DAT desenvolvido e recomendado pelo fabricante especialmente para a análise de várias amostras. É um *software* baseado em

planilhas do Microsoft Excel que pode ser usado com a versão 2003 ou superior do Microsoft Office. Todos os passos para a normalização dos dados estão incluídos além de correções para efeitos característicos da maioria das misturas de sondas que é o decréscimo na altura/área do pico dependente da sonda. Esse *software* é constantemente aprimorado e pode ser obtido gratuitamente no sitio WEB da empresa.

Tecnicamente, os dados foram normalizados dividindo-se a área do pico de cada sonda pela soma das áreas dos picos de todas as sondas na amostra. Em seguida, esse valor normalizado foi dividido pela área do pico da sonda correspondente, obtida a partir do DNA controle. Quando da presença de deleções e duplicações em heterozigose, os valores teoricamente serão de 0,5 e 1,5, respectivamente, se considerado 1,0 como valor normal.

## **V- RESULTADOS**

Inicialmente os pacientes e familiares, quando presentes, tiveram as seqüências do DNA genômico correspondentes aos *exons* e junções *exons-introns* analisadas por seqüenciamento, bem como parte das regiões 5'UTR e 3'UTR, utilizando os *primers* descritos na Quadro 2. O número 1 da numeração genômica aqui utilizada foi a partir da posição localizada no nucleotídeo 16.351 antes do códon de início da tradução ATG.

### 5.1- Mutação p.R240X

O estudo molecular revelou, na família 1, uma heterozigose para a troca nucleotídica C>T na posição g.28892 do gene *PAX6* no *exon 9* (Figura 14). Essa alteração provoca a troca do aminoácido 240 de uma arginina (CGA) por um *stop* códon (TGA) consistindo, portanto na mutação *nonsense* p.R240X.

Essa mutação foi encontrada no alelo materno e segrega em heterozigose com os indivíduos com fenótipo de Aniridia da família 1 (mãe, filha 1, filha 2 e filho).

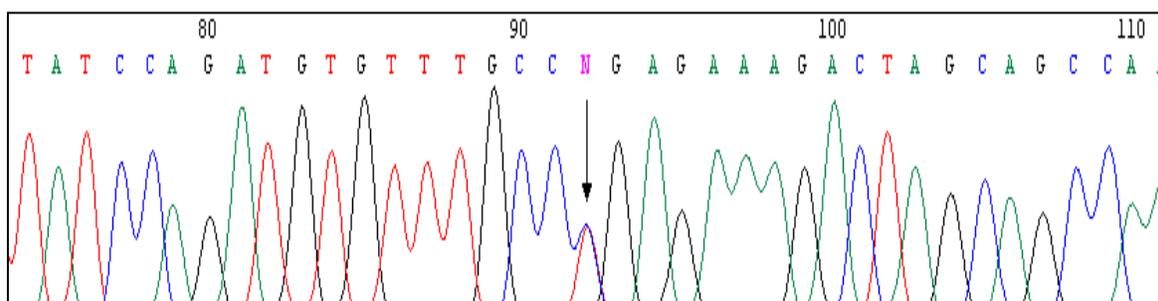


Figura 15: Eletroferograma de parte da seqüência do *exon 9* do gene *PAX6*. É mostrada a seqüência obtida da filha 2 da família 1. A seta denota a heterozigose g.28892C>T que provoca a mutação p.R240X.

Além da mutação p.R240X, foram identificadas variações nucleotídicas, algumas não descritas e outras que já constam no banco de SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) que é parte do *National Institutes of Health* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=snp>).

## 5.2- Alterações não descritas na literatura

Na amostra da mãe da família 1 as heterozigoses g.12083A>G e g.18914C>A no *exon* 2 e no *intron* 4 (Figuras 15 e 16), respectivamente, foram observadas. Ambas são alterações que não constam dos bancos de seqüências de SNPs nem foram descritas como alterações frequentes no gene *PAX6*. A troca g.12083A>G no *exon* 2 não foi encontrada em nenhum outro indivíduo da casuística. O seqüenciamento do *exon* 2 de 40 indivíduos controles, isto é, 80 alelos, demonstrou o genótipo A/A em todos, portanto essa variação é bastante rara.

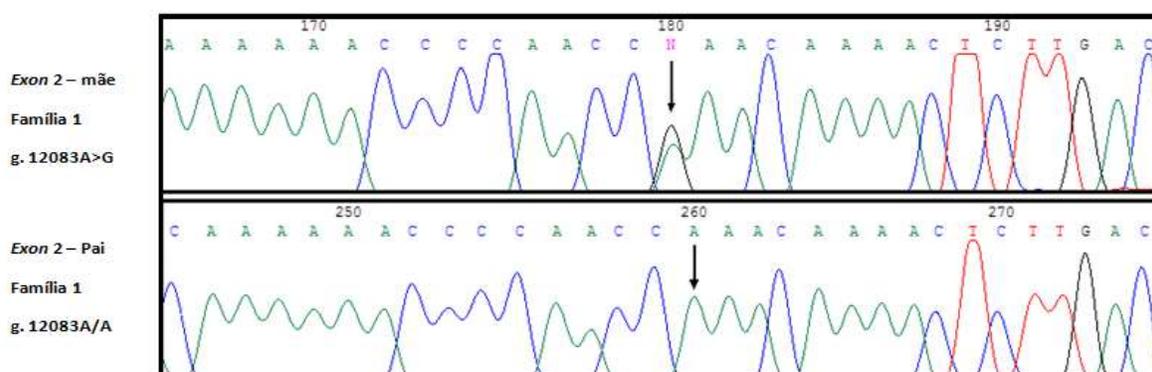


Figura 16: Eletroferograma de parte da seqüência do *exon* 2 do gene *PAX6*. A seta denota a heterozigose g.12083A>G em heterozigose na mãe da família 1 e no pai desta família observa-se a homozigose g.12083A.

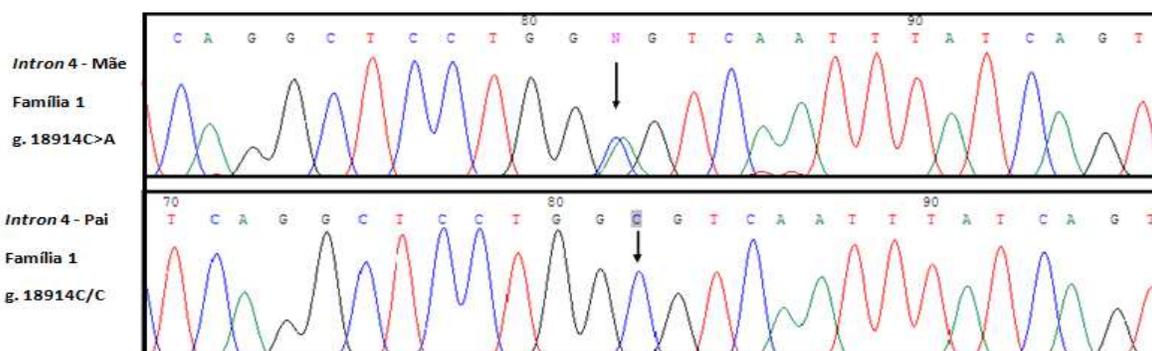


Figura 17: Eletroferograma de parte da seqüência do *intron* 4 do gene *PAX6*. A seta denota a heterozigose g.18914C>A na mãe da família 1; no pai desta família observou-se a homozigose g.18914C>C.

Além de encontrada na mãe da família 1, a transversão g.18914C>A no *intron* 4 foi observada em heterozigose também no paciente MG3. Essa troca nucleotídica foi investigada em 36 indivíduos controle perfazendo 72 alelos e o genótipo observado foi sempre C/C, indicando que essa variação, além de não ter sido encontrada em outros estudos, não é freqüente no Brasil.

Outra troca nucleotídica encontrada em heterozigose foi a transversão g.19207C>A no *intron* 4 do gene *PAX6* (Figura 17). Foi observada apenas no paciente MG3. Da mesma forma que as anteriores, essa alteração não apresenta registros na literatura e também nenhum outro genótipo de indivíduos da casuística demonstrou sua presença.

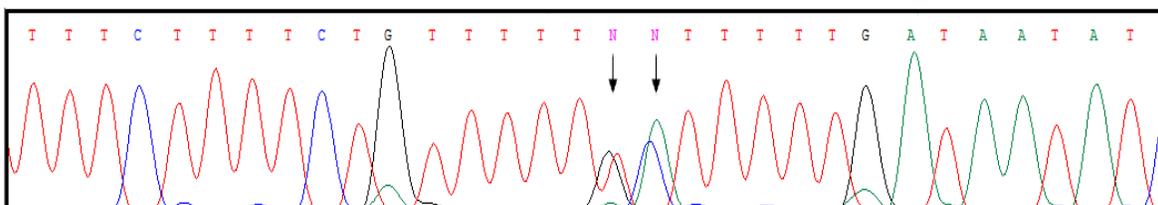


Figura 18: Eletroferograma de parte da seqüência do *intron* 4 do gene *PAX6*. É mostrada a seqüência obtida do paciente 3 portador da Síndrome *Morning Glory* (MG3). As setas denotam as heterozigoses g.19206T>G (SNP - rs3026368) e g.19207C>A (alteração não descrita) respectivamente.

No paciente MG3 foi observada a alteração na posição g.20130T>C do *intron* 4 do gene *PAX6* (IVS4-41T>C) (Figura 18).

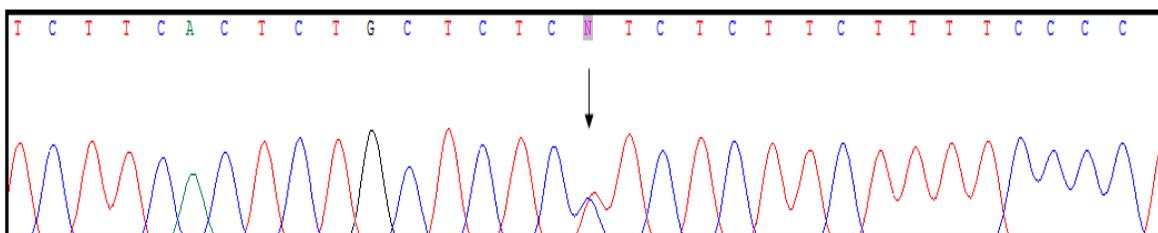


Figura 19: Eletroferograma de parte da seqüência do *intron* 4 do gene *PAX6*. É mostrada a seqüência obtida do paciente 3 com a Síndrome *Morning Glory* (MG3). A seta denota a alteração não descrita em heterozigose g.20130T>C (IVS4-41T>C).

Ainda se tratando de alterações não descritas, no paciente MG3 foi identificada a alteração IVS11+33T>A (g.29343T>A) em heterozigose (Figura 19). Na tentativa de estimar a frequência da alteração IVS11+33T>A, foi realizada a triagem no grupo controle, sendo que o total analisado de indivíduos desse grupo foi de 41. Porém essa alteração não foi encontrada nesses indivíduos o que sugere ser esta rara na população brasileira.

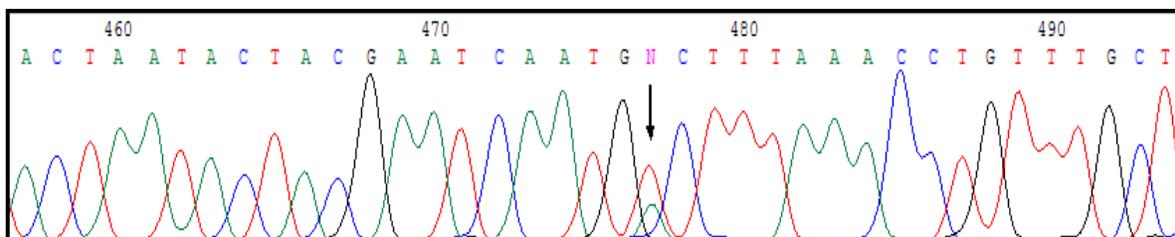


Figura 20: Eletroferograma de parte da sequência do *intron* 11 do gene *PAX6*. É mostrada a sequência obtida do indivíduo MG3. A seta denota a heterozigose g.29343T>A. (IVS11+33T>A), alteração ainda não descrita na literatura.

### 5.3- SNPs descritos na literatura

Variações nucleotídicas descritas e depositadas no banco de SNPs foram também aqui identificadas.

No que se trata de SNPs descritos na literatura foi observada a heterozigose g.5328G>C (SNP – rs7936522) no promotor P0 do gene *PAX6* (Figura 20). Essa troca nucleotídica foi observada no paciente esporádico de Aniridia (AN1).

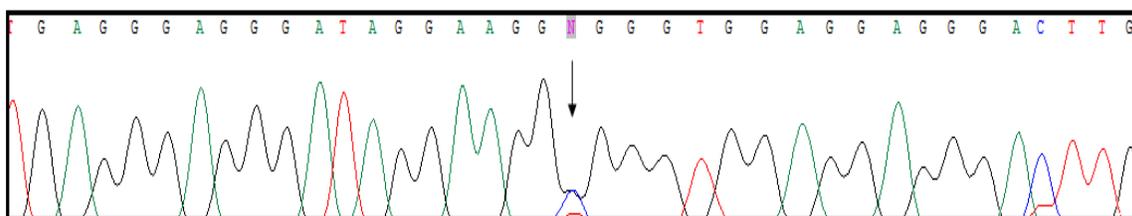


Figura 21: Eletroferograma de parte da sequência do promotor P0 do gene *PAX6*. A seta denota a heterozigose g.5328G>C (SNP – rs694617) no paciente AN4.

O estudo molecular do paciente MG1 revelou em heterozigose a alteração na posição g.12143G>A próxima ao sítio doador de *splicing* no *intron 2* (IVS2+9G>A) (Figura 21).

Assim, foi realizada a triagem do grupo controle em busca da frequência desta troca nucleotídica, sendo que o total analisado desse grupo foi de 40 indivíduos. Nessa triagem foram encontrados 38 indivíduos homozigotos G/G e 2 indivíduos heterozigotos G/A. Sendo que a frequência alélica encontrada foi de 97,5% de G e 2,5% de A.

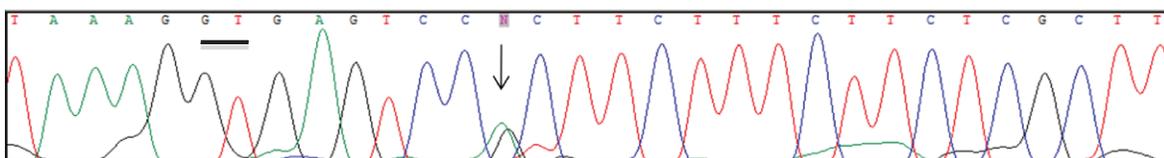


Figura 22: Eletroferograma de parte da sequência do *intron 2* do gene *PAX6*. É mostrada a sequência obtida do indivíduo MG1. A seta denota a heterozigose g.12143G>A, IVS2+9G>A (SNP – rs56139994); o GT sublinhado denota o sítio doador de *splicing* do *intron 2*.

Outras alterações em heterozigose foram reveladas pela análise molecular do gene *PAX6*. As transversões g.18992C>A (SNP - rs694617) (figura 22) g.19206T>G (SNP - rs3026368), as transições g.19403A>G (SNP - rs3026369) e g.19933G>A (SNP - rs3026371), e a deleção de uma guanina na posição g.119850\_19851delG (SNP - rs5790867), todas localizadas no *intron 4* do gene *PAX6*.

Os SNPs g.18992C>A e g.119850\_19851delG foram identificados em heterozigose no pai e na filha da família 2 (Figura 23), no SNP rs5790867 pode-se encontrar 2 ou 3Gs, sendo que a maioria dos indivíduos estudados apresentaram homozigose de 3Gs.

Além de identificadas nestes dois indivíduos, as mesmas duas alterações estavam presentes em outros da casuística. A heterozigose dos dois SNPs se apresentou nos pacientes MG1 e MG2 e no paciente isolado portador de Aniridia AN4.

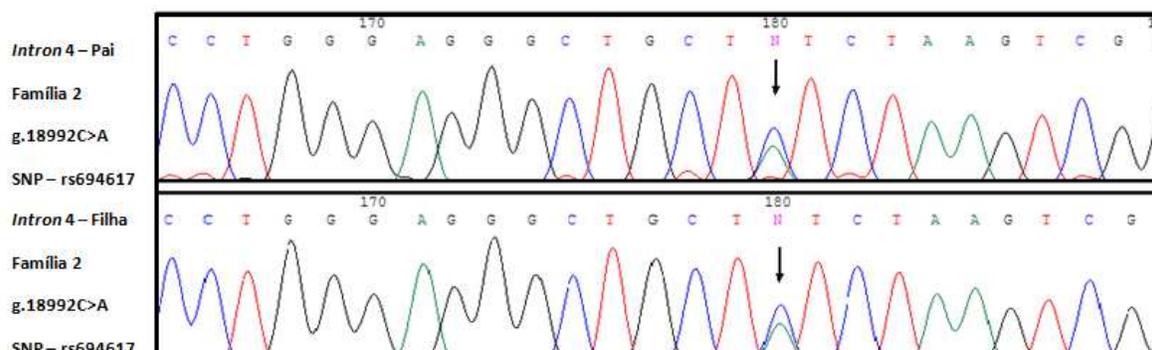


Figura 23: Eletroferograma de parte da seqüência do *intron 4* do gene *PAX6*. A seta denota a heterozigose g.18992C>A (SNP – rs694617) em heterozigose no pai e na filha da família 2.

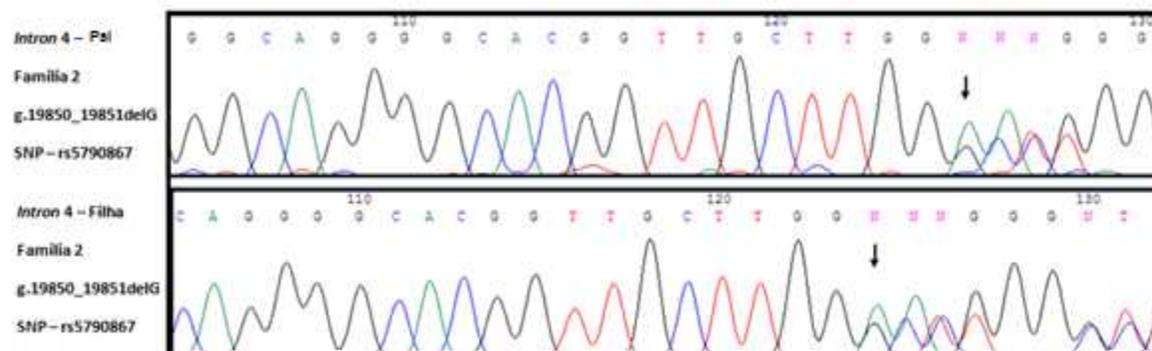


Figura 24: Eletroferograma de parte da seqüência do *intron 4* do gene *PAX6*. A seta denota a heterozigose g.19850\_19851delG (SNP – rs5790867) em heterozigose no pai e na filha da família 2.

