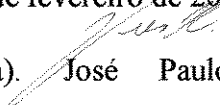


WENER PASSARINHO CELLA

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, área de Ciências Médicas do(a) aluno(a) **Wener Passarinho Cella**.

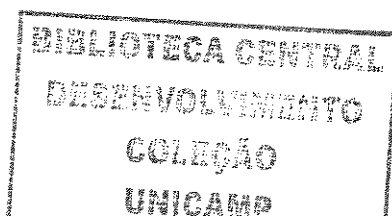
Campinas, 23 de fevereiro de 2005.

Prof(a). Dr(a).  José Paulo Cabral de Vasconcellos
Orientador(a)

**RASTREAMENTO DE MUTAÇÕES NOS GENES
PITX2, *FOXC1* E *GJA1* EM PACIENTES COM
SÍNDROME DE AXENFELD-RIEGER
ASSOCIADA A GLAUCOMA**

CAMPINAS

2005



WENER PASSARINHO CELLA

**RASTREAMENTO DE MUTAÇÕES NOS GENES
PITX2, FOXC1 E GJA1 EM PACIENTES COM
SÍNDROME DE AXENFELD-RIEGER
ASSOCIADA A GLAUCOMA**

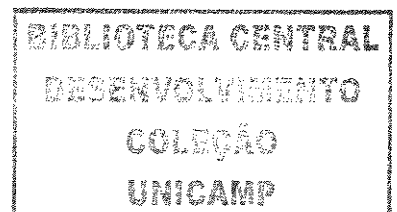
*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre
em Ciências Médicas, área de concentração em
Oftalmologia*

ORIENTADOR: Prof. Dr. José Paulo Cabral de Vasconcellos

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Vital Paulino Costa

CAMPINAS

2005



UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	T/UNICAMP C33r
V	EX
TOMBO BC/	65653
PROC.	16-86-05
C	☐
D	☒
PREÇO	11,00
DATA	14-9-05
Nº CPD	

Bib. d 364379

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

C33r Cella, Wener Passarinho
Rastreamento de mutações nos genes *PITX2*, *FOXC1* e *GJA1* em
pacientes com Síndrome de Axenfeld-Rieger associada a glaucoma /
Wener Passarinho Cella. Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientadores: José Paulo Cabral de Vasconcellos, Vital Paulino
Costa

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Genética humana. 2. Mutação (Biologia). 3. Glaucoma. I.
José Paulo Cabral de Vasconcellos. II. Vital Paulino Costa. III.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
IV. Título.

SLP

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno: WENER PASSARINHO CELLA

Orientador: Prof. Dr. JOSÉ PAULO CABRAL DE VASCONCELLOS

Co-orientador: Prof. Dr. VITAL PAULINO COSTA

Membros:

1. Prof. Dr. José Paulo Cabral de Vasconcellos

2. Prof. Dr. Carlos Eduardo Leite Arieta

3. Prof. Dr. Rui Barroso Schimiti

***Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas***

Data: 23 / 02 / 2005

2005020642

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e avó, que sempre acreditaram em mim.

*À minha esposa Luciana, companheira de toda hora,
que me apóia nos momentos difíceis e me faz acreditar
na existência de dias melhores.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Paulo Cabral de Vasconcellos, orientador e amigo, que muito me honrou em aceitar o desafio de orientar um clínico como eu nos tortuosos caminhos da genética e se transformou em peça fundamental para a conclusão deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Vital Paulino Costa, exemplo de academicismo a ser seguido, pela co-orientação e por me permitir dar o passo inicial na concretização deste sonho.

À Profª. Dra. Mônica Barbosa de Melo, amiga e orientadora *pro bono* que, por amor à genética, se dedicou a este trabalho com tenacidade, paciência e grande empenho, não medindo esforços para que os resultados fossem encontrados com exatidão. Apesar de meus profundos agradecimentos não se limitarem a estas poucas linhas, registro aqui o meu muito obrigado, pois sem a sua ajuda, este estudo teria sido inviável.

Aos Profs. Drs. Newton Kara-José e Carlos Eduardo Leite Arieta, baluartes da boa prática científica e educadores na arte da Oftalmologia.

Ao Prof. Dr. Eduardo Melani Rocha, por sua indispensável colaboração na realização das fotografias que ilustram esta dissertação.

Aos amigos Bianca Kneipp, Aglair Celestino e Maurício Nascimento que várias vezes me ajudaram e que, sem a colaboração deles, eu não teria conseguido resolver todos os problemas à distância.

À toda equipe de auxiliares do Serviço de Oftalmologia da Unicamp que muito me ajudou na coleta do sangue dos pacientes.

Aos pacientes e familiares envolvidos no estudo, pela colaboração constante.

Aos funcionários do Hemocentro da Unicamp, que permitiram o uso dos equipamentos necessários ao desenvolvimento do trabalho.

À CAPES, pela bolsa de estudo fornecida no primeiro ano deste curso de pós-graduação.

	<i>Pág.</i>
RESUMO	<i>xli</i>
ABSTRACT	<i>xliv</i>
1 - INTRODUÇÃO	49
1.1 - Histórico	51
1.2 - Definição	52
1.3 - Características Clínicas	54
1.3.1 - Manifestações oculares.....	54
1.3.1.1 - Córnea.....	54
1.3.1.2 - Ângulo iridocorneano.....	56
1.3.1.3 - Íris.....	57
1.3.1.4 - Outras alterações oculares.....	58
1.3.1.5 - Associação com glaucoma.....	58
1.3.2 - Manifestações extra-oculares.....	58
1.3.2.1 - Alterações dentárias.....	59
1.3.2.2 - Alterações faciais.....	59
1.3.2.3 - Outras alterações.....	59

1.3.3 - Diagnóstico.....	60
1.3.4 - Tratamento.....	60
1.3.4.1 - Tratamento clínico.....	60
1.3.4.2 - Tratamento cirúrgico.....	61
1.4 - Mecanismos Fisiopatológicos.....	61
1.5 - Genética em Oftalmologia.....	64
1.5.1 - Glaucoma associado a anomalias do desenvolvimento.....	65
1.6 - Aspectos Genéticos da Síndrome de Axenfeld-Rieger.....	65
1.6.1 - Gene <i>PITX2</i>	66
1.6.1.1 - Identificação do gene <i>PITX2</i>	66
1.6.1.2 - Estrutura do gene <i>PITX2</i>	70
1.6.1.3 - Função do gene <i>PITX2</i>	71
1.6.1.4 - Tipos de mutações no gene <i>PITX2</i>	72
1.6.2 - Gene <i>FOXC1</i>	73
1.6.2.1 - Identificação do gene <i>FOXC1</i>	73
1.6.2.2 - Estrutura do gene <i>FOXC1</i>	75
1.6.2.3 - Função do gene <i>FOXC1</i>	77
1.6.2.4 - Tipos de mutações no gene <i>FOXC1</i>	77
1.6.3 - Gene <i>GJA1</i>	80

1.6.3.1 - Identificação do gene <i>GJAI</i>	80
1.6.3.2 - Estrutura do gene <i>GJAI</i>	80
1.6.3.3 - Função do gene <i>GJAI</i>	83
1.6.4 - Outros genes e <i>loci</i>	84
1.7 - Objetivos	86
2 - PACIENTES E MÉTODOS	87
2.1 - Pacientes	89
2.1.1 - Critérios de inclusão.....	89
2.1.2 - Critérios de exclusão.....	90
2.1.3 - Grupo controle.....	90
2.2 - Métodos	90
2.2.1 - Dados epidemiológicos.....	90
2.2.2 - Exame oftalmológico.....	91
2.2.3 - Exame sistêmico.....	92
2.2.4 - Biologia molecular.....	92
2.2.4.1 - Extração do DNA.....	92
2.2.4.2 - Reação em cadeia de polimerase (PCR).....	93
2.2.4.3 - Sequenciamento automático.....	96
2.2.4.4 - Digestão com enzima de restrição para avaliação do grupo controle.....	97