Quando o SNP g.18992C>A foi triado em 38 indivíduos controles, foram identificados 28 homozigotos C/C e 10 heterozigotos C/A, estimando-se a freqüência de 87% para o alelo C e 13% para o alelo A.

Ainda no *intron 4* do gene *PAX6*, outras duas alterações se revelaram em heterozigose no paciente MG3, a alteração g.19206T>G e a g.19403A>G (respectivamente, SNP – rs3026368 e SNP – rs3026369) (Figuras 17 e 24).

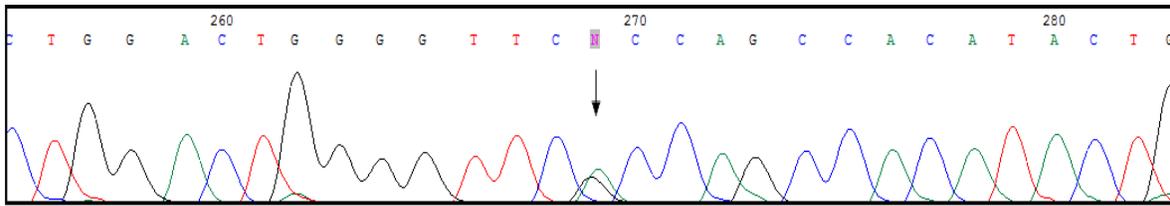


Figura 25: Eletroferograma de parte da seqüência do *intron 4* do gene *PAX6*. A seta denota a heterozigose g.19403A>G (SNP – rs3026369) em heterozigose no paciente MG3.

A inserção g.20902\_20903insA no *intron 5* foi identificada na mãe da família 1. Nesta posição há descrito um SNP de troca A>T (SNP - rs11031479) e nos 10 Ts que o antecedem há uma variação descrita como g.20892\_20893insA (SNP - rs35589851). No caso aqui descrito, no entanto, fica evidente que a variação é a inserção de um A entre os nucleotídeos g.20902\_20903, visto que foi melhor registrada no seqüenciamento com o primer antisense (figura 25).

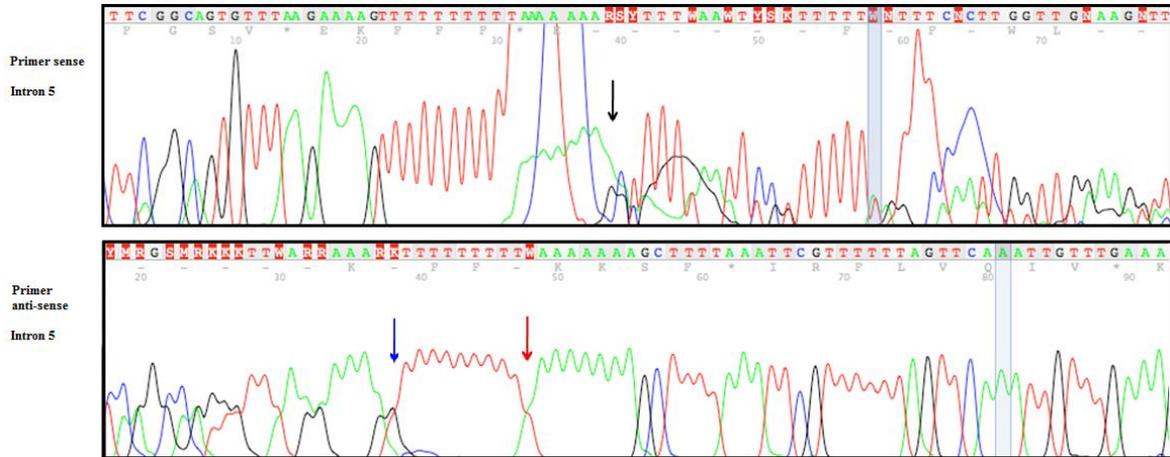


Figura 26: Eletroferograma de parte da seqüência do *intron 5* do gene *PAX6*. Pelo *primer sense*, a seta preta denota em heterozigose g.20902\_20903insA (alteração não descrita), porém pelo primer *anti-sense* a seta azul mostra em heterozigose a alteração g.20892\_20893insA (SNP - rs35589851), já a seta vermelha mostra a alteração A>T (SNP - rs11031479) na mãe da família 1 de Aniridia.

Variações em uma região microssatélite importante que pode estar associada a alterações no controle do mecanismo de *splicing* do gene *PAX6* foram identificadas. Essa região é composta por um STR (*short tandem repeat*) que está localizado no *intron* 9 do gene. A variação do número de repetições TG consta no banco de SNPs registrado sob o código SNP – rs10525266. Essa região é interrompida pelo dinucleotídeo GG seguida de outras sete repetições TG, é também conhecida como  $(TG)_nGG(TG)_7$ , onde n pode variar entre 19 e 29 repetições.

O paciente MG3 apresentou heterozigose de n que foi de 16 e 19 TGs em cada alelo. A heterozigose foi observada em todos os indivíduos, porém o paciente MG3 foi o único dos analisados que possui uma deleção da região seguinte ao SNP - rs10525266, sendo que seu genótipo é  $(TG)_{16}delGG(TG)_7/(TG)_{19}GG(TG)_7$ .

Os demais resultados com o número de repetições TG do SNP – rs10525266 estão demonstrados na tabela 1.

Essa variação foi analisada em 28 indivíduos do grupo controle e foram encontrados alelos variando de 16 a 20 repetições TG. Nenhum dos controles apresentou a deleção  $GG(TG)_7$  observada no paciente MG3. A frequência dos genótipos encontrados foi:

- ✓  $((TG)_{16/17} - GG - (TG)_7)$ : 7,14%
- ✓  $(TG)_{17/18} - GG - (TG)_7$ : 32,14%
- ✓  $(TG)_{18/19} - GG - (TG)_7$ : 32,14%
- ✓  $(TG)_{19/20} - GG - (TG)_7$ : 28,57%

A análise molecular desse gene também revelou variações de genótipos para a alteração g.28614A>T (SNP – rs2239789) no *intron* 9 do *PAX6* (Figura 26). Entre os pacientes da Síndrome de *Morning Glory* dois eram homozigotos A/A (MG1 e MG3), um heterozigoto A/T (MG2) e um homozigoto T/T (MG4). No grupo de pacientes com Aniridia o genótipo predominante foi A/A, com exceção da filha da família 2 e do filho da família 3 que apresentaram heterozigose A/T e da mãe da Família 2 que se revelou homozigota T/T.

Foi realizada a triagem do SNP - rs2239789 em 27 indivíduos do grupo controle e foi encontrada uma frequência alélica de 48,2% de A e 51,8% de T. Essa frequência mostrou-

se similar à encontrada na literatura onde a frequência dos alelos A e T são ambas de 50%.

As frequências dos genótipos foram:

- ✓ 7,40% A/A
- ✓ 81,48% A/T
- ✓ 11,12% T/T

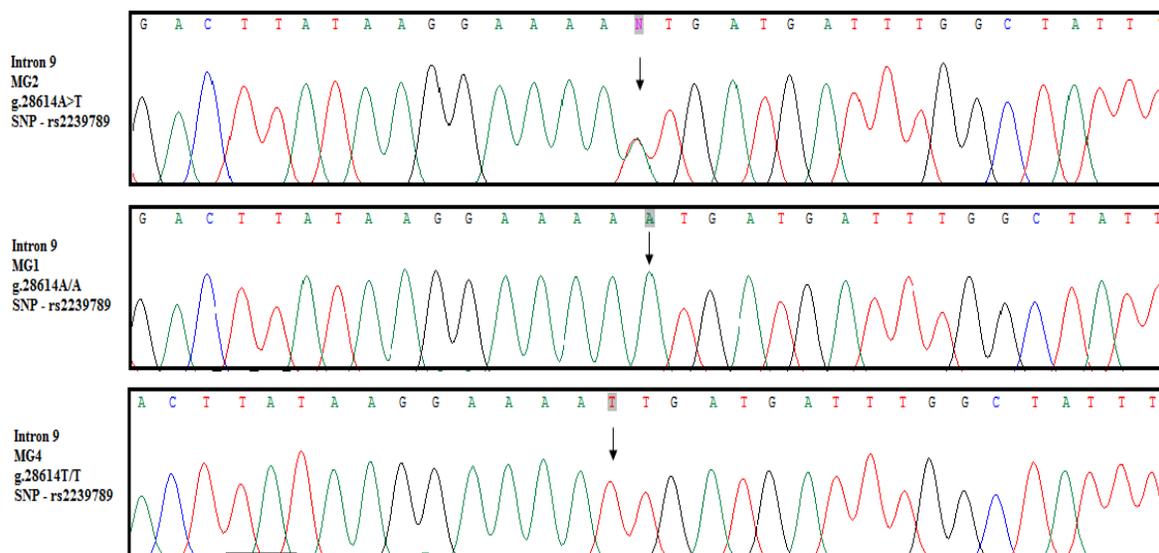


Figura 27: Eletroferograma de parte da sequência do *intron 9* do gene *PAX6*. A seta denota a heterozigose g.28614A>T (SNP - rs2239789). Em homozigose A/A no paciente MG1, em heterozigose A/T no paciente MG2 e em homozigose T/T no paciente MG4.

No *intron 10* do gene *PAX6* foi encontrada em heterozigose a troca g.29148C>T (SNP-rs667773), esta alteração foi achada no pai e na filha 2 da família 1 (Figura 27). O que sugere que esta filha não recebeu o mesmo alelo paterno que os outros dois irmãos (filha 1 e filho).

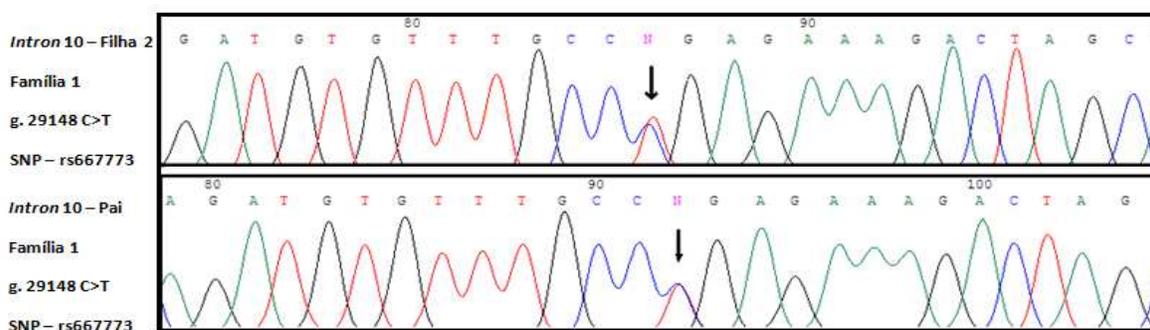


Figura 28: Eletroferograma de parte da seqüência do *intron* 10 do gene *PAX6*. A seta denota a heterozigose g.29148C>T (SNP – rs667773) em heterozigose na filha 2 e o pai da família 1.

Na triagem de 43 indivíduos controles foram identificados 39 homozigotos C/C, 2 heterozigotos C/T e dois homozigotos T/T produzindo uma freqüência alélica de 93% do alelo C e 3% do alelo T.

Outro SNP encontrado foi o g.32295T>G (SNP – rs3026393) no *intron* 13 do gene *PAX6*. Por estar localizado relativamente próximo ao sítio doador de *splicing* pode também ser denominado IVS13+43T>G. A alteração em heterozigose T/G foi identificada na filha da Família 2 (Figura 28), no filho da Família 3 e no paciente MG2. Por outro lado a homozigose G/G foi observada tanto no paciente MG4 quanto na mãe da família 2. Todos os outros indivíduos da casuística foram homozigotos T/T.

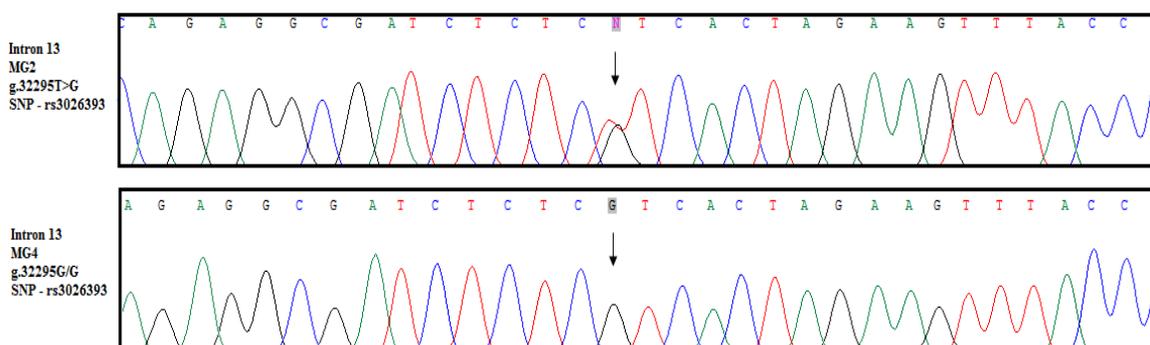


Figura 29: Eletroferograma de parte da seqüência do *intron* 13 do gene *PAX6*. As setas denotam a heterozigose g.32295T>G (SNP – rs3026393) no paciente MG2, enquanto no paciente MG4 observamos a homozigose G/G.

Também foi encontrado o SNP g.33384in-delT (SNP – rs11407950) na região 3'UTR do gene *PAX6*. Esta alteração foi encontrada em heterozigose nos pacientes MG1, MG3, MG4, na filha 1 e 2 da Família 1 e em todos indivíduos da Família 2.

A tabela 1 resume todas as variações encontradas e mostra uma estimativa de suas frequências no Brasil em comparação ao que se encontra descrito para outras populações.

Tabela 1 – Genótipos para as variações nucleotídicas e dados de frequências alélicas.

	P0	Exon 2	Intron 2		Intron 4				Intron 5			Intron 9		Intron 10	Intron 11	Intron 13
			IVS2+9G>A		C/C	C/C	T/T   C/C   A/A	+G/+G	IVS4-4T>C		STR-(TG) <sub>n</sub>		IVS10-12C>T	(IVS11+33T>A)	IVS13+43T>G	
AN1P	nd	A/A	G/G	C/C					C/C	T/T   C/C   A/A	+G/+G	A/G	T/T	(-A)	(TG) <sub>1016</sub> GG(TG) <sub>7</sub>	A/A
AN1M	nd	A/G	G/G	C/A	C/C	T/T   C/C   A/A	+G/+G	G/G	T/T	(+A)	(TG) <sub>1020</sub> GG(TG) <sub>7</sub>	A/A	C/C	T/T	nd	
AN1X1	nd	nd	nd	C/C	C/C	T/T   C/C   A/A	nd	nd	nd	(-A)	(TG) <sub>1016</sub> GG(TG) <sub>7</sub>	A/A	C/C	T/T	T/T	
AN1X2	nd	nd	nd	C/C	C/C	T/T   C/C   A/A	+G/+G	A/G	T/T	(-A)	(TG) <sub>1016</sub> GG(TG) <sub>7</sub>	A/A	T/C	T/T	T/T	
AN1Y	nd	nd	nd	C/C	C/C	T/T   C/C   A/A	+G/+G	G/G	T/T	(-A)	(TG) <sub>1016</sub> GG(TG) <sub>7</sub>	A/A	C/C	T/T	T/T	
AN2P	nd	A/A	G/G	C/C	C/A	T/T   C/C   A/A	-G/+G	G/G	T/T	(-A)	(TG) <sub>1016</sub> GG(TG) <sub>7</sub>	A/A	C/C	T/T	T/T	
AN2M	nd	A/A	G/G	C/C	C/C	T/T   C/C   A/A	+G/+G	G/G	T/T	(-A)	(TG) <sub>1020</sub> GG(TG) <sub>7</sub>	T/T	C/C	T/T	G/G	
AN2X	nd	A/A	G/G	C/C	A/C	T/T   C/C   A/A	-G/+G	G/G	T/T	(-A)	(TG) <sub>1021</sub> GG(TG) <sub>7</sub>	A/T	C/C	T/T	T/G	
AN3Y	G/G	A/A	G/G	C/C	C/C	T/T   C/C   A/A	+G/+G	G/G	nd	(-A)	(TG) <sub>1020</sub> GG(TG) <sub>7</sub>	A/T	C/C	T/T	T/G	
AN4	G/C	A/A	G/G	C/C	C/A	T/T   C/C   A/A	-G/+G	G/G	T/T	(-A)	(TG) <sub>1020</sub> GG(TG) <sub>7</sub>	A/A	C/C	T/T	T/T	
MG1	nd	A/A	G/A	C/C	C/A	T/T   C/C   A/A	-G/+G	G/G	T/T	(-A)	(TG) <sub>1021</sub> GG(TG) <sub>7</sub>	A/A	C/C	T/T	T/T	
MG2	nd	A/A	G/G	C/C	C/A	T/T   C/C   A/A	-G/+G	G/G	T/T	(-A)	(TG) <sub>1016</sub> GG(TG) <sub>7</sub>	A/T	C/C	T/T	T/G	
MG3	nd	A/A	G/G	C/A	C/C	T/G   C/A   A/G	+G/+G	G/G	T/C	(-A)	(TG) <sub>1016</sub> DelGG(TG) <sub>7</sub>   (TG) <sub>10</sub> GG(TG) <sub>7</sub>	A/A	C/C	T/A	T/T	
MG4	G/G	A/A	G/G	C/C	C/C	T/T   C/C   A/A	+G/+G	G/G	T/T	(-A)	(TG) <sub>1016</sub> GG(TG) <sub>7</sub>	T/T	C/C	T/T	G/G	
Posição Genômica <sup>1</sup>	g.5328G>C	g.12083A>G	g.12143G>A	g.18914C>A	g.18992C>A	g.19206T>G   g.19207C>A   g.19403A>G	g.119850_19851delG	g.19933G>A	g.20130T>C	g.20892_20893insA	g.28483-g.28556	g.28614A>T	g.29148C>T	g.24943T>A	g.27895T>G	
SNP <sup>2</sup>	rs7936522	não descrita	rs56139994	não descrita	rs694617	rs3026368   não descrita   rs3026369	rs5790867	rs3026371	não descrita	rs11031479	rs105252665	rs2239789	rs667773	não descrita	rs3026393	
Frequência -Brasil	.	100% A	97,5% G   2,5% A	100% C	84,2% C   15,8% A	100% T   100% C   100% A	.	.	.	.	7,14% (16/17)   32,14% (17/18)   32,14% (18/19)   28,57% (19/20)	48,2% A   51,8% T	93% C   7% T	100% T	.	
Frequência <sup>3</sup>	.	.	.	.	100% C <sub>4</sub>	-   -   -	.	.	.	.	.	50% A   50% T	.	.	50% T   50% G	

<sup>1</sup>Numeração baseada no Ensembl - ENSG00000007372 ([http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens))

<sup>2</sup>Número do SNP no banco de dados do NCBI-SNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>)

<sup>3</sup>Média de frequência do SNP para vários grupos populacionais

#### 5.4- Análise de MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*)

Subseqüentemente à análise dos indivíduos por seqüenciamento, foi realizada a genotipagem desses através da técnica de MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*). Foi interessante utilizar esta técnica, porque é útil para a identificação de deleções e duplicações. Como em doenças causadas por alterações no gene *PAX6* é freqüente a identificação de deleções e na maioria dos pacientes da nossa casuística não foram identificadas mutações que de imediato justificassem o fenótipo, a investigação de possíveis deleções no locus passou a ter grande relevância, mesmo que a heterozigose de vários SNPs não sugerisse a deleção direta do gene *PAX6*. Para isso foi utilizado o *SALSA<sup>®</sup> MLPA<sup>®</sup> Kit P219-B1 (PAX6)*, composto por 43 sondas, sendo que 33 sondas específicas para o cromossomo 11, três localizadas no cromossomo três específicas do gene *SOX2* e sete sondas de referência. Das 33 sondas no cromossomo 11, 13 são sondas específicas do gene *PAX6*.