2.2.5 - Correlação genótipo/fenótipo.....	98
2.2.6 - Análise dos heredogramas.....	98
2.2.7 - Análise estatística.....	98
2.2.8 - Aspectos éticos.....	98
3 - RESULTADOS.....	99
3.1 - Dados Epidemiológicos.....	101
3.2 - Exame Clínico.....	102
3.3 - Rastreamento de Mutações.....	104
3.3.1 - Gene <i>PITX2</i>	104
3.3.2 - Gene <i>FOXC1</i>	104
3.3.3 - Gene <i>GJA1</i>	111
3.4 - Grupo Controle.....	113
3.5 - Análise de Segregação e de Heredograma.....	113
3.6 - Correlação Genótipo/Fenótipo.....	114
4 - DISCUSSÃO.....	117
4.1 - Dados Epidemiológicos.....	119
4.2 - Mutações no Gene <i>PITX2</i>	122
4.3 - Mutações no Gene <i>FOXC1</i>	127
4.4 - Mutações no Gene <i>GJA1</i>	131

5 - CONCLUSÕES.....	137
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	141
7 - ANEXO.....	161
8 - APÊNDICES.....	165

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

aa	aminoácido
AMPc	adenosina monofosfato cíclico
AS	<i>anti-sense</i>
AV	acuidade visual corrigida
BAC	cromossomo artificial bacteriano
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
Ca²⁺	íon cálcio
CD	conta dedos
cM	centiMorgan
C-terminal	porção carbóxi-terminal
dATP	desoxiadenina trifosfato
dCTP	desoxicitosina trifosfato
Del, del	deleção
dGTP	desoxiguanosina trifosfato
DMSO	dimetilsufóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico
DODD	Displasia Oculodentodigital
dTTP	desoxitimidina trifosfato
Dupl	duplicação

E1, E2	domínios extra-celulares da conexina 43
EDTA	ácido etilenodiaminotetraacético
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
fem	sexo feminino
FISH	hibridização fluorescente <i>in situ</i>
FKHL7	<i>Forkhead Human Drosophila-Like 7</i>
FOXC1	<i>Forkhead Box C1</i>
FOXC2	<i>Forkhead Box C2</i>
FOXF2	<i>Forkhead Box F2</i>
FOXQ1	<i>Forkhead Box Q1</i>
FREAC3	Fator nuclear hepático 3 do rato
GJA1	<i>Gap Junction Protein, Alpha 1</i>
H₂O	água
HhaI	enzima metiltransferase do <i>Haemophilus haemolyticus</i>
IL	alça intracitoplasmática da conexina 43
ins	inserção
IRID1b	possível novo <i>locus</i> para a Síndrome de Axenfeld-Rieger
kb	quilobase
KCl	cloreto de potássio
kDa	quiloDalton
lod score	<i>logarithm of the odds</i> (logaritmo da probabilidade de ligação)

MAF	<i>V-MAF Avian Musculoaponeurotic Fibrosarcoma Oncogene Homolog</i>
masc	sexo masculino
mg/ml	miligrama por mililitro
MgCl₂	cloreto de magnésio
MIM	<i>Mendelian Inheritance in Man</i>
min	minuto
ml	mililitros
mm	milímetros
mM	milimolar
mmHg	milímetros de mercúrio
n	número da amostra
ND	não disponível
ng	nanograma
N-terminal	porção amino-terminal
OD	olho direito
OE	olho esquerdo
p	braço curto do cromossomo
P	nível de significância estatística
PAX6	<i>Paired Box Gene 6</i>
pb	pares de bases