##### 5.4.1- Alteração do gene *RCNI*

Após a normalização dos dados o filho da Família 1 e o filho da Família 3 apresentaram uma diminuição na sonda do *exon 1* do gene *RCNI*, indicando uma possível deleção dessa região. Porém não podemos afirmar que haja mesmo uma deleção na região dessa sonda, uma vez que a técnica de MLPA é bem sensível a mutações que podem interferir na fase de ligação da sonda ao DNA. As figuras 29 e 30 mostram os resultados obtidos com o *SALSA<sup>®</sup> MLPA<sup>®</sup> Kit P219-B1 (PAX6)* para esses dois pacientes.

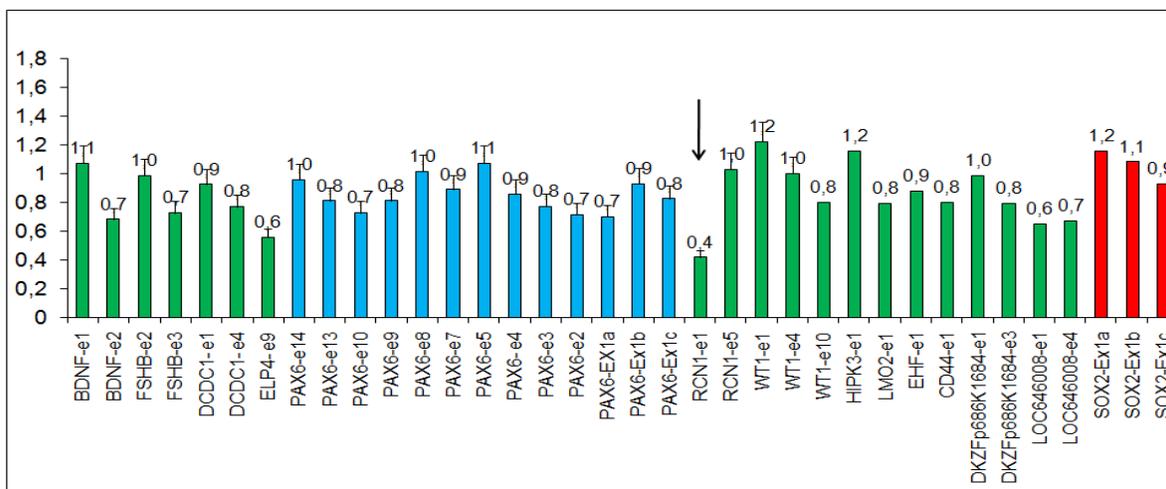


Figura 30: Resultados obtidos com o SALSA<sup>®</sup> MLPA<sup>®</sup> Kit P219-B1 (PAX6) para o filho da família 1 (AN1Y). Em verde mostramos sondas específicas localizadas no cromossomo 11, em azul mostramos sondas específicas para o gene PAX6 e em vermelho mostramos sondas para o gene SOX2 no cromossomo 3. A seta destaca uma possível deleção do exon 1 do gene RCN1.

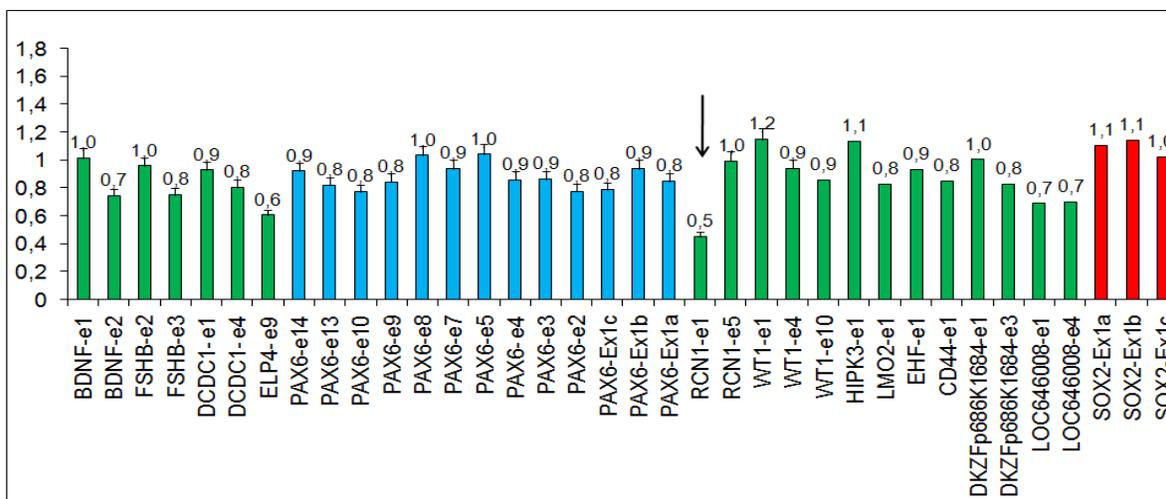


Figura 31: Resultados obtidos com o SALSA<sup>®</sup> MLPA<sup>®</sup> Kit P219-B1 (PAX6) para o filho da família 3 (AN3Y). Em verde mostramos sondas específicas localizadas no cromossomo 11, em azul mostramos sondas específicas para o gene PAX6 e em vermelho mostramos sondas para o gene SOX2 no cromossomo 3. A seta destaca uma possível deleção do exon 1 do gene RCN1.

### 5.4.2- Alteração do gene *ELP4*

Depois de normalizados os dados obtidos pela técnica de MLPA do paciente MG4 apresentaram uma diminuição na sonda referente ao *exon 9* do gene *ELP4*, indicando uma possível deleção dessa região. Porém, assim como nos casos anteriores onde há uma alteração no gene *RCN1*, não podemos afirmar que haja uma deleção na região dessa sonda, uma vez que a técnica de MLPA é sensível a mutações que podem interferir na fase de ligação da sonda ao DNA. A figura 31 mostra os resultados obtidos com o *kit* para análise de MLPA acima citado para o paciente MG4.

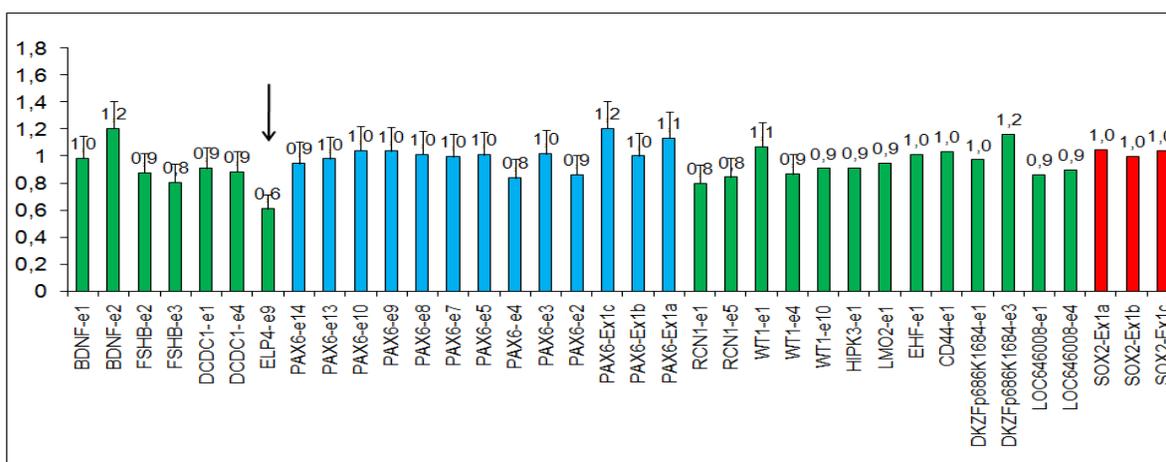


Figura 32: Resultados obtidos com o *SALSA® MLPA® Kit P219-B1 (PAX6)* para o paciente 4 MG4. Em verde mostramos sondas específicas localizadas no cromossomo 11, em azul mostramos sondas específicas para o gene *PAX6* e em vermelho mostramos sondas para o gene *SOX2* no cromossomo 3. A seta destaca uma possível deleção do *exon 9* do gene *ELP4*.

Os demais indivíduos analisados (AN4, MG1 e MG3) por esta técnica não apresentaram alterações que pudessem indicar possíveis deleções ou duplicações das regiões analisadas pelo *SALSA® MLPA® Kit P219-B1 (PAX6)* (Figuras 32, 33 e 34).

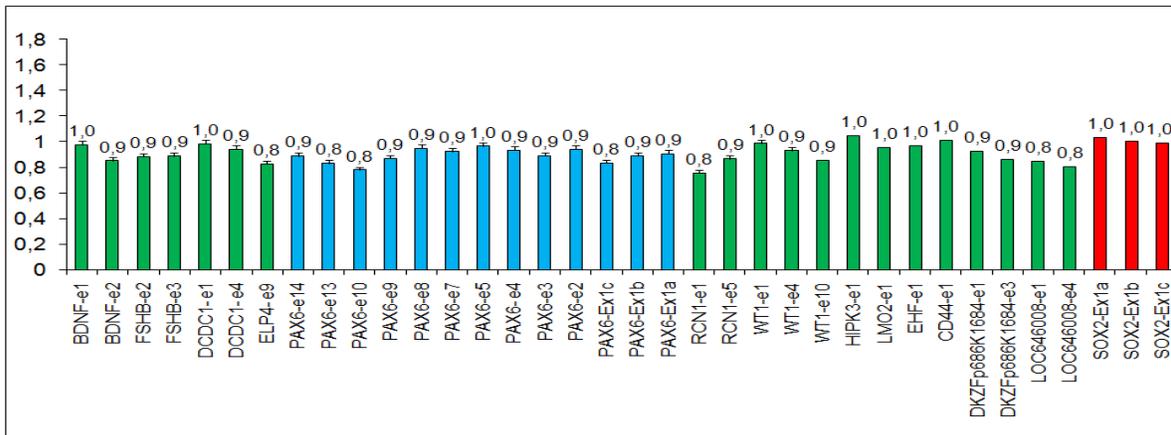


Figura 33: Resultados obtidos com o SALSA® MLPA® Kit P219-B1 (PAX6) para o paciente esporádico com Aniridia (AN4). Em verde mostramos sondas específicas localizadas no cromossomo 11, em azul mostramos sondas específicas para o gene PAX6 e em vermelho mostramos sondas para o gene SOX2 no cromossomo 3. Não observamos nenhuma alteração utilizando a técnica de MLPA neste paciente.

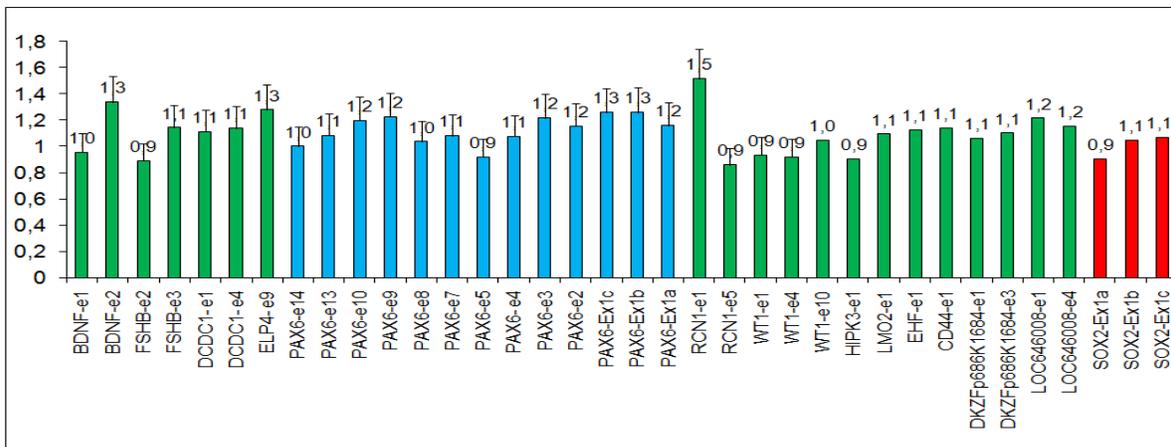


Figura 34: Resultados obtidos com o SALSA® MLPA® Kit P219-B1 (PAX6) para o paciente MG1. Em verde mostramos sondas específicas localizadas no cromossomo 11, em azul mostramos sondas específicas para o gene PAX6 e em vermelho mostramos sondas para o gene SOX2 no cromossomo 3. Não observamos nenhuma alteração utilizando essa técnica neste paciente.

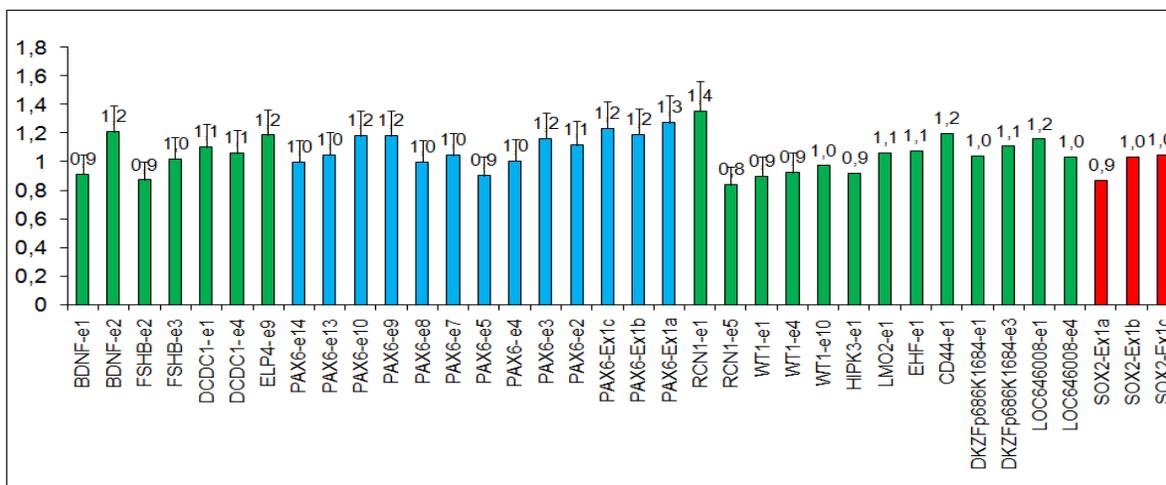


Figura 35: Resultados obtidos com o SALSA<sup>®</sup> MLPA<sup>®</sup> Kit P219-B1 (PAX6) para o paciente MG3. Em verde mostramos sondas específicas localizadas no cromossomo 11, em azul mostramos sondas específicas para o gene PAX6 e em vermelho mostramos sondas para o gene SOX2 no cromossomo 3. Não observamos nenhuma alteração utilizando essa técnica neste paciente.

## **VI- DISCUSSÃO**

## 6.1- Mutação p.R240X

Nesse estudo, uma mutação que leva a um *stop* códon foi identificada na Família 1 dos indivíduos com aniridia. A transição g.28892C>T é uma das mutações *nonsense* mais freqüentes associadas ao fenótipo de aniridia (Neethirajan *et al.*, 2006); sendo que mutações *nonsense* e mutações que levam a mudança no quadro de leitura são as categorias mais comuns de mutações conhecidas no gene *PAX6* (Tzoulaki *et al.*, 2005).

A mutação p.R240X está localizada no *homeodomain* (incluindo os códons 210-269), que é uma região do *PAX6* altamente conservada em diferentes espécies (Figura 35).

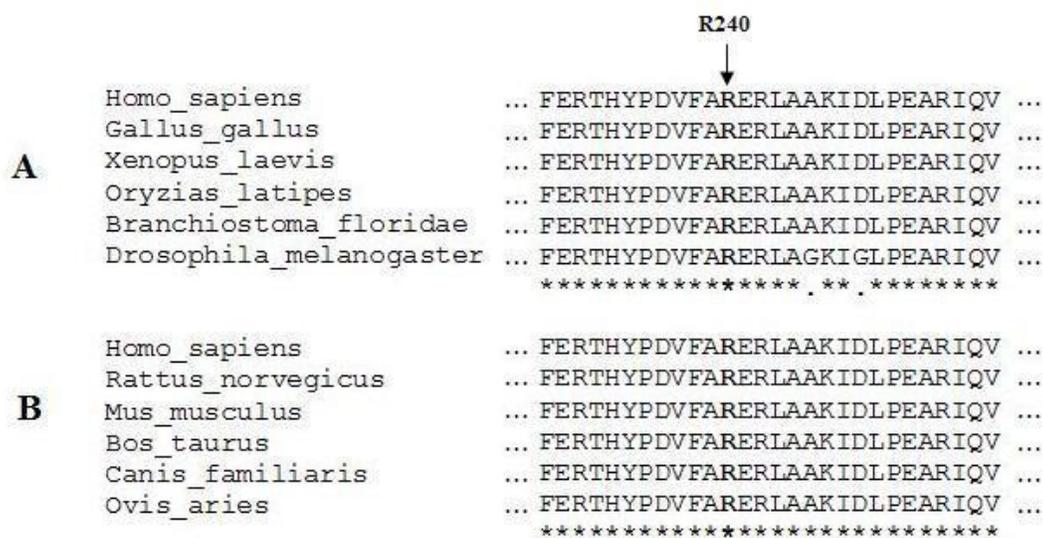


Figura 36: Alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína *PAX6* humana com outras espécies (A) e o alinhamento com mamíferos (B). As seqüências Uniprot são: P26367 *Homo sapiens*; P47237 *Gallus gallus*; Q91886 *Xenopus laevis*; O73917 *Oryzias latipes*; O61992 *Branchiostoma floridae*; O18381 *Drosophila melanogaster*; Q58IJ3 *Ovis aries*; P63015 *Mus musculus*; P63016 *Rattus novergicus*; Q1LZF1 *Bos taurus*; A4UHF5 *Canis familiaris*. O aminoácido afetado pela mutação R240X está mostrado em negrito (**R**) e indicado pela seta.

Além disso, a mutação p.R240X interrompe a proteína PAX6 logo depois da primeira  $\alpha$ -hélice do *homeodomain* (Glaser *et al.*, 1992). Esse *stop* códon prematuro leva à perda de 16 aminoácidos no HD e de toda a região PST. Entretanto a perda dessa região causa uma alteração grave na formação do transcrito. A região PST é rica em aminoácidos prolina, serina e treonina e por isso recebe esse nome, e tem uma função importante como fator transcricional (Glaser *et al.*, 1992).

Além disso, as conseqüências funcionais da produção de um mRNA com um *stop* códon prematuro pode ativar um mecanismo de degradação *in vivo* como o *nonsense-mediated mRNA decay* no citoplasma (Vincent *et al.*, 2003; Yuan *et al.*, 2007).

A alteração p.R240X foi descrita pela primeira vez na população Americana (Glaser *et al.*, 1992). Nosso trabalho encontrou essa mutação segregando em 4 indivíduos com fenótipo de aniridia da Família 1. Sugere-se que a ocorrência dessa mutação se deve a uma região de alta susceptibilidade CpG que causaria a transição C>T. Além disso, essa hipótese pode ser confirmada ao se observar a mutação p.R240X em diferentes grupos étnicos, incluindo americanos, europeus, japoneses, chineses e indianos e totalizando 12% de todas as mutações do *PAX6* reportadas (Glaser *et al.*, 1992; Hanson *et al.*, 1993; Kondo-Saitoh *et al.*, 2000; Song *et al.*, 2005; Neethirajan *et al.*, 2003 and Neethirajan *et al.*, 2006).

A mutação p.R240X já foi descrita tanto em casos familiares quanto em casos esporádicos de aniridia, sendo descrita em uma família da Índia com aniridia bilateral (Neethirajan *et al.*, 2006) e também em um caso esporádico de aniridia proveniente da mesma população (Neethirajan *et al.*, 2003).

A maioria dos pacientes portando a mutação p.R240X compartilha algumas características clínicas como aniridia bilateral, nistagmo, opacificação corneana, catarata e ausência de glaucoma. Hipoplasia da fóvea não é um achado comum nesses indivíduos.

Desse modo a mutação p.R240X no gene *PAX6* que já foi descrita previamente em diferentes grupos étnicos, foi pela a primeira vez encontrada em pacientes brasileiros (Robinson *et al.*, 2008; Redeker *et al.*, 2008), neste que é o primeiro trabalho de avaliação do gene *PAX6* em pacientes com aniridia no Brasil. A avaliação oftalmológica dessa família mostrou fenótipos similares aos descritos em outras populações incluindo nistagmo, opacificação corneana e catarata, sem a presença de glaucoma ou hipoplasia macular.

## 6.2- Alterações não descritas

### 6.2.1- Alteração g.12083A>G e g.18914C>A

Foram identificadas durante a análise por seqüenciamento do gene *PAX6* as alterações g.12083A>G e g.18914C>A no *exon 2* e no *intron 4* respectivamente, ambas são alterações não descritas. Essas alterações foram encontradas em heterozigose na mãe da Família 1. Nenhum dos filhos dessa família possui essas alterações indicando assim que todos receberam o mesmo alelo materno, alelo ligado à mutação p.R240X.

A troca g.12083A>G no *exon 2* não foi encontrada em nenhum outro indivíduo da casuística. O seqüenciamento do *exon 2* de 40 indivíduos controles, isto é, 80 alelos, demonstrou o genótipo A/A em todos, portanto esta variação é bastante rara na população brasileira.

A alteração não descrita g.18914C>A do *intron 4* também foi encontrada em heterozigose no paciente MG3.

Essa troca nucleotídica foi investigada em 36 indivíduos controle perfazendo 72 alelos e o genótipo observado foi sempre C/C, indicando que essa variação, além de não ter sido encontrada em outros estudos, não é freqüente no Brasil.

Estudos adicionais podem nos esclarecer possíveis correlações dessas alterações com o fenótipo desses indivíduos.

### 6.2.2- Alteração g.19207C>A e g.20130T>C

Foi encontrada a alteração g.19207C>A no *intron 4* do gene *PAX6*. Essa alteração se trata de outra alteração não descrita descoberta durante a realização desse estudo. Encontrase uma base depois do SNP - rs3026368. Essa alteração em heterozigose está presente no paciente MG3 e nenhum outro indivíduo da nossa casuística apresentou a variante A.

O mesmo paciente MG3 apresentou também a alteração inédita g.20130T>C no *intron 4* do gene *PAX6*. Essa alteração, também denominada IVS4-41T>C, poderia interferir no processo de *splicing* já que se encontra próxima a região de reconhecimento do spliceossoma. Mutações que afetam o mecanismo de *splicing* foram demonstradas como

sendo responsáveis por uma parte das alterações no gene que causam alguma patologia (Teraoka *et al.*, 1999; Ars *et al.*, 2000), porém estimativas mais recentes sugerem que essas alterações possam representar a causa mais freqüente de doenças hereditárias (Lopez-Bigas *et al.*, 2005).

Nenhum outro indivíduo apresentou essa alteração na nossa casuística, demonstrando assim, se tratar de duas alterações raras.

### 6.2.3- Alteração g.20902\_20903insA

A inserção g.20902\_20903insA no *intron* 5 foi identificada na mãe da Família 1. Nesta posição há descrito um SNP de troca A>T (SNP - rs11031479) e nos 10 Ts que o antecedem há uma variação descrita como g.20892\_20893insT (SNP - rs35589851). Entretanto, no caso aqui descrito, fica evidente que a variação é a inserção de um A entre os nucleotídeos g.20902\_20903, visto que foi melhor registrada no seqüenciamento com o primer antisense. Portanto, aparentemente, a inserção g.20902\_20903insA trata-se de uma alteração descrita pela primeira vez.

Considerando que as duas alterações acima discutidas em conjunto com a inserção g.20902\_20903insA formem um haplótipo raro, poder-se-ia imaginar que este alelo presente em heterozigose composta com a mutação p.R240X no genótipo da mãe na família 1 teria uma manifestação biológica. Embora se encontre na parte não-codificante do gene *PAX6*, um possível fenótipo diferencial, como por exemplo, a opacificação corneana e também uma perda visual mais grave (Casuística, Quadro 1) em relação aos filhos, poderia correlacionar essas alterações a possíveis alterações funcionais do *PAX6*.

### 6.2.4- Alteração IVS11+33T>A

Ainda no paciente MG3 encontramos em heterozigose uma alteração na posição g.29343T>A ainda não descrita no *intron* 11 do gene *PAX6*, a IVS11+33T>A. Da mesma forma esta troca nucleotídica está próxima do sítio doador de *splicing* o que poderia sugerir uma interferência neste processo.

A remoção de *introns* do pré-mRNA pelo mecanismo de *splicing* é uma etapa crítica na expressão gênica de eucariotos. O *splicing* do pré-mRNA é mediado por seqüências

conservadas, mas altamente degeneradas nos sítios de *splicing*. Além dessas seqüências, para o reconhecimento preciso de *exons* e *introns* pelo spliceossomo é necessário sinais auxiliares que reprima ou promovam o *splicing*, denominados silenciadores de *splicing* (ESSs/ISSs) ou acentuadores (ESEs/ISEs). Além dos contatos diretos com fatores de ação *trans*, ESSs, ISSs, ESEs e ISEs podem influenciar o *splicing* através de alterações da estrutura secundária do RNA, modificando seu acesso ao pré-mRNA ou suas interações com outros (Buratti e Barelle, 2004).

O conceito da existência de sinais auxiliares para *splicing* que exercem um papel importante na regulação de *splicings* constitutivos e alternativos para formação do mRNA, embora não muito esclarecido, reforça a suposição de que alterações nucleotídicas em *introns* possam induzir a formação de sítios de *splicing* crípticos ou *de novo* (Kralovicova *et al.*, 2004; 2007). Assim, por não ter sido encontrada na triagem do grupo controle composto por indivíduos considerados oftalmologicamente normais, poder-se-ia imaginar que a troca IVS11+33T>A isoladamente ou em conjunto com as outras duas alterações observadas apenas neste indivíduo estaria de alguma forma relacionada ao fenótipo de *Morning Glory* observado, contudo estudos adicionais são necessários para verificar como essas alterações estariam interferindo na formação dos transcritos.

### 6.3- SNPs (*single nucleotide polymorphisms*)

#### 6.3.1- SNP – rs56139994 (IVS2+9G>A)

Conforme descrito nos resultados, o estudo molecular do paciente MG1 revelou em heterozigose a alteração IVS2+9G>A, esta alteração foi encontrada por Dansault *et al.* em um paciente com microftalmia associada com microcórnea congênita bilateral (Dansault *et al.*, 2007) e mais tarde incluída no banco de dados de SNPs com a nomenclatura SNP – rs56139994. Esta alteração não foi encontrada nos indivíduos controle do estudo desse grupo que, portanto, consideram-na tanto uma mutação quanto um polimorfismo raro (Dansault *et al.*, 2007). Durante a análise molecular do gene *PAX6*, a IVS2+9G>A no presente estudo, foi identificada no indivíduo MG1 e, até o momento, nenhuma outra alteração que explicasse o fenótipo desse indivíduo foi encontrada. Porém, no grupo

controle, dois indivíduos foram heterozigotos para a alteração IVS2+9G>A o que teoricamente afastaria a hipótese de um significado biológico mais expressivo para esta troca nucleotídica, embora esteja também muito próxima ao sítio doador de *splicing*. No entanto, os *exons* 2 e 3 que flanqueiam o *intron* 2 onde a alteração está localizada não são *exons* codificantes, estão presentes em alguns transcritos e são provavelmente importantes para o processo de tradução.

Desta forma não se pode descartar completamente a possibilidade de que esta alteração no *intron* 2 possa estar associada ao fenótipo, porém há a necessidade de realizar experimentos para verificar se há formação de um transcrito alterado. Estes experimentos permitiriam detectar possíveis anormalidades produzindo *splicings* alternativos, e verificar alterações na sequência e tamanho dos transcritos do *PAX6* (Dansault *et al.*, 2007). A elucidação de alterações intrônicas necessitaria tanto de estudos com o DNA genômico quanto de mRNA.

### 6.3.2- SNP – rs7936522

Na região promotora, foi encontrada a alteração g.5328G>C na região P0 do gene *PAX6* (SNP – rs7936522). Essa troca foi encontrada no paciente AN4.

A expressão do gene *PAX6* é principalmente controlada por dois promotores conhecidos como PA e PB (Okladnova *et al.*, 1998, Anderson *et al.*, 2002; Pinson *et al.*, 2006). Estudos demonstraram que proteínas *PAX6* podem regular a expressão do próprio gene (Pinson *et al.*, 2006). Construções repórteres dirigidas pelos promotores do gene *PAX6* têm sua atividade aumentada quando induzidas por homólogos da proteína *PAX6* (Plaza *et al.*, 1993 e Plaza *et al.*, 1995). A troca encontrada no paciente AN4 está dentro do *intron* 1B que se segue à região considerada como *exon* 1B, mas consta como SNP conhecido e, assim, torna-se difícil supor que possa ser isoladamente responsável pelo fenótipo neste caso. Além disso, não contam dados de frequências populacionais e, também, não pode ser avaliada nem na casuística toda, nem nos controles do presente estudo.

### 6.3.3- SNP - rs694617, SNP – rs5790867, SNP – rs3026368, SNP – rs3026369

Localizadas no *intron 4* do gene *PAX6*, foram reveladas em heterozigose pela análise molecular as transversões g.18992C>A (SNP - rs694617), g.19206T>G (SNP - rs3026368), as transições g.19403A>G (SNP - rs3026369) e g.19933G>A (SNP - rs3026371), e a deleção de uma guanina na posição g.119850\_19851delG (SNP - rs5790867).

Os SNPs g.18992C>A e g.119850\_19851delG foram identificados em heterozigose no pai e na filha da Família 2, onde no SNP rs5790867 pode-se encontrar 2 ou 3Gs, sendo que a maioria dos indivíduos analisados durante a realização do estudo apresentaram homozigose de 3Gs. Outra observação que deve aqui ser colocada é que, inicialmente, a Família 2 havia sido incluída em nossa casuística para estudo do gene *PAX6*, porém o diagnóstico de aniridia não estava completamente definido. Uma análise clínica posterior revelou que esta família apresentava a síndrome de Axenfeld-Rieger associada à distrofia corneana endotelial (distrofia endotelial de Fuchs). Embora a Síndrome de Axenfeld-Rieger esteja fortemente associada aos genes *PITX2* e *FOXC1*, há relatos de alterações no gene *PAX6* (Riise *et al.*, 2001), o que não invalidou o estudo aqui apresentado.

Além de encontradas no pai e na filha da Família 2, encontramos essas alterações em outros indivíduos da nossa casuística. A alteração g.18992C>A (SNP - rs694617) juntamente com a inserção g.119850\_19851delG (SNP - rs5790867) foram encontradas em heterozigose também nos pacientes MG1 e MG2 e no paciente AN4. Aparentemente, as duas alterações estão associadas formando um haplótipo uma vez que não se identificou nenhum indivíduo da casuística que portasse apenas um desses SNPs. Porém não podemos afirmar que essas alterações estejam ligadas à condição desses indivíduos. Visto que não há estudos populacionais para esses SNPs, o SNP g.18992C>A foi triado em 38 controles, onde foram identificados 28 indivíduos homozigotos C/C e 10 indivíduos heterozigotos C/A, estimando-se a frequência de 87% para o alelo C e 13% para o alelo A. No entanto, não foi possível a triagem do SNP g.119850\_19851delG no grupo controle para a confirmação da hipótese de que variante A no SNP g.18992C>A esteja ligada à variante delG do SNP g.119850\_19851delG formando assim um haplótipo.

Duas outras alterações em heterozigose foram identificadas no *intron 4* do gene *PAX6* do paciente MG3, a alteração g.19206T>G e a g.19403A>G (respectivamente SNP –

rs3026368 e SNP – rs3026369). Assim como a maioria dos SNPs do gene *PAX6*, essas duas alterações não possuem estudos populacionais para comparação. O que podemos afirmar é que não foram detectadas em nenhum outro indivíduo da casuística, nem nos 39 controles analisados. Portanto, pode-se considerá-las variações raras.

#### 6.3.4- Repetições TG

No gene *PAX6* encontramos uma região microssatélite (TG)<sub>n</sub> (SNP - rs10525266) no *intron* 9, onde o número normal de repetições varia entre 19 e 29. Essa região é seguida por um dinucleotídeo GG e por uma repetição de sete TGs, região conhecida também como (TG)<sub>n</sub>GG(TG)<sub>7</sub>. Nosso estudo analisou tanto os indivíduos afetados quanto os indivíduos controle. Como apresentado anteriormente o número de repetições TG variou entre 16 e 20 nos indivíduos controle e nos indivíduos afetados a variação ficou entre 16 e 21 repetições TG.

Porém o indivíduo MG3 apresentou o genótipo (TG)<sub>16</sub>delGG(TG)<sub>7</sub>/(TG)<sub>19</sub>GG(TG)<sub>7</sub>. Esse indivíduo foi o único a apresentar a microdeleção do dinucleotídeo GG e da região (TG)<sub>7</sub>.

A evolução dos organismos foi significativamente facilitada pela duplicação de genes e genomas e seguidos por diversificação (Meyer e Schart, 1999; Wagner, 2002). A duplicação gênica por si produz apenas duas cópias gênicas idênticas. Porém, eventos posteriores tais como mutações, deleções e inserções podem levar uma das cópias a desempenharem uma nova função. Este mecanismo pode levar à criação de famílias gênicas capazes de desempenhar diversas funções (Wagner, 2002; King e Stansfield, 1990).

A disponibilidade da seqüência do genoma humano permitiu a pesquisa de uma importante classe de elemento funcional chamada repetição (TG/CA)<sub>n</sub>.

As análises da distribuição de repetições (TG/CA)<sub>n</sub> dentro das famílias gênicas podem elucidar os fatores que dirigem sua abundância e distribuição seletiva. Embora as propriedades características das repetições (TG/CA)<sub>n</sub> que exibem polimorfismo de tamanho sejam amplamente usadas no mapeamento genético (Dib *et al.*, 1996), um número crescente de evidências acumuladas ao longo de anos apontam para seus múltiplos papéis funcionais em processos biológicos.

As repetições (TG/CA)<sub>n</sub> têm a propensão de sofrer transições estruturais (Brahmachari *et al.*, 1995; Tripathi e Brahmachari, 1991) e têm sido mostradas como moduladores da transcrição de diversos genes como a lactalbumina e prolactina de rato (Meera *et al.*, 1989; Neylor e Clark, 1990), *EGFR* (Gebhardt *et al.*, 1999) e genes *housekeeping* humanos (Sharma *et al.*, 2003). Além disso, repetições (TG)<sub>n</sub> foram observadas estimulando a recombinação e o *splicing* do mRNA (Dutreix *et al.*, 1997; Majewski e Ott, 2000; Gabellini, 2001).

O *splicing* de RNA é o processo pelo qual células de eucariotos criam mRNAs funcionais a partir de precursores de RNA. Este processo requer uma precisa identificação, excisão e ligação de muitas seqüências relativamente curtas denominadas *exons* que são conservadas no transcrito maduro. Ao menos quatro elementos garantem que os *exons* sejam reconhecidos e processados precisamente pelo spliceossomo, são eles locais de *splice* altamente conservados nas regiões 5' e 3', um ponto de quebra menos conservado e uma região polipirimidina. Porém existe uma crescente avaliação por outros sinais de *splicing*.

Repetições dinucleotídicas constituem outra família de seqüências que influenciam o *splicing* (Gabellini, 2001). Devido a sua abundância, essas repetições ocorrem dentro de genes, por isto esta família de seqüências tem o potencial de afetar o *splicing* de muitos genes. Além disso, a natureza polimórfica desses elementos pode levar a efeitos variáveis no *splicing* de RNA. Por exemplo, a variação em número de dinucleotídeos CA em uma repetição do *intron* 13 do gene eNOS (*endothelial nitric oxide synthase*) que está associado com a variação do *splicing* do RNA, estabilidade do mRNA e com o risco de doenças arteriais coronarianas (Hui *et al.*, 2003; Hui *et al.*, 2003b).

Uma repetição dinucleotídica bem estudada que afeta a eficiência do *splicing* está localizada no *intron* 8 do gene *CFTR* (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*). Uma repetição de 9-13 TGs fica imediatamente a 5' de uma região polimórfica de politimidina na região 3' do sítio de *splicing* do *exon* 9 do gene *CFTR* (Chu *et al.*, 1993). O *splicing* ineficiente do *exon* 9 se deve a uma variante abreviada da região de politimidina chamada 5T que foi associada à fibrose cística (Kiesewetter *et al.*, 1993; Zielenski *et al.*, 1995). Diversas evidências indicam que a variação de número de repetições TG influencia na eficiência do *splicing* do *exon* 9 do gene *CFTR*. A primeira delas correlaciona o número

de repetições TG com o nível de *splicing* no *exon 9* dos transcritos do *CFTR* em cultura de células do epitélio nasal (Cuppens *et al.*, 1998). A segunda evidência correlaciona o número de repetições TG com a condição da doença entre indivíduos portando uma grave mutação em um alelo e a região 5T em *trans* (Cuppens *et al.*, 1998; Groman *et al.*, 2004). Regiões de repetições TG de 12 ou 13 dinucleotídeos são associadas com a ausência de vasos deferentes ou à forma não-clássica da fibrose cística, considerando que repetições com 11 dinucleotídeos são mais comuns em indivíduos não afetados.