PCR	reação em cadeia de polimerase
pH	potencial hidrogeniônico
PIO	pressão intra-ocular
<i>Pit-1</i>	<i>Pituitary specific transcription factor 1</i>
<i>Pitx</i>	<i>Paired homeobox transcription factor</i>
<i>PITX2</i>	<i>Paired-like Homeodomain Transcription Factor 2</i>
pmol	picomol
pmoles	Picomoles
q	braço longo do cromossomo
RIEG	nome inicial do gene <i>PITX2</i>
RIEG2	segundo <i>locus</i> para Síndrome de Axenfeld-Rieger
RNA	ácido ribonucleíco
RNA_m	ácido ribonucleíco mensageiro
rpm	rotações por minuto
S	<i>sense</i>
seg	segundo
SPL	sem percepção luminosa
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TGFα	<i>Tissue Growth Factor</i> - fração alfa
Trans, t	translocação
Tris-HCl	tris – hidroximetil aminometano (ácido clorídrico)

U	unidade
U/μl	unidade por microlitro
v x h	vertical por horizontal
v/v	volume/volume
W1/W2	<i>wings</i> ou asas do domínio <i>forkhead</i>
XX	cromossomos sexuais femininos
XY	cromossomos sexuais masculinos
YAC	cromossomo artificial de levedura
χ^2	teste do qui-quadrado
°C	grau centigrado
%	porcento
μg	micrograma
μl	microlitro
1M, 2M, 3M, 4M	domínios transmembrana da conexina 43

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela I - Características clínicas das entidades que envolvem os fenótipos de Axenfeld-Rieger e moléstias relacionadas.....	53
Tabela II - Mutações descritas no gene <i>PITX2</i> associadas à Síndrome de Axenfeld-Rieger.....	69
Tabela III - Mutações descritas no <i>FOXC1</i> e sua diversidade fenotípica.....	79
Tabela IV - Sequência dos iniciadores, tamanhos dos fragmentos amplificados e temperaturas de anelamento utilizados para o rastreamento de mutações nos exons do gene <i>PITX2</i>	95
Tabela V - Sequência dos iniciadores, tamanhos dos fragmentos amplificados e temperaturas de anelamento utilizados para o rastreamento de mutações no exon único do gene <i>FOXC1</i>	95
Tabela VI - Sequência dos iniciadores, tamanhos dos fragmentos amplificados e temperaturas de anelamento utilizados para o rastreamento de mutações nos exon 2 do gene <i>GJAI</i>	96
Tabela VII - Caracterização dos casos-índice das famílias estudadas.....	101
Tabela VIII - Características clínicas do total de pacientes do grupo de estudo (n = 13) portadores da Síndrome de Axenfeld-Rieger associada a glaucoma.....	102
Tabela IX Média de idade, idade ao diagnóstico, tempo de glaucoma e realização de cirurgia filtrante prévia de acordo com a presença ou não de manifestações extra-oculares da síndrome nos casos-índice	104
Tabela X - Comparação clínica entre os indivíduos portadores de mutação no gene <i>FOXC1</i> e os indivíduos sem mutação neste gene.....	115

LISTA DE FIGURAS

	<i>Pág.</i>
Figura 1 - Embriotóxon posterior caracterizado pela linha de Schwalbe espessada e anteriorizada (detalhe) vista à biomicroscopia (adaptado de HONKANEN et al, 2003).....	55
Figura 2 - Vista gonioscópica das adesões iridocorneanas periféricas. 2A mostra adesões periféricas grosseiras, de extensão variável (cabeças de seta) (adaptado de HONKANEN et al, 2003); 2B evidencia adesões periféricas menos pronunciadas aderidas ao embriotóxon posterior (seta).....	56
Figura 3 - Alterações irianas características da Síndrome de Axenfeld-Rieger, observando-se extensa atrofia do estroma da íris acometendo sua espessura total na região temporal, associada a corectopia (desvio pupilar) em sentido oposto, além de ectrópio de úvea na borda nasal da pupila (adaptado de KANSKI, 1998).....	57
Figura 4 - Corte histopatológico da região do ângulo iridocorneano evidenciando a inserção alta da íris no trabeculado, o qual apresenta lamelas rudimentares (adaptado de SHIELDS, 1983).....	63
Figura 5 - Organização genômica do <i>PITX2</i> . Os retângulos numerados representam os 4 exons, as linhas horizontais os introns com o respectivo tamanho indicado pelos números sobre elas. ATG é o códon de iniciação no exon 2 e TGA é o códon de terminação no exon 4. O retângulo negro representa a região homeobox e o cinza representa a sequência conservada de 14 aminoácidos. As extremidades centroméricas e teloméricas estão representadas por “cent” e “tel”, respectivamente (modificado de SEMINA et al, 1996a).....	70