Além disso, diversos outros estudos demonstram que a variação do número de repetições TG pode estar associada à manifestação de determinada doença. Alterações dessa região microssatélite no gene *PSMA6*, já foram associadas a indivíduos com diabetes tipo 2. Um estudo realizado em 2003 por Kalis *et al.* apresentou uma região de repetições TG variando de 13 a 25 TGs. Os alelos com 22 repetições TG nessa região microssatélite do gene *PSMA6* são duas vezes mais frequentes quando comparados aos indivíduos do grupo controle (Kalis *et al.*, 2003).

Os microssatélites intrônicos são mais eficientes em modificar a expressão gênica por silenciamento e aumentar a transcrição e eventos de *splicing* (Gebhardt *et al.*, 1999; Gabellini, 2001). A estimativa da frequência desse polimorfismo nos indivíduos controle que está sendo realizada nesse momento pode elucidar a ligação ou não dessa variação com o fenótipo dos pacientes incluídos na pesquisa.

Sendo assim podemos supor que a deleção dessa região poderia estar afetando a manifestação do fenótipo desse indivíduo visto que não encontramos essa deleção em nenhum outro paciente e nem mesmo no grupo controle. No entanto, não se pode esquecer que este paciente apresentou várias outras alterações que podem estar em *trans* ou em *cis* com esta, e assim o haplótipo como um todo seria responsável pelo fenótipo. Vale ressaltar que não foi possível se estabelecer haplótipos neste caso por não se dispor das amostras dos progenitores.

### 6.3.5- SNP-rs2239789

Também foi encontrada a alteração g.28614A>T (SNP – rs2239789) no *intron* 9 do gene *PAX6*. Essa alteração foi encontrada em heterozigose A/T no paciente MG2, em homozigose A/A nos pacientes MG1 e MG3 e em homozigose T/T na mãe da Família 2.

A triagem do SNP - rs2239789 no grupo controle revelou as frequências alélicas de 48,15% de A e 51,85% de T, frequências essas que são muito similares às encontradas na literatura, que são de 50% de A e 50% de T. O genótipo mais freqüente encontrado foi o heterozigoto A/T, assim como o paciente MG2. Sendo assim, dificilmente essa alteração tem alguma ligação com o fenótipo desse paciente.

### 6.3.6- SNP-rs667773

Foi encontrada em heterozigose no *intron* 10 do gene *PAX6* a troca g.29148C>T (SNP - rs667773). O pai e a filha 2 da Família 1 apresentavam essa alteração. Já que os dois outros filhos (filha 1 e filho) não apresentaram o SNP - rs667773, isto sugere que esta filha herdou um alelo paterno diferente dos outros dois irmãos. Essa alteração pode estar associada também a algum fenótipo diferente apresentado pela filha 2, como por exemplo a catarata e a baixa acuidade visual.

Esse SNP foi triado em 43 indivíduos controle, sendo que 39 foram identificados como homozigotos C/C, 2 como heterozigotos C/T e 2 homozigotos T/T. A frequência alélica obtida foi de 93% do alelo C e 3% do alelo T.

### 6.3.7- SNP-3026393

Foi encontrada em heterozigose uma alteração na posição g.32295T>G (SNP - rs3026393) no *intron* 13 do gene *PAX6*. Como esta alteração está localizada relativamente próxima do sítio doador de *splicing*, pode ser denominada IVS13+43T>G. Essa alteração foi descoberta em heterozigose T/G na filha da Família 2, no filho da Família 3 e no paciente MG2, a homozigose G/G foi observada na mãe da Família 2 e no paciente MG4. Todos os outros indivíduos apresentaram a homozigose T/T. O fato de se encontrar as homozigosas T/T e G/G para as variações g.28614A>T e g.32295T>G, respectivamente, nos indivíduos AN2M e MG4 sugere que formem um haplótipo, hipótese esta reforçada

pela observação de que os heterozigotos da primeira variação são também heterozigotos da segunda e vice-versa.

#### 6.4- Deleções - MLPA

Amplios rearranjos cromossômicos também podem causar aniridia (Prosser e Heyningen, 1998). Uma proporção significativa de anormalidades cromossômicas consiste de deleções submicroscópicas, que podem ser observadas usando a técnica de FISH (*fluorescence in situ hybridization*) em pacientes com aniridia (Crolla e Heyningen, 2002).

Mutações no gene *PAX6* sempre são associadas a indivíduos com o fenótipo de aniridia, porém há casos em que a estrutura do gene não apresenta alterações que possam explicar o fenótipo desses indivíduos. Alguns casos esporádicos de indivíduos com aniridia têm sido associados a deleções que não envolvem a estrutura do *PAX6*, mas sim deleções que estão envolvidas na remoção de elementos com funções transcricionais e/ou traducionais (Lauderdale *et al.*, 2000). Essas deleções de elementos que podem estar associados à regulação da expressão do *PAX6* já foram descritas tanto na região 3' quanto na região 5' do gene. Exemplo de locais que podem conter elementos reguladores são os genes *ELP4* e *RCNI* localizados, respectivamente, na região 3' e na 5' do *PAX6*.

O gene *ELP4* está localizado na banda 13 do cromossomo 11(11p13). Esse gene codifica uma das subunidades do complexo de alongação, composto por seis subunidades, e está diretamente associado com a RNA polimerase 2 durante a alongação transcricional. Como citado anteriormente o gene *ELP4* pode conter elementos reguladores do *PAX6*. Um estudo realizado em 2007 por D'Elia e colaboradores, verificou a deleção no gene *ELP4* em duas famílias com segregação de aniridia, sem que fossem encontradas alterações na estrutura do gene *PAX6*. A deleção da região 3' pode corromper a função de um possível acentuador da expressão do *PAX6* (Kleinjan *et al.*, 2001). Além disso, foi demonstrado recentemente que a ausência de elementos reguladores distais abolem a expressão do *PAX6* em tecidos específicos, mesmo que acentuadores mais próximos permaneçam intactos (Kleinjan *et al.*, 2006).

A análise dos resultados de MLPA revelou uma possível deleção na sonda referente ao *exon 9* do gene *ELP4*, no indivíduo MG4. Porém não podemos afirmar se realmente se trata de uma deleção na região da sonda. A diminuição do tamanho do pico no gráfico pode ser devido a algum problema na hora da ligação da sonda ao DNA alvo, caso alguma alteração na seqüência do gene esteja localizada na seqüência homóloga de ligação da sonda. Entretanto, não há nenhuma alteração já descrita que se localize na região de ligação da sonda, sendo necessária a realização do seqüenciamento do *exon 9* do gene *ELP4* para que possamos confirmar uma eventual deleção ou mutação neste *exon*. Caso qualquer destas alterações se confirmem, elas podem estar associadas ao fenótipo de *Morning Glory* desse indivíduo.

O gene *RCN1* também está localizado na banda 13 do cromossomo 11. Este gene codifica a reticulocalbina 1, que é uma proteína de ligação ao cálcio, tendo seis motivos com alta afinidade de ligação ao  $Ca^{+2}$ , se localizada no lúmen do retículo endoplasmático participando da via secretória e expressa no olho (Hilioti e Cunningham, 2003).

Deleções submicroscópicas na região 5' do gene *PAX6* envolvendo o gene *RCN1* têm sido relacionadas com o fenótipo de microftalmia em camundongos (Favor, 2009).

Em humanos um ponto de quebra no cromossomo 11 foi detectado em um paciente com a síndrome WAGR e a síndrome de Potocki-Shaffer entre os genes *PAX6* e *RCN1*, sendo que o *PAX6* permaneceu intacto (Almind *et al.*, 2009). Sugere-se que a deleção do gene *RCN1* esteja associada à regulação 5' do gene *PAX6*, podendo contribuir para os fenótipos oculares desse indivíduo que incluem catarata e ptose palpebral (Almind *et al.*, 2009). Uma explicação para isso pode ser a de que elementos regulatórios do *PAX6* estejam deletados, tal qual elementos que foram demonstrados por Kammandel *et al.* (1999). Elementos regulatórios, localizados na região 5' do gene *Pax6*, já foram identificados em camundongos como sendo importantes para indução da formação do cristalino (Williams *et al.*, 1998 e Dimanlig *et al.*, 2001).

Neste estudo foi identificada uma diminuição significativa na sonda referente ao *exon 1* do gene *RCN1*, indicando uma possível deleção, nos indivíduos filho da Família 1 e filho da Família 3. Porém, nenhum outro indivíduo de ambas as famílias puderam ser analisados. Assim, deve-se realizar este experimento com as amostras dos progenitores para

se confirmar a alteração e verificar a segregação principalmente no caso da família 1 na qual a mutação p.R240X já é, por si só, responsável pela aniridia nos quatro indivíduos afetados. Em relação à diminuição do sinal do *exon 1* do gene *RCNI* propriamente dita, assim como para a sonda do *exon 9* do gene *ELP4*, não podemos afirmar se realmente se trata de uma deleção na região da sonda. Não há registros de SNPs ou mutações na região de ligação da sonda, sendo necessária a realização do seqüenciamento do *exon 1* do gene *RCNI* para que possamos confirmar uma alteração nucleotídica ou uma deleção. Como para o experimento de MLPA a integridade do DNA genômico é fundamental, deve-se repetir o experimento para verificar a reproducibilidade do resultado. Caso isto se confirme, poder-se-ia estabelecer uma correlação com o fenótipo de Aniridia desses indivíduos, principalmente do paciente da família 3 para o qual nenhuma mutação no gene *PAX6* foi identificada. Foram detectadas apenas heterozigoses dos SNPs g.28614A>T e g.27895T>G nos introns 9 e 13, respectivamente; SNPs estes são os únicos com estudos populacionais registrados e com freqüências de 50% para cada variante, indicando uma normalidade associada a cada alelo.

## **VII- CONCLUSÕES**

- Foi possível a identificação da mutação *nonsense* p.R240X no gene *PAX6* nos indivíduos portadores de aniridia da família 1.
- Através de SNPs no gene *PAX6*, nesta mesma família, foram identificados haplótipos raros que em heterozigose composta com a mutação p.R240X poderiam agravar os fenótipos.
- Através do estudo de MLPA, foi possível verificar a diminuição significativa do sinal da sonda relativa ao *exon 1* do gene *RCNI* do filho afetado da família 1, único indivíduo da família que foi analisado.
- Na família 2 de pacientes com a Síndrome de Axenfeld-Rieger associada à Síndrome de Fuchs não se identificou nenhuma mutação, porém dois haplótipos do gene *PAX6* foram identificados através de SNPs, no entanto não há subsídios suficientes para se estabelecer uma correlação destes haplótipos com os fenótipos de cada indivíduo da família.
- No indivíduo com aniridia esporádica da família 3 e para o indivíduo isolado AN4 não se verificou nenhuma mutação. No caso de AN3Y apenas as heterozigoses g.28614A>T e g.32295T>G, respectivamente, nos *introns 9* e *13* foram identificadas. Ao passo que para AN4, três heterozigoses de SNPs conhecidos foram observadas. Da mesma forma não se pode estabelecer uma correlação deste haplótipo com o fenótipo de aniridia típico destes pacientes. Estes resultados podem talvez indicar uma outra etiologia para a doença.
- Ainda no AN3Y foi verificada a diminuição da intensidade relativa de hibridização correspondente ao *exon 1* do gene *RCNI*. Assim como no caso do paciente AN1Y, há que se confirmar este resultado.
- Nenhuma mutação foi identificada nos pacientes com a Síndrome de Morning-Glory. Mais uma vez, haplótipos portadores de polimorfismos raros podem ser

correlacionados com o fenótipo, principalmente no caso do paciente MG3 para o qual foram identificadas cinco variações não descritas anteriormente na literatura.

- O experimento de MLPA do paciente MG4 revelou a diminuição da intensidade relativa de hibridização correspondente ao *exon 9* do gene *ELP4* localizado na extremidade 3' do gene *PAX6*. Embora possa significar uma microdeleção ou mesmo uma mutação de ponto neste gene, os resultados deverão ser confirmados por outras técnicas.

## **VIII- REFERÊNCIAS**

- Alkemade PPH (1969). Dysgenesis mesodermalis of the iris and cornea: a study of Rieger's Syndrome and Peters' Anomaly. The Netherlands: Van Gorcum ad Comp NV Assen.
- Almind GJ, Brøndum-Nielsen K, Bangsgaard R, Baekgaard P, Grønskov K (2009). 11p Microdeletion including WT1 but not PAX6, presenting with cataract, mental retardation, genital abnormalities and seizures: a case report. *Mol Cytogenet* 17: 2-6.
- Alward WL (2000). Axenfeld-Rieger syndrome in the age of molecular genetics. *Am J Ophthalmol* 130: 107-115.
- Anderson TR, Hedlund E, Carpenter EM (2002). Differential Pax6 promoter activity and transcript expression during forebrain development. *Mech Dev* 114:171-175.
- Ars E, Serra E, García J, Kruyer H, Gaona A, Lázaro C, Estivill X (2000). Mutations affecting mRNA splicing are the most common molecular defects in patients with neurofibromatosis type 1. *Hum Mol Genet* 9: 237-247.
- Axton R, Hanson I, Danes S, Sellar G, van Heyningen V, Prosser J (1997). The incidence of PAX6 mutation in patients with simple aniridia: An evaluation of mutation detection in 12 cases. *J Med Genet* 34:279–386.
- Azuma N, Yamaguchi Y, Handa H, Tadokoro K, Asaka A, Kawase E and Yamada M (2003). Mutations of the PAX6 gene detected in patients with a variety of optic-nerve malformations. *Am J Hum Genet* 72:1565-1570.
- Azuma N, Tadokoro K, Asaka A, Yamada M, Yamaguchi Y, Handa H, Matsushima S, Watanabe T, Kohsaka S, Kida Y, Shiraishi T, Ogura T, Shimamura K and Nakafuku M (2005). The PAX6 isoform bearing an alternative spliced exon promotes the development of the neural retinal structure. *Hum Mol Genet* 14(6):735-745.
- Banco de SNPs do National Center for Biotechnology Information (NCBI). Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=snp>.
- Béland M, Bouchard M (2006). PAX gene function during kidney tumorigenesis: a comparative approach. *Bull Cancer* 93: 875-882.
- Benetti E, Artifoni L, Salviati L, Pinello L, Perrotta S, Zuffardi O, Zacchello G, Murer L (2007). Renal Hypoplasia renal without optic coloboma associated with PAX2 gene deletion. *Nephrol Dial Transplant* 22:2076-2078.

- Brahmachari SK, Meera G, Sarkar PS, Balagurumoorthy P, Tripathi J, Raghavan S, Shaligram U, Pataskar S (1995). Simple repetitive sequences in the genome: structure and functional significance. *Electrophoresis* 16(9):1705-14.
- Brown A, Mckie M, van Heyningen V, Prosser J (1998). The human PAX6 mutation database. *Nucleic Acids Res* 26:259-264.
- Buratti E, Baralle FE (2004). Influence of RNA secondary structure on the pre-mRNA splicing process. *Mol Cell Biol* 24: 10505-10514.
- Crolla JA, van Heyningen V (2002). Frequent chromosome aberrations revealed by molecular cytogenetic studies in patients with aniridia. *Am J Hum Genet* 71: 1138-1149.
- Cuppens H, Lin W, Jaspers M, Costes B, Teng H, Vankeerberghen A, Jorissen M, Droogmans G, Reynaert I, Goossens M (1998). Polyvariant mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator genes. The polymorphic (Tg)<sub>m</sub> locus explains the partial penetrance of the T5 polymorphism as a disease mutation. *J Clin Invest* 101, 487-496.
- Czerny T, Schaffner G and Busslinger M (1993). DNA sequence recognition by PAX proteins: bipartite structure of the paired domain and its binding site. *Genes Dev* 7:2048-2061.
- Dandan L, Qingguo Z, Hui L, Nan Z, Yanhua Q (2008). A novel PITX2 mutation in a Chinese family with Axenfeld-Rieger Syndrome. *Mol Vis* 14: 2205-2210.
- Dansault A, David G, Schwartz C, Jaliffa C, Vieira V, Houssaye G, Bigot K, Catin F, Tattu L, Chopin C, Halimi P, Roche O, Regemorter NV, Munier F, Schorderet D, Dufier JL, Marsac C, Ricquier D, Menasche M, Penfornis A and Abitbol M (2007). Three new PAX6 mutations including one causing an unusual ophthalmic phenotype associated with neurodevelopmental abnormalities. *Mol Vis* 13:511-523.
- D'Elia AV, Pellizzari L, Fabbro D, Pianta A, Divizia MT, Rinaldi R, Grammatico B, Grammatico P, Arduino C, Damante G (2007). A deletion 3' to the PAX6 gene in familial aniridia cases. *Mol Vis* 23: 1245-1250.
- Dib C, Faure S, Fizames C, Samson D, Drouot N, Vignal A, Millasseau P, Marc S, Hazan J, Seboun E, Lathrop M, Gyapay G, Morissette J, Weissenbach J (1996). A

- comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature* 380:152-154.
- Dimanlig PV, Faber SC, Auerbach W, Makarenkova HP, Lang RA (2001). The upstream ectoderm enhancer in Pax6 has an important role in lens induction. *Development* 128: 4415-4424.
- Dollfus H, Joanny-Flinois O, Doco-Fenzy M, Veyre L, Joanny-Flinois L, Khoury M, Jonveaux P, Abitbol M, Dufier JL (1998). Gillespie syndrome phenotype with a t(X;11)(p22.32;p12) de novo translocation. *Am J Ophthalmol* 125(3): 397-399.
- Duncan MK, Kozmik Z, Cveklova K, Piatigorsky J, Cvekl A (2000). Overexpression of PAX6(5a) in lens fiber cells results in cataract and upregulation of (alpha)5(beta)1 integrin expression. *J Cell Sci* 113(Pt 18):3173-3185.
- Dutreix M (1997). (GT)<sub>n</sub> repetitive tracts affect several stages of RecA-promoted recombination. *J Mol Biol*, 273(1):105-13.
- Epstein JA, Glaser T, Cai J, Jepeal L, Walton DS, Maas RL (1994a). Two independent and interactive DNA-binding subdomains of the Pax6 paired domain are regulated by alternative splicing. *Genes Dev* 8:2022–2034.
- Epstein JA, Cai J, Glaser T, Jepeal L and Maas RL (1994b). Identification of a PAX paired domain recognition sequence and evidence for DNA-dependent conformation changes. *J Biol Chem* 269:8355-8361.
- Fantes JA, Bickmore WA, Fletcher JM, Ballesta F, Hanson I, van Heyningen V (1992). Nonradioactive in situ hybridization for rapid analysis of submicroscopic deletions at the WAGR locus. *Am J Hum Genet* 51:1286–1294.
- Favor J, Bradley A, Conte N, Janik D, Pretsch W, Reitmeir P, Rosemann M, Schmahl W, Wienberg J, Zaus I (2009). Analysis of Pax6 Contiguous Gene Deletions in the Mouse, *Mus musculus*, Identifies Regions Distinct from Pax6 Responsible for Extreme Small Eye and Belly Spotting Phenotypes. *Genetics* epub ahead of print.
- Ferrell RE, Chakravarti A, Hittner HM, Riccardi VM (1980). Autosomal dominant aniridia: probable linkage to acid phosphatase-1 locus on chromosome 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 1580-1582.

- Fischbach BV, Trout KL, Lewis J, Luis CA, Sika M (2005). WAGR syndrome: a clinical review of 54 cases. *Pediatrics* 116: 984-988.
- Fisher E, Scambler P (1994). Human haploinsufficiency—one for sorrow, two for joy. *Nat Genet* 7:5–7.
- Francke U, Holmes LB, Atkins L, Riccardi VM (1979). Aniridia-Wilms' tumor association: evidence for specific deletion of 11p13. *Cytogenet Cell Genet* 24: 185-192.
- Gabellini N (2001). A polymorphic GT repeat from the human cardiac Na<sup>+</sup>Ca<sup>2+</sup> exchanger intron 2 activates splicing. *Eur J Biochem* 268(4): 1076-1083.
- Gebhardt F, Zanker KS and Brandt B (1999). Modulation of epidermal growth factor receptor gene transcription by a polymorphic dinucleotide repeat in intron 1. *J Biol Chem* 274(19): 13176-13180.
- Gehring WJ (1996). The master control gene for morphogenesis and evolution of the eye. *Genes Cells* 1:11–15.
- Gene Runner for Windows. Disponível em: <http://www.generunner.net/>.
- 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.
- Glaser T, Lane J, Housman D (1990). A mouse model of the aniridia– Wilms tumor deletion syndrome. *Science* 250:823–827.
- Glaser T, Walton DS, Maas RL (1992). Genomic structure, evolutionary conservation and aniridia mutations in the human PAX6 gene. *Nature Genet* 2:232–239.
- 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. *Nature Genetics* 7, 463–471.
- Gould D B, John SWM (2002). Anterior segment dysgenesis and the development glaucomas are complex traits. *Hum. Molec. Genet.* 11: 1185-1193, 2002.
- Grindley JC, Davidson DR, Hill RE (1995). The role of Pax-6 in eye and nasal development. *Development* 121:1433–1442.
- Groman JD, Hefferon TW, Casals T, Bassas L, Estivill X, Des Georges M, Guittard C, Koudova M, Fallin D, Nemeth K (2004). Variation in a repeat sequence determines

- whether a common variant of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene is pathogenic or benign. *Am. J. Hum. Genet.* 74, 176–179.
- Halder G, Callaerts P, Gehring WJ (1995). Induction of ectopic eyes by targeted expression of the eyeless gene in *Drosophila*. *Science* 267:1788–1792.
- Hanson IM., Seawright A., Hardman K., Hodgson S., Zaletayev D., Fekete G and van Heyningen V (1993). PAX6 mutations in aniridia. *Hum Mol Genet* 2: 915-920.
- Hanson I, Jordan T, van Heyningen V. (1994a). Aniridia. In Wright AF, Jay B (eds): *Molecular Genetics of Inherited Eye Disorders*. Harwood Academic, Switzerland, pp 445–467.
- Hanson IM, Fletcher JM, Jordan T, Brown A, Taylor D, Adams RJ, Punnett HH, et al (1994b). Mutations at the PAX6 locus are found in heterogeneous anterior segment malformations including Peters' anomaly. *Nat Genet* 6:168–173.
- Harris WA (1997). Pax-6: Where to be conserved is not conservative. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:2098–2100.
- Haubst N, Berger J, Radjendirane V, Graw J, Favor J, Saunders GF, Stoykova A and Gotz M (2004). Molecular dissection of PAX6 function: the specific roles of the paired domain and homeodomain in brain development. *Development* 131:6131-6140.
- Hilioti Z, Cunningham KW (2003). The RCN family of calcineurin regulators. *Biochem Biophys Res Commun* 311(4): 1089-1093.
- Hill RE, Favor J, Hogan BLM, Ton CCT, Saunders GF, Hanson IM, Prosser J, Jordan T, Hastie ND, van Heyningen V (1991). Mouse Small eye results from mutations in a paired-like homeobox-containing gene. *Nature* 354:522–525.
- Hjalt TA, Semina EV (2005). Current molecular understanding of Axenfeld-Rieger syndrome. *Expert Rev Mol Med* 7: 1-17.
- Hodgson SV, Saunders KE (1980) A probable case of the homozygous condition of the aniridia gene. *J Med Genet* 17:478–480.
- Honkanen RA, Nishimura DY, Swiderski RE, Bennett SR, Hong S, Kwon YH, Stone EM, Sheffield VC, Alward WL (2003). A family with Axenfeld-Rieger syndrome and Peters Anomaly caused by a point mutation (Phe112Ser) in the FOXC1 gene. *Am J Ophthalmol* 135: 368-375.

- Hui J, Stangl K, Lane WS, Bindereif A (2003a). HnRNP L stimulates splicing of the eNOS gene by binding to variable-length CA repeats. *Nat Struct Biol* 10: 33–37.
- Hui J, Reither G, Bindereif A (2003b). Novel functional role of CA repeats and hnRNP L in RNA stability. *RNA* 9: 931–936.
- Inoue M, Kamachi Y, Matsunami H, Imada K, Uchikawa M, Kondoh H (2007). PAX6 and SOX2-dependent regulation of the Sox2 enhancer N-3 involved in embryonic visual system development. *Genes Cells* 12: 1049-1061.
- Jamieson RV, Perveen R, Kerr B, Carette M, Yardley J, Heon E, Wirth MG, van Heyningen V, Donnai D, Munier F, Black GC (2002). Domain disruption and mutation of the bZIP transcription factor, MAF, associated with cataract, ocular anterior segment dysgenesis and coloboma. *Hum Mol Genet* 11: 33-42.
- Jordan T, Hanson I, Zaletayev D, Hodgson S, Prosser J, Seawright A, Hastie N, van Heyningen V (1992). The human PAX6 gene is mutated in two patients with aniridia. *Nature Genet* 1:328–332.
- Jun S, Desplan C (1996). Cooperative interactions between paired domain and homeodomain. *Development* 122:2639-2650.
- Kalis M, Sjakste T, Sjakste N, Luthman H, Groop L (2003). Association study between (TG) repeat polymorphism in PMAS6 gene and type II diabetes mellitus in Botnia. *Biologija* 2: 12-14.
- Kamachi Y, Uchikawa M, Collignon J, Lovell-Badge R, Kondoh H (1998). Involvement of Sox1, 2 and 3 in the early and subsequent molecular events of lens induction. *Development* 125: 2521–2532.
- Kamachi Y, Uchikawa M, Tanouchi A, Sekido R, Kondoh H (2001). Pax6 and SOX2 form a co-DNA-binding partner complex that regulates initiation of lens development. *Genes Dev* 15:1272–1286.
- Kamińska A, Sokołowska-Oracz A, Pawluczyk-Dyjecińska M, Szaflik JP (2007). Variability of clinical manifestations in the family with Axenfeld-Rieger syndrome. *Klin Oczna* 109: 321-326.

- Kammandel B, Chowdhury K, Stoykova A, Aparicio S, Brenner S, Gruss P (1999). Distinct cis-essential modules direct the time-space pattern of the Pax6 gene activity. *Dev Biol* 205: 79-97.
- Kleinjan DA, Seawright A, Schedl A, Quinlan RA, Danes S and van Heyningen V (2001). Aniridia-associated translocations, Dnase hypersensitivity, sequence comparison and transgenic analysis redefine the functional domain of PAX6. *Hum Mol Genet* 10(19): 2049-2059.
- Kleinjan DA, Seawright A, Childs AJ and van Heyningen V (2004). Conserved elements in PAX6 intron 7 involved in (auto)regulation and alternative transcription. *Dev Biol* 265: 462-477.
- Kleinjan DA, Seawright A, Mella S, Carr CB, Tyas DA, Simpson TI, Mason JO, Price DJ, van Heyningen V (2006). Long-range downstream enhancers are essential for Pax6 expression. *Dev Biol* 299: 563-581.
- Kiesewetter S, Macek M, Jr, Davis C, Curristin SM, Chu CS, Graham C, Shrimpton AE, Cashman SM, Tsui LC, Mickle J (1993). A mutation in CFTR produces different phenotypes depending on chromosomal background. *Nat Genet*: 5, 274–278.
- Kindler P (1970). Morning glory syndrome: unusual congenital optic disk anomaly. *Am J Ophthalmol* 69: 376-384.
- King RC, Stansfield WD (1990). *A Dictionary of Genetics*. Oxford University Press.
- Komatireddy S, Chakrabarti S, Mandal AK, Reddy AB, Sampath S, Panicker SG, Balasubramanian D (2003). Mutation spectrum of FOXC1 and clinical genetic heterogeneity of Axenfeld-Rieger anomaly in India. *Mol Vis* 9: 43-48.
- Kondo-Saito A, Matsumoto N, Sasaki T, Egashira M, Saitoh A, Yamada K, Niikawa N and Amemiya T (2000). Two nonsense mutations of PAX6 in two Japanese families: case report and review of the literature. *Eur J Ophthalmol* 10: 167-172.
- Kondoh H, Uchikawa M, Kamachi Y (2004). Interplay of Pax6 and SOX2 in lens development as a paradigm of genetic switch mechanisms for cell differentiation. *Int. J Dev Biol* 48:819–827.
- Královicová J, Hounginou-Molango S, Krämer A, Vorechovsky I (2004). Branch site haplotypes that control alternative splicing. *Hum Mol Genet* 13(24): 3189-3202.

- Lang D, Powell SK, Plummer RS, Young KP and Ruggeri BA (2007). PAX6 is expressed in pancreatic adenocarcinoma and is downregulated during induction of terminal differentiation. *Biochem Pharmacol* 73: 1-14.
- Lauderdale JD, Wilensky JS, Oliver ER, Walton DS, Glaser T (2000). 3' deletions cause aniridia by preventing PAX6 gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 13755-13759.
- Lines MA, Kozlowski K, Walter MA (2002). Molecular genetics of Axenfeld-Rieger malformations. *Ophthalmology* 109: 1862-1870.
- Lines MA, Kozlowski K, Kulak SC, Allingham RR, Héon E, Ritch R, Levin AV, Shields MB, Damji KF, Newlin A, Walter MA (2004). Characterization and prevalence of PITX2 microdeletions and mutations in Axenfeld-Rieger malformations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45: 828-833.
- López-Bigas N, Audit B, Ouzounis C, Parra G, Guigó R (2005). Are splicing mutations the most frequent cause of hereditary disease? *FEBS Lett* 579: 1900-1903.
- Lyons LA, Martha A, Mintz-Hittner HA, Saunders GF, Ferrell RE (1992). Resolution of the two loci for autosomal dominant aniridia, AN1 and AN2, to a single locus on chromosome 11p13. *Genomics* 13: 925-930.
- Majewski J, Ott J (2000). GT Repeats are associated with recombination on human chromosome 22. *Genome Research* 10(8):1108-14.
- Martha A, Ferrell RE, Mintz-Hittner H, Lyons LA, Saunders GF (1994). Paired box mutations in familial and sporadic aniridia predicts truncated aniridia proteins. *Am J Hum Genet* 54:801-811.
- Meera G, Ramesh N, Brahmachari SK (1995). Zintrons in rat  $\alpha$ -lactalbumin gene. *FEBS Lett*, 251:245-249.
- Meyer A, Schart M (1999). Gene and genome duplications in vertebrates: the one-to-four (-to-eight in fish) rule and the evolution of novel gene functions. *Current Opinion in Cell Biology* 11:699-704.
- Miller RW, Fraumeni JF Jr, Manning MD (1964). Association of wilms's tumor with aniridia, hemihypertrophy and other congenital malformations. *N Engl J Med* 270: 922-927.

- Minotto I, Abdala N, Miachon AA, Spinola e Castro AM, Imamura P, Nogueira RG (2007). Basal encephalocele associated with morning glory syndrome: case report. *Arq Neuropsiquiatr* 65(4A): 988-991.
- 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: 205-209.
- Neethirajan G, Nallathambi J, Krishnadas SR, Vijayalakshmi P, Shashikanth S, Collinson JM and Sundaresan P (2006). Identification of novel mutant alleles in Indian cases of familial aniridia. *BMC Ophthalmol* 2006, 27: 6-28.
- Naylor e Clark, 1990 Naylor LH, Clark EM (1990). d(TG)n.d(CA)n sequences upstream of the rat prolactin gene form Z-DNA and inhibit gene transcription. *Nucleic Acids Res* 18:1595-1601.
- Perveen R, Lloyd IC, Clayton-Smith J, Churchill A, van Heyningen V, Hanson I, Taylor D, McKeown C, Super M, Kerr B, Winter R, Black GC (2000). Phenotypic variability and asymmetry of Rieger syndrome associated with PITX2 mutations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41: 2456-2460.
- Okladnova O, Syagailo YV, Mossner R, Riederer P, Lesch KP (1998). Regulation of PAX-6 gene transcription: alternate promoter usage in human brain. *Brain Res Mol Brain Res* 60:177-192.
- Plaza S, Dozier C, Saule S (1993). Quail Pax-6 (Pax-QNR) encodes a transcription factor able to bind and trans-activate its own promoter. *Cell Growth Differ* 4:1041-1050.
- Plaza S, Dozier C, Turque N, Saule S (1995). Quail Pax-6 (Pax-QNR) mRNAs are expressed from two promoters used differentially during retina development and neuronal differentiation. *Mol Cell Biol* 15:3344-3353.
- Pinson J, Mason J O, Simpson T I, Price D J (2005). Regulation of the Pax6 : Pax6(5a) mRNA ratio in the developing mammalian brain. *BMC Dev Biol* 5:13.
- Pinson J, Simpson TI, Mason JO, Price DJ (2006). Positive autoregulation of the transcription factor Pax6 in response to increased levels of either of its major isoforms, Pax6 or Pax6(5a), in cultured cells. *BMC Dev Biol* 2006, 6:25.

- Prosser J, van Heyningen V (1998). PAX6 Mutations Reviewed. *Human Mutation* 11: 93-108.
- 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.
- Riccardi VM, Sujansky E, Smith AC, Francke U (1978). Chromosomal imbalance in the Aniridia-Wilms' tumor association: 11p interstitial deletion. *Pediatrics* 61: 604-610.
- Riise R, Storhaug K, Brøndum-Nielsen K (2001). Rieger syndrome is associated with PAX6 deletion. *Acta Ophthalmol Scand* 79: 201-203.
- Robinson DO, Howarth RJ, Williamson KA, van Heyningen V, Beal SJ, Crolla JA (2008). Genetic Analysis of Chromosome 11p13 and the PAX6 Gene in a Series of 125 Cases Referred With Aniridia. *Am J Med Genet A* 146A: 558-569.
- Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F and Pals G (2002). Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 15: 30(12):e57.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular cloning, a laboratory manual* (2nd ed.) Volumes 1–3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989.
- Schwarz M, Cecconi F, Bernier G, Andrejewski N, Kammandel B, Wagner M, Gruss P (2000). Spatial specification of mammalian eye territories by reciprocal transcriptional repression of PAX2 and PAX6. *Development* 127:4325-4334.
- Semina EV, Reiter R, Leysens NJ, Alward WL, Small KW, Datson NA, Siegel-Bartelt J, Bierke-Nelson D, Bitoun P, Zabel BU, Carey JC, Murray JC (1996). Cloning and characterization of a novel bicoid-related homeobox transcription factor gene, RIEG, involved in Rieger syndrome. *Nat Genet* 14: 392-399.
- Singh S, Mishra R, Arango NA, Deng JM, Behringer RR, Saunders GF (2002): Iris hypoplasia in mice that lack the alternatively spliced Pax6(5a) isoform. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:6812-6815.
- Sharma VK, B-Rao C, Sharma A, Brahmachari SK, Ramachandran S (2003). (TG/CA)<sub>n</sub> repeats in human housekeeping genes. *J Biomol Struct Dyn*, 21(2):303-10.

- Shields MB (1983). Axenfeld-Rieger syndrome: a theory of mechanism and distinctions from the iridocorneal endothelial syndrome. *Trans Am Ophthalmol Soc* 81: 736-784.
- Song SJ, Liu YZ, Cong RC, Jin Y, Hou ZQ, Ma ZZ, Ren GC and Li LS (2005). Mutation analysis of PAX6 gene in a large Chinese family with aniridia. *Chin J Med* 118: 302-306.
- Sørensen KM, Andersen PS, Larsen LA, Schwartz M, Schouten JP, Nygren AO (2008). Multiplex ligation-dependent probe amplification technique for copy number analysis on small amounts of DNA material. *Anal Chem* 80(23): 9363-9368.
- Stoykova A, Gruss P (1994). Roles of Pax-genes in developing and adult brain as suggested by expression patterns. *J Neurosci* 14:1395–1412.
- Spallone A (1989). Retinal detachment in Axenfeld-Rieger syndrome. *Br J Ophthalmol* 73: 559-562.
- Talamillo A, Quinn JC, Collinson JM, Caric D, Price DJ, West JD and Hill RE (2003). Pax6 regulates regional development and neuronal migration in the cerebral cortex. *Dev Biol* 255: 151-163.
- Teraoka SN, Telatar M, Becker-Catania S, Liang T, Onengüt S, Tolun A, Chessa L, Sanal O, Bernatowska E, Gatti RA, Concannon P (1999). Splicing defects in the ataxia-telangiectasia gene, ATM: underlying mutations and consequences. *Am J Hum Genet* 64: 1617-1631.
- Tripathi J, Brahmachari SK (1991). Distribution of simple repetitive (TG/CA)<sub>n</sub> and (CT/AG)<sub>n</sub> sequences in human and rodent genomes. *J Biomol Struct Dyn*, 9(2):387-97.
- Ton CC, Hirvonen H, Miwa H, Weil MM, Monaghan P, Jordan T, van Heyningen V, et al (1991). Positional cloning and characterization of a paired box- and homeobox-containing gene from the aniridia region. *Cell* 67:1059–1074.
- Ton CC, Miwa H, Saunders GF (1992). Small eye (Sey): Cloning and characterization of the murine homolog of the human aniridia gene. *Genomics* 13:251–256.
- Turque N, Plaza S, Radvanyi F, Carriere C, Saule S (1991). Pax-QNR/Pax-6, a paired box- and homeobox-containing gene expressed in neurons, is also expressed in pancreatic endocrine cells. *Development* 113:1435–1449.

- Tzoulaki I, White IMS and Hanson IM (2005). PAX6 mutations: genotype-phenotype correlations. *BMC Dev Biol* 2005, 6:27.
- 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: 163-169.
- Walther C, Guenet J-L, 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.
- Wang Q, Fang WH, Krupinski J, Kumar S, Slevin M, Kumar P (2008). Pax genes in embryogenesis and oncogenesis. *J Cell Mol Med* 12: 2281-2294.
- Wagner A (2002). Selection and gene duplication: a view from the genome. *Genome Biol* 3(5): reviews 1012.
- Williams SC, Altmann CR, Chow RL, Hemmati-Brivanlou A, Lang RA (1998). A highly conserved lens transcriptional control element from the Pax-6 gene. *Mech. Dev.* 73, 225-229.
- Woolfe A, Goodson M, Goode DK, Snell P, McEwen GK, Vavouri T, Smith SF, North P, Callaway H, Kelly K, Walter K, Abnizova I, Gilks W, Edwards YJ, Cooke JE, Elgar G (2005). Highly conserved non-coding sequences are associated with vertebrate development. *PLoS Biol* 3(1): e7.
- Xu W, Rould MA, Jun S, Despan C and Pabo CO (1995). Crystal structure of a paired domain-DNA complex at 2.5 Å resolution reveals structural basis for PAX developmental mutations. *Cell* 80:639-650.
- Xu ZP and Saunders GF (1997). Transcriptional regulation of the human PAX6 gene promoter. *J Biol Chem* 272(6): 3430-3436.
- Yamaguchi Y, Sawada J, Yamada M, Handa H, Azuma N (1997). Autoregulation of Pax6 transcriptional activation by two distinct DNA-binding subdomains of the paired domain. *Genes Cells* 2:255–261.
- Yasuda T, Kajimoto Y, Fujitani Y, Watada H, Yamamoto S, Watarai T, Umayahara Y, Matsuhisa M, Gorogawa S, Kuwayama Y, Tano Y, Yamasaki Y, Hori M (2002).

- PAX6 mutation as a genetic factor common to aniridia and glucose intolerance. *Diabetes* 51: 224-230.
- Yuan H, Kang Y, Shao Z, Li Y, Yang G and Xu N (2007). Two novel PAX6 mutations identified in northeastern Chinese patients with aniridia. *Mol Vis* 13:1555-1561.
- Zielenski J, Patrizio P, Corey M, Handelin B, Markiewicz D, Asch R, Tsui LC (1995). CFTR gene variant for patients with congenital absence of vas deferens. *Am J Hum Genet* 57: 958–960.
- Zhu HY, Wu LQ, Pan Q, Liang DS, Long ZG, Dai HP, Xia K, Xia JH (2006). Analysis of PAX6 gene in a Chinese aniridia family. *Chin Med J* 119(16):1400-1402.

# **ANEXO 1**

### SALSA MLPA P219-B1 PAX6 probemix

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position		
		reference	other	PAX6
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA			
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation			
130	Reference probe 0797-L0463	5q31		
136	<b>PAX6</b> Probe 6026-L7190			<b>Exon 4</b>
142	<b>DCDC1</b> Probe 7076-L7345		<b>Exon 1</b>	
148	<b>ELP4</b> Probe 7078-L6707		<b>Exon 9</b>	
154	<b>PAX6</b> Probe 6025-L7191			<b>Exon 2</b>
160 *	<b>SOX2</b> probe 7682-L06702		<b>Exon 1</b>	
166	<b>FSHB</b> Probe 7075-L6704		<b>Exon 3</b>	
172	<b>DCDC1</b> Probe 7077-L6706		<b>Exon 4</b>	
178	<b>WT1</b> Probe 5354-L4733		<b>Exon 4</b>	
184	Reference probe 2331-L2468	12q22		
193	<b>LMO2</b> Probe 0486-L0083		<b>Exon 1</b>	
200	<b>HIPK3</b> Probe 0976-L7192		<b>Exon 1</b>	
206	<b>BDNF</b> Probe 3089-L7193		<b>Exon 1</b>	
214	<b>FSHB</b> Probe 7074-L6703		<b>Exon 2</b>	
220	<b>PAX6</b> Probe 3253-L2690			<b>Exon 5</b>
226	<b>RCN1</b> Probe 7083-L6712		<b>Exon 5</b>	
235	Reference probe 5265-L4648	2p22		
240	<b>PAX6</b> Probe 3254-L7346			<b>Exon 8</b>
247	<b>WT1</b> Probe 2755-L2204		<b>Exon 1</b>	
256	<b>SOX2</b> probe 7072-L7347		<b>Exon 1</b>	
265	<b>CD44</b> Probe 2245-L1731		<b>Exon 1</b>	
274	<b>WT1</b> Probe 5360-L4739		<b>Exon 10</b>	
283	<b>PAX6</b> Probe 6027-L5483			<b>Exon 7</b>
292	<b>EHF</b> Probe 0990-L0567		<b>Exon 1</b>	
301	<b>PAX6</b> Probe 3255-L2692			<b>Exon 14</b>
312	<b>DKFZp686K1684</b> Probe 7080-L6709		<b>Exon 1</b>	
319	<b>PAX6</b> Probe 3748-L3208			<b>Exon 1</b>
328	<b>PAX6</b> Probe 7527-L5484			<b>Exon 9</b>
337 *	<b>SOX2</b> probe 7681-L06700		<b>Exon 1</b>	
346	<b>RCN1</b> Probe 7082-L6711		<b>Exon 1</b>	
355	<b>PAX6</b> Probe 3092-L2492			<b>Exon 1</b>
364	<b>LOC646008</b> Probe 7084-L6713		<b>Exon 1</b>	
373	Reference probe 2531-L1962	17q11		
382	<b>PAX6</b> Probe 3091-L7348			<b>Exon 3</b>
391	<b>PAX6</b> Probe 6030-L5486			<b>Exon 13</b>
400	Reference probe 1088-L0647	17q25		
409	<b>PAX6</b> Probe 3749-L7349			<b>Exon 1</b>
418	<b>DKFZp686K1684</b> Probe 7081-L6710		<b>Exon 3</b>	
427	<b>PAX6</b> Probe 6029-L5485			<b>Exon 10</b>
436	Reference probe 1241-L0783	17p13		
445	<b>LOC646008</b> Probe 7085-L6714		<b>Exon 4</b>	
454	<b>BDNF</b> Probe 3090-L3996		<b>Exon 2</b>	
463	Reference probe 0979-L0568	4q12		

## **ANEXO 2**



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

[www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html](http://www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html)

CEP, 28/07/09.  
(PARECER CEP: Nº 243/2003)

## PARECER

### I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "IDENTIFICAÇÃO DE GENES ASSOCIADOS AO GLAUCOMA PRIMÁRIO DE ÂNGULO ABERTO".

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: José Paulo Cabral de Vasconcellos

### II – PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou o Adendo que inclui o projeto "ANÁLISE DE MUTAÇÕES E POLIMORFISMO NO GENE *PAX6* EM PACIENTES COM ANIRIDIA E EM CONTROLES NÃO RELACIONADOS", com a finalidade de dissertação de mestrado do aluno Emerson Salvador de Souza França, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

### III – DATA DA REUNIÃO.

Homologado na VII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 28 de julho de 2009.

**Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner**  
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP

## **ANEXO 3**

## Absence of Mutations in *PAX6* Protein in Three Cases of Morning Glory Syndrome Associated with Isolated Growth Hormone Deficiency

### ABSTRACT

Morning glory syndrome (MGS) is a congenital optic disc dysplasia often associated with craniofacial anomalies, especially basal encephalocele and hypopituitarism. Clinical signs are varied and often occult. The *PAX6* gene is involved in ocular morphogenesis and is expressed in numerous ocular tissues during development especially in the developing central nervous system. The aim of the present study is to evaluate *PAX6* in MGS associated with isolated growth hormone deficiency. Three pre-pubertal males (A, B and C) with MGS and short stature due to growth hormone deficiency, treated with recombinant human growth hormone with limited response, were reported. Two of them had basal encephalocele. Coding and non-coding sequences corresponding of *PAX6* different transcripts were analyzed by direct sequencing. Nucleotide variations causing putative aminoacid change were not observed. Patient A presented the new IVS2+9G>A transition, whereas patients A and C were heterozygous for known single nucleotide polymorphisms (SNP) within the intron 4. In addition, two SNP heterozygoses were observed for patient C in both intron 9 and 13. Sequencing also revealed several nucleotide variations in patient B. Two heterozygoses for known polymorphisms were identified along with a novel C>A nucleotide change in intron 4. This patient also presented a low number on the TG repeat in intron 9 and a new IVS11+33A>T transversion. Gene regulation and transcription of *PAX6* are complex processes; there are two major protein isoforms, *PAX6*(-5a) and *PAX6*(+5a) and nine transcripts described. Furthermore, extra transcription regulatory elements have been postulated within *PAX6* introns. Considering that neither population distributions on *PAX6* polymorphism nor their linkages with diseases have been reported, a functional effect due to alterations described here cannot be discarded. (*Arq Bras Endocrinol Metab* 2008; 52/8:1221-1227)

**Keywords:** Encephalocele; Growth hormone; Morning glory syndrome; *PAX6* gene; Short stature

### RESUMO

**A Ausência de Mutações na Proteína *PAX6* em Três Casos de Síndrome de Morning Glory Associada à Deficiência Isolada de Hormônio do Crescimento.**

A síndrome de Morning Glory (SMG) é uma displasia óptica congênita associada a anomalias craniofaciais, principalmente encefalocele basal e hipopituitarismo. Os sinais clínicos são variados e muitas vezes ocultos. O gene *PAX6* está envolvido na morfogênese ocular e se expressa em vários tecidos oculares durante o desenvolvimento do sistema nervoso central. O objetivo deste estudo foi avaliar o gene *PAX6* na SMG associada com deficiência isolada de hormônio de crescimento. Foram relatados três pacientes pré-púberes (A, B e C) com SMG e baixa estatura por deficiência de hormônio de crescimento tratados com hormônio de crescimento recombinante humano. As seqüências codificadoras e não-codificadoras correspondentes ao *PAX6* em diferentes

### clinical case report

GIL GUERRA-JUNIOR  
ANGELA MARIA SPINOLA-CASTRO  
ADRIANA A. SIVIERO-MIACHON  
ROBERTO GOMES NOGUEIRA  
SOFIA HELENA V. LEMOS-MARINI  
LILIA FREIRE RODRIGUES D'SOUZA-LI  
PRISCILA CRISTINA DA SILVA  
EMERSON SALVADOR S. FRANÇA  
FERNANDA CAROLINE SOARDI  
MARICILDA PALANDI DE MELLO

Department of Pediatrics, Pediatric Endocrinology Unit, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas (Unicamp), (GGJ, SHVLM, LFRSL) Campinas, SP, Brazil; Department of Pediatrics, Pediatric Endocrinology Unity, School of Medicine, Federal University of Sao Paulo (Unifesp/EPM) (AMSC, AASM), Sao Paulo, SP, Brazil; Department of Radiology, School of Medicine, Unifesp/EPM (RGN), Sao Paulo, SP, Brazil; Center of Molecular Biology and Genetic Engineering (CBMEG) (PCS, ESSF, FCS, MPM), Unicamp, Campinas, SP, Brazil

Received in 24/8/2008  
Accepted in 14/10/2008

transcritos foram analisadas por seqüenciamento direto. Variações nucleotídicas com trocas pontuais de aminoácidos não foram encontradas. O paciente A apresentou uma transição nova IVS2+9G>A, enquanto os pacientes A e C foram heterozigotos para um polimorfismo (SNP) no intron 4. Ainda, dois SNPs em heterozigose nos introns 9 e 13 foram observados no paciente C. O seqüenciamento também mostrou várias variações nucleotídicas no paciente B. Dois SNPs conhecidos com a alteração nucleotídica nova C>A no intron 4 foram observados em heterozigose. Este paciente também apresentou um baixo número de repetições TG no intron 9 e uma nova transversão IVS11+33A>T. A regulação e a transcrição do gene *PAX6* são um processo complexo; existem 2 isoformas principais da proteína, *PAX6(-5a)* e *PAX6(+5a)* e 9 transcritos descritos. Considerando que nem a distribuição de SNPs no *PAX6* e nem as suas ligações com as doenças foram relatadas, um defeito funcional devido às alterações descritas não pode ser descartado. (*Arq Bras Endocrinol Metab* 2008; 52/8:1221-1227)

**Descritores:** Encefalocele; Hormônio do crescimento; *Morning glory syndrome*; Gene *PAX6*; Estatura baixa

## INTRODUCTION

Morning glory syndrome (MGS) is a congenital malformation of the optic disc characterized by an enlarged, funnel-shaped optic disc and an elevated pigmented peripapillary tissue annulus, firstly described in 1970 and named by Kindler (1) due to a resemblance to the flower of the same name. MGS can be associated with basal encephalocele and hypopituitarism. Basal (meningo) encephalocele is a sporadic and occult malformation, described in 67,7% of MGS patients, usually associated with midline defects, such as cleft palate and corpus callosum agenesis, optic disc and other brain anomalies, and hormonal disturbance (2-5).

Azuma and cols. (6) identified *PAX6* (*paired box 6*) gene (11p13) mutations in pedigrees with optic nerve malformations, including coloboma, morning glory disc anomaly, optic nerve hypoplasia/aplasia and persistent hyperplastic primary vitreous. Some of these mutations may affect transcriptional repression of the *PAX2* promoter mediated by *PAX6*. In view of the detection of *PAX2* gene mutations in papillorenal syndrome, it has been suggested that modifications in *PAX2* function, as a result of *PAX6* mutations, may affect some phenotypic expressions including those of the optic nerve malformations. Furthermore, Marquardt and cols. (7) demonstrated that *PAX6* controls the transcriptional activation of retinogenic basic helix-loop-helix factors that predisposes subsets of multipotent retinal progenitor cells (RPCs) towards different retinal cell fates, thereby mediating the full retinogenic potential of RPCs. Nonethe-

less, the molecular mechanisms mediating the RPCs retinogenic potential have not been established yet.

Kioussi and cols. (8) showed that *PAX6* is also implicated in the development of both, Rathke pouch and early anterior pituitary gland, whereas its expression controls the boundaries of somatotrope, lactotrope, and thyrotrope cell types. In the absence of *PAX6* the thyrotrope cells lineage increases markedly along with the decrease of somatotrope and lactotrope cells.

The aim of the present study is to evaluate molecular features in *PAX6* gene in three patients with MGS and isolated growth hormone deficiency.

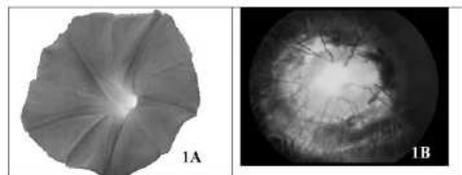
## METHODS

### Subjects

Three patients with MGS, two from Federal University of Sao Paulo (Unifesp/EPM – Brazil) (A and B) and one from University of Campinas (Unicamp – Brazil) (C) were referred to the Pediatric Endocrine Clinic, due to short stature. The ophthalmological exam, including a retinography, showed typical abnormalities of the MGS, comprising an optical disk with an enlarged choanoid and cupped aspect, with a pink pigmentation and a central white mass which hid the way of the vessels at the bottom of the disk. The disk was surrounded by a little elevated grey ring, with irregular borders and mixed with colored areas. The vessels were multiple, thin and radiated (Figure 1).

Morning glory syndrome, GH deficiency and PAX6 gene

Guerra-Junior et al.



**Figure 1.** 1A: The morning glory flower; 1B: Left eye retinography from patient A with a morning glory aspect (Figure 1B was gently offered by Prof. Paulo Mitsuru Imamura, from Department of Ophthalmology, Unifesp/EPM).

All patients were normally delivered at full term, after uneventful pregnancies. Patients A and B had unremarkable medical histories, but patient C presented failure to thrive and delayed psychomotor development, beginning at one year of age. None of them had family history of hormonal disorders or congenital anomalies. Clinical and laboratory data are summarized in Table 1.

**Table 1.** Clinical and laboratory data from three patients with Morning Glory Syndrome and isolated growth hormone deficiency.

	Patient A	Patient B	Patient C
Birth weight (kg)	2.82	2.80	2.85
Birth length (cm)	49.0	49.0	46.0
Strabismus	+	-	+
Ocular hypertelorism	-	-	+
Microphthalmia	-	+	-
Visual acuity	20/400	20/400	15/400
<b>At endocrine evaluation</b>			
Age (years-old)	8.0	12.2	9.0
Weight in Kg (SDS)	16.2 (-4.1)	27.6 (-2.4)	20.0 (-2.7)
Height in cm (SDS)	100.0 (-5.2)	128.5 (-3.0)	107.0 (-4.6)
Pubertal stage	Tanner I	Tanner I	Tanner I
GH 1 (ng/mL) <sup>1</sup>	3.6	0.9	1.9
GH 2 (ng/mL) <sup>2</sup>	0.2	0.5	1.6
IGF-1 (ng/mL) <sup>3</sup>	67.0	115.0	43.0
IGFBP-3 (ng/mL) <sup>4</sup>	1,530	2,650	1,421
TSH (IU/L) <sup>5</sup>	3.8	1.8	4.8
Free T4 (ng/dL) <sup>6</sup>	1.1	1.1	1.2
Cortisol (mcg/dL) <sup>7</sup>	13.4	20.4	17.0
Bone age (Greulich-Pyle)	5.6	11.0	7.0

SDS= standard-deviation score; GH 1 = growth hormone after 0.15 mg/m<sup>2</sup> of oral clonidine; <sup>1</sup>normal range = NR => 7.0 ng/mL; GH 2 after 0.1 IU/kg crystalline insulin i.v.; <sup>2</sup>NR => 7.0 ng/mL; <sup>3</sup>NR = 23.0 to 392.0 ng/mL; <sup>4</sup>NR = 1,250 to 6,350 ng/mL; <sup>5</sup>NR = 0.4 to 6.0 IU/L; <sup>6</sup>0.8 to 2.0 ng/dL; <sup>7</sup>NR = 5.0 to 25.0 mcg/dL

During follow-up, all patients showed low growth rate (below 3 cm/year) and a hormonal profile compatible with isolated growth hormone deficiency (Table 1). They had no symptoms of diabetes insipidus. A magnetic resonance imaging (MRI - Phillips Gyroscan 1,5T), with sagittal and coronal images from the sellar region, was obtained on the T1 weighted spin echo (T1WSE) sequence before and after the paramagnetic contrast medium intravenous administered, and in T2 weighted spin echo sequence. It was observed inferior and posterior herniation of the sella content through the sella floor defect towards the sphenoidal sinus (basal encephalocele) in patients A and B. Patient C did not present encephalocele, but he had a hypoplastic adenohypophysis, ectopic neurohypophysis with a normal stalk (Figure 2).



**Figure 2.** Magnetic resonance imaging (MRI) from patient A: 2A: MRI TSE sequencing, T1-ponderated, sagittal plane, showing inferior and posterior herniation of the sella content through the sella floor defect towards the sphenoidal sinus (basal encephalocele); 2B: MRI TSE sequencing, T1-ponderated, coronal plane, after contrast, showing inferior herniation and deformity of optic chiasm, as well as posterior herniation of sella content towards the sphenoidal sinus; 2C: MRI, T2-ponderated, coronal plane, showing sella floor defect, inferior herniation of optic chiasm, and posterior herniation of sella content towards the sphenoidal sinus.

copyright © ABESM todos os direitos reservados

**Morning glory syndrome, GH deficiency and PAX6 gene**  
Guerra-Junior et al.

Patient A started growth hormone replacement therapy (rhGH) at age of 10, at a dose of 0.03 mg/kg/day, by subcutaneous injections, presenting with a growth rate of 11.5 cm/year during the first year of treatment and a progressive decrease, onward to 5 cm and 3 cm, respectively at the 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> year of treatment, regardless of an increase in the rhGH dosage. Patient B started rhGH at the age of 13 at a dose of 0.03 mg/kg/day. During the first two years of therapy the growth rate was respectively 12 cm/year and 5.0 cm/year, even though rhGH dosage was increased up to 0.05 mg/kg/day at the second year. Patient C was started on rhGH at the age of nine, at a dose of 0.05 mg/kg/day. During the first two years of treatment, growth rate was respectively 6.5 cm/year during the first year and subsequently 5 cm/year. It is worth noting that during the second year the dosage of growth hormone was increased to 0.075 mg/kg/day. No other hormonal deficiencies were observed. Patient C showed a progressive ocular dysfunction and became blind at the right eye. The replacement therapy was discontinued after the third year. The presence of anti-GH antibodies was ruled out in the three cases. Currently, patients A and C are almost near final height and end up very short (height scores below -2 SDS). Patient B is still under rhGH therapy despite poor response.

### Molecular studies

Genomic DNA was isolated from blood leukocytes using standard techniques (9). All fourteen coding and non-coding exons of the human *PAX6* gene were amplified by PCR using specific primers listed in Table 2. PCR reactions were carried in 50 µl containing: ~500 ng genomic DNA, 10% DMSO, 200 µM each dNTP, 20 pmoles of each primer, 1x *Taq* buffer solution (Invitrogen, CA, USA) and 1.5 units of recombinant *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, CA, USA). In general, cycling profiles were: 94 °C for 5 min; 94 °C for 1 min, Ta (°C) specific for each primer pair (Table 2) for 1 min, 72 °C for 1 min (30 cycles); and a final extension step of 72 °C for 5 min. PCR products were purified with Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System (Promega, Madison, WI, USA) and directly sequenced in both sense and antisense orientations using amplification primers; for long fragments, additional sequencing with an internal primer was performed (Table 2). Sequencing reactions were conducted using Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Kit V3.1 Ready Reaction (ABI PRISM / PE Biosystems, Foster City, CA, USA) and DNA sequences were

obtained in an ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer (ABI PRISM/PE Biosystems, Foster City, CA, USA). The electropherograms were analyzed by Chromas Lite program (free-software). Sequencing data obtained in this study was compared to the *PAX6* gene sequence described by International Human Genome Consortium (GENEBANK access # NC\_000011) using the Gene-Runner v3.05 (free-software).

**Table 2.** Primers used for *PAX6* PCR amplifications and sequencing.

Region	Primer sequence (5'-3') <sup>1</sup>	Ta <sup>2</sup> (°C)
Exon 1	s - TCATATCAAACAACGGACC as - AAGAGTGTGGGTGAGGGAAGT	57
Exon 2	s - TTATCTCACTCTCCAGCCG as - GGAGACCTGTCTGAATATGC	55
Exon 3	s - TGTGGGTGAATGCTGGGACT as - GAATATCCCAATCTGTTTCCC	61
Exon 4	s - TTGGGAGTTCAGGCCTACCT as - CCAGTATCGAGAAGAGCCAAG	58
Exon 5 <sup>3</sup> region 1	s - TCAAACCTGACGTGCAGCTAG as - ATAGTGTCCCATCCCTCCT	58
Exon 5 region 2	s - CTAAGGTTGGACCAAGGAT as - TCCAGAAATGTTCCATCACC	59
Exon 5 region 3	s - ACATACTGGCTGCTCTGGTTG as - CTACAGCCATAACCCAGCAG	59
Exon 5 region 4	s - TGGCTGCAGTGTATGAAGA as - CACCACCGAGCTGATCCTC	58
Exon 5 region 5	s - TCTCTCCTTCACTCTGC as - TGAAGAGATAGGGAAGGATG	55
Exons 6-7	6 s - ATTTACTACTCTTTTGTATGC 7 as - AGAGGGTGGGAGGAGTAAAG	56
Exon 6 seq <sup>4</sup>	s - TGGACAATCAAAACGTAAGCT	-
Exon 8	s - AGCTGAGATGGGTGACTGTGT as - AAGGGATGCACATATGGAGAG	58
Exon 9	s - GGGAATGTTTGGTGAGGCT as - ACCTCCAACCAATCCCTTIA	60
Exon 9 seq <sup>4</sup>	s - ACGGAGAAGATCAGATGAGG	-
Exon 10	s - GGAACCAGTTGATGCACAGT as - GCAGCAGAGCATTIAGCAGAC	58
Exons 11-12	s - GTCTGCTAAATGCTCTGCTGC as - AGCTCTCAAGGGTGCAGACAC	60
Exon 13	s - TGGCTGTGTATGTGTTCTC as - AGAAAACCTGCAGTCTCAGGC	58
Exon 14	s - CCATGTCTGTTTCTCAAAGGGA as - CCCCAGTGGTACAATACAGGA	59

<sup>1</sup>s = sense; as = antisense; <sup>2</sup>Ta = annealing temperature used for PCR; <sup>3</sup>The exon 5 was divided in 5 fragments due its long size; <sup>4</sup>Primers used for sequencing only.

## RESULTS

Genomic sequences corresponding to *PAX6* different transcripts were analyzed by direct sequencing. *PAX6* gene is transcribed into nine different transcripts. They differ to each other by alternative splicings of exons 1-4 in the 5'-UTR. Whereas sequencing of *PAX6* coding DNA did not reveal any putative aminoacid change, new variations and several already known SNPs were found in non-coding regions (Table 3).

Patient A was found to be heterozygous for a novel IVS2+9G>A transition in intron 2. Two novel polymorphisms were observed for patient B: transversions g.14807C>A and IVS11+33A>T located in intron 4 and 11, respectively. Conversely, patient C did not present any novel nucleotide variation.

Patients A and C showed heterozygosis for the g.14592C>A (SNP-rs694617) transversion and also for the indel g.15449\_15450insG (SNP-rs5790867) both located in intron 4. In addition, patient C presented the g.24214A>T (SNP-rs2239789) and IVS13+43T>G (SNP-rs3026393) transversions in intron 9 and 13, respectively.

Several SNPs were also observed for patient B. The heterozygosis for the nucleotide changes g.14806T>G (SNP-rs3026368) and g.15003A>G (SNP-rs3026369) within intron 4 were found, additionally only this patient was homozygous for +G allele at the indel g.15449\_15450insG (SNP-rs5790867).

An intron 9 microsatellite formed by TG Short Tandem Repeat (STR) was also investigated. Normally,

*PAX6* alleles bear a sequence of (TG)<sub>19-29</sub> repeats interrupted by a GG dinucleotide and followed by a (TG)<sub>7</sub> repeat. Patients A and C were heterozygous for (TG)<sub>19/21</sub> - GG - (TG)<sub>7</sub> sequences, however patient B was heterozygous for (TG)<sub>16/19</sub> repeats with absence of the intercalated GG dinucleotide and the last (TG)<sub>7</sub> repeats (Table 3).

## DISCUSSION

We reported three patients with ocular lesion compatible with MGS associated with isolated growth hormone deficiency with a limited response to rhGH replacement and *PAX6* gene molecular features.

Neither hereditary nor pregnancy possible events according to published data so far (10) had influenced MGS in the cases described here. Reports on sex ratio have been controversial, but some authors consider MGS to be more common in females (10,11). Nevertheless all patients studied in the present paper were males.

Likewise, the three described patients had bilateral disease whereas MGS is frequently unilateral and non-progressive. In addition, all patients became blind during the follow-up, which is a rare event (10-13). It was impossible to determine if rhGH have had any influence on the worsening the eye disease, since there are no reports available on this subject.

The patients in this report had mild midline defects such as hypertelorism (patient C), strabismus (patients A and C), and microphthalmia (patient B), however no signs of systemic diseases or any hormonal defect other

**Table 3.** PAX6 sequence variation data for three patients with morning glory syndrome and isolated growth hormone deficiency.

	intron 2 (IVS+9G>A)		Intron 4		Intron 9 (STR-(TG) <sub>n</sub> )		Intron 9		Intron 11 (IVS11+33T>A)		Intron 13	
Patient A	G/A	C/A	T/T   C/C   A/A	-G/+G	(TG) <sub>19/21</sub> - GG - (TG) <sub>7</sub>	A/A	T/T	T/T				
Patient B	G/G	C/C	T/G   C/A   A/G	+G/+G	(TG) <sub>16/19</sub>	A/A	T/A	T/T				
Patient C	G/G	C/A	T/T   C/C   A/A	-G/+G	(TG) <sub>19/21</sub> - GG - (TG) <sub>7</sub>	A/T	T/T	T/G				
Genomic position <sup>1</sup>	g.7749G>A	g.14592C>A	g.14806T>G   g.14807C>A     g.15003A>G	g.15449->G	g.24083-g.24156	g.24214A>T	g.24943T>A	g.27895T>G				
SNP <sup>2</sup>	not described	rs694617	rs3026368   not described   rs3026369	rs5790867	rs105252664	rs2239789	not described	rs3026393				
Frequency <sup>3</sup>	-	100% C	-   -   -	-	-	50% A   50% T	-	-				

<sup>1</sup>Based in Ensembl - ENSG0000007372 ([http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens)); <sup>2</sup>SNP number at NCBI SNP database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>); <sup>3</sup>SNP Frequency for several populational groups; NCBI SNP database data (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>); <sup>4</sup>SNP describe as an In del (TG)<sub>n</sub>; therefore, normal alleles are (TG)<sub>19/21</sub> - GG - (TG)<sub>7</sub>.

copyright © ABESAM todos os direitos reservados

**Morning glory syndrome, GH deficiency and PAX6 gene**  
 Guerra-Junior et al.

than growth hormone deficiency was remarked. Most cases of MGS are considered as isolated ocular abnormalities, but other malformations of the skull, facial, mainly midline defects, and central nervous system may occur (13). Associations with genetic syndromes and systemic diseases, including growth hormone deficiency have also been reported (10,11).

The hormonal deficiency described in the other reported cases is usually secondary to the compression of the pituitary gland by basal encephaloceles (14,15), but the natural course of the hypothalamic-pituitary dysfunction is at present still unclear. In our patients the causative factors were not clearly identified. There is always a possibility that the growth hormone deficiency could have occurred by chance. Nonetheless, the growth hormone deficiency was not an isolated fact, and the patients did not have a good response to rhGH treatment, according to Ranke predictive models (16). There are no reports about other patients with MGS that had been treated with rhGH. Our patients had an acceptable response at the beginning of the treatment but a normal growth rate could not be maintained, even with a higher dose than usual, during the subsequent years. GH, IGF-1 and IGFBP-3 profile did not point out a possible GH resistance.

Regarding pituitary function, there was no progression of the hormonal deficiencies, even in what concerns diabetes insipidus, considered a common event associated with MGS (10,13).

In order to verify if mutations on *PAX6* gene could explain MGS phenotypes in those patients, we proceed with *PAX6* sequence analysis. However, nucleotide alterations were not identified in the protein coding sequence. *PAX6* gene sequence analysis revealed several SNPs and at last one non-described heterozygous nucleotide was found in patients A and B. *PAX6* protein is a transcription factor with important functions in the development of eyes and central nervous tissues (17). The most abundant transcripts present 13 or 14 exons depending on the inclusion or not of exon 5a. Therefore, there are two major *PAX6* isoforms: *PAX6*(-5a), with 422 amino acids, and *PAX6*(+5a), with 436 amino acids resulting from the insertion of a 14 amino acid-long sequence in the paired domain (18). Furthermore, alternative splicings are responsible for the production of nine different transcripts, which results from distinct exon combinations in 5'UTR and are transcribed in different tissues, although most of them are mainly found in the cerebral tissue. Evidences suggest that the complexity of *PAX6* transcription, regulation and expression

is probably important for its multiple functions, whereas the spatiotemporal regulation and the expression of *PAX6* isoforms are still not well understood. Recently, some elements corresponding to transcription regulatory consensus sequences have been described within *PAX6* introns, suggesting that intronic sequences are important for the regulation maintenance in a high conserved gene (19). Concerning to SNPs already described, there is only one paper that failed to demonstrate the linkage of SNP rs2239789 to myopia (20). In addition to the SNPs identified in the present study and those already described, *PAX6* gene has a TG microsatellite within intron 9. Dinucleotide repeats located in introns are not generally considered to have functional roles in gene expression. However, their highly variable nature suggests a role as modifiers of RNA splicing. To support this idea, there is the finding that a variable number of TG repeats present in intron 8 of *CFTR* gene contributes to phenotype diversity in Cystic Fibrosis by forming RNA secondary structures that alter exon 9 splicing process (21). Linkages of TG repeats within intronic regions of different genes, including *PAX7* which belongs to the same *PAX6* gene family, have been described in a few diseases (22-24). Therefore, it is possible that nucleotide alterations within introns might have effects in transcript productions. Taking this hypothesis, *PAX6* gene alterations found in patients A, B and C, whereas they cannot be considered as mutations, they could be probably associated with the phenotype. Considering that population studies on the distribution of *PAX6* gene SNPs are not yet available in the database, a well conducted evaluation on normal individuals using novel and described SNPs must be performed to test this hypothesis. In summary, a functional effect of novel and known alterations described here for MGS patients cannot promptly be rejected.

Although MGS is usually a non-progressive untreatable disease, accurate diagnosis is important due to its association with systemic anomalies and increased incidence of retinal detachment (13). Undoubtedly, the disease manifests with a broad spectrum of characteristics, and we might have faced a new expression of the disorder. Notwithstanding, dysplastic optic disc should always be an alert for physicians to the occurrence of an encephalocele (25). Emphasis on these systemic and ocular associations may prompt early detection, and result in benefit from treatment, as well as could possibly be a clue for a better understanding of the disease under the molecular genetics aspects in order to develop a model for further studies.

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

## REFERENCES

- Kindler P. Morning glory syndrome: unusual congenital optic disc anomaly. *Am J Ophthalmol.* 1970;69:376-84.
- McLaurin RL. Encephalocele and related anomalies. In: Hoffman HJ, editor. *Disorder of the developing nervous system: diagnosis and treatment.* St. Louis: Blackwell Scientific; 1986.p.153-71.
- Cohen MM. Selected clinical research involving the central nervous system. *J Craniofac Genet Dev Biol.* 1990;10:215-38.
- Formica F, Iannelli A, Paludetti G, Di Rocco C. Trans-sphenoidal meningoencephalocele. *Child Nerv Syst.* 2002;18:195-8.
- Minotto I, Abdala N, Miachon AA, Spinola e Castro AM, Imamura P, Nogueira RG. Basal encephalocele associated with morning glory syndrome: case report. *Arq Neuropsiquiatr.* 2007; 65:988-91.
- Azuma N, Yamaguchi Y, Handa H, Tadokoro K, Asaka A, Kawase E, Yamada M. Mutations of the PAX6 gene detected in patients with a variety of optic-nerve malformations. *Am J Hum Genet.* 2003;72:1565-70.
- Marquardt T, Ashery-Padan R, Andrejewski N, Scardigli R, Guillemot F, Gruss P. Pax6 is required for the multipotent state of retinal progenitor cells. *Cell.* 2001;105: 43-55.
- Kioussi C, O'Connell S, St-Onge L, Treier M, Gleiberman AS, Gruss P, Rosenfeld MG. Pax6 is essential for establishing ventral-dorsal cell boundaries in pituitary gland development. *Proc Nat Acad Sci USA.* 1999;96:14378-82.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis TE. *Molecular cloning, a laboratory manual.* 1989 New York: Cold Spring Harbor.
- Chan RT, Chan HH, Collin HB. Morning Glory Syndrome. *Clin Exp Optom.* 2002;85:383-8.
- Morioka M, Marubayashi T, Masumitsu T, Miura M, Ushio Y. Basal encephalocele with morning glory syndrome, and progressive hormonal and visual disturbances: case report and review of the literature. *Brain Dev.* 1995;17:196-201.
- Lit ES, D'Amico DJ. Retinal manifestations of morning glory disc syndrome. *Int Ophthalmol Clin.* 2001;41:131-8.
- Lee BJ, Traboulsi EI. Update on the morning glory disc anomaly. *Ophthalmic Genet.* 2008;29:47-52.
- Auber AE, O'Hara M. Morning glory syndrome: MR imaging. *Clin Imaging.* 1999; 23:152-8.
- Koral K, Geffner ME, Curran JG. Trans-sphenoidal and sphenoidal encephalocele: report of two cases and review of the literature. *Australas Radiol.* 2000;44:220-4.
- Ranke MB, Lindberg A, Chatelain P, Wilton P, Cutfield W, Albertsson-Wikland K, Price DA. Derivation and validation of a mathematical model for predicting the response to exogenous recombinant human growth hormone (GH) in prepubertal children with idiopathic GH deficiency. KIGS International Board. Kabi Pharmacia International Growth Study. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84:1174-83.
- Callaerts P, Halder G, Gehring WJ. PAX-6 in development and evolution. *Annu Rev Neurosci.* 1997;20:483-532.
- Epstein JA, Glaser T, Cai J, Jepeal L, Walton DS, Maas RL. Two independent and interactive DNA-binding subdomains of the Pax6 paired domain are regulated by alternative splicing. *Genes Dev.* 1994;8(17):2022-34.
- Kleinjan DA, Seawright A, Childs AJ, van Heyningen V. Conserved elements in Pax6 intron 7 involved in (auto)regulation and alternative transcription. *Dev Biol.* 2004;265(2):462-77.
- Mutti DO, Cooper ME, O'Brien S, Jones LA, Marazita ML, Murray JC, Zadnik K. Candidate gene and locus analysis of myopia. *Mol Vis.* 2007;13:1012-9.
- Hefferon TW, Groman JD, Yurk CE, Cutting GR. A variable dinucleotide repeat in the CFTR gene contributes to phenotype diversity by forming RNA secondary structures that alter splicing. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101 (10): 3504-9.
- Sjakste T, Kalis M, Poudziunas I, Pirags V, Lazdins M, Groop L, Sjakste N. Association of microsatellite polymorphisms of the human 14q13.2 region with type 2 diabetes mellitus in Latvian and Finnish populations. *Ann Hum Genet.* 2007; 71(6):772-6.
- Sjakste T, Eglite J, Sochnevs A, Marga M, Pirags V, Collan Y, Sjakste N. Microsatellite genotyping of chromosome 14q13.2-14q13 in the vicinity of proteasomal gene PSMA6 and association with Graves' disease in the Latvian population. *Immunogenetics.* 2004;56(4):238-43.
- Ziman MR, Pelham JT, Mastaglia FL, Kay PH. Characterization of the alternate allelic forms of human PAX7. *Mamm Genome.* 2000;11(4):332-7.
- Hodgkins P, Lees M, Lawson J, Reardon W, Leitch J, Thorogood P, et al. Optic disc anomalies and frontonasal dysplasia. *Br J Ophthalmol.* 1998;82:290-3.

### Correspondence to:

Gil Guerra-Junior  
 Faculty of Medical Sciences PO Box 6111, Unicamp  
 13083-970 Campinas, SP Brazil  
 E-mail: gilguer@fcm.unicamp.br