- Figura 6 -** Organização genômica do gene *FOXC1*. Os retângulos acinzentados representam as seqüências não-codificadoras, ATG é o códon de iniciação, TGA é o código de terminação, o retângulo negro representa o domínio de ligação *forkhead*, os retângulos amarelos representam os domínios de ativação da transcrição e o retângulo azul o domínio de inibição (modificado de LINES et al, 2002)..... 77
- Figura 7 -** Desenho esquemático da proteína conexina 43. Os círculos avermelhados representam o primeiro e o último aminoácidos de cada domínio. E1 e E2 representam os domínios extra-celulares; M1, M2, M3 e M4 representam os domínios transmembrana; NH₂ representa a porção N-terminal; IL a alça intra-citoplasmática; e COOH a porção C-terminal. *Cell membrane* = membrana celular; *cytoplasm* = citoplasma. (modificado de PAZNEKAS et al, 2003)..... 82
- Figura 8 -** Seqüenciamento direto do produto da PCR correspondente à região 4 do gene *FOXC1*. 8A mostra controle normal, apresentando 7 repetições GGC. 8B mostra o paciente MCV (caso-índice da família 5) apresentando a inserção de 3 bases (GGC) entre os nucleotídeos 1359 e 1360 (1359-1360insGGC), conforme indicado pelas setas..... 105
- Figura 9 -** Biomicroscopia do segmento anterior do paciente MCV (caso-índice 5) evidenciando embriotóxon posterior, atrofia de íris, corectopia e ectrópio de úvea. 9A representa o olho direito; 9B representa o olho esquerdo..... 106
- Figura 10 -** Heredograma da família 5 mostrando o caso-índice (seta) como o único indivíduo acometido pela Síndrome de Axenfeld-Rieger..... 106
- Figura 11 -** Seqüenciamento direto do produto da PCR correspondente à região 2 do gene *FOXC1*. 11A mostra controle normal. 11B mostra o paciente WDC (caso-índice 8), apresentando a deleção de 2 bases (CT) entre os nucleotídeos 718 e 719, conforme indicado pelas setas 107

Figura 12 -	Heredograma da família 8 mostrando o caso-índice (seta) como o único indivíduo portador da síndrome associada a glaucoma.....	107
Figura 13 -	Seqüenciamento direto do produto da PCR da região 2 do gene <i>FOXC1</i> . 13A mostra indivíduo do grupo controle. 13B mostra o paciente OGS (caso-índice 6), que apresenta a mutação TGG→TGA (indicada pela seta), resultando na substituição de um aminoácido tripotofano por um códon de terminação (Trp152STOP).....	108
Figura 14 -	Paciente OGS (caso-índice 6). 14A e 14C mostram as alterações ósseas caracterizadas por aplanamento da região média da face devido à hipoplasia de maxilares, hipertelorismo e órbitas rasas; 14B evidencia as malformações e fragilidade dentárias; 14D mostra ausência de alterações na pele peri-umbilical.....	109
Figura 15 -	15A mostra alterações oculares do paciente OGS (família 6), caracterizadas por embriotóxon posterior, adesões iridocorneanas periféricas e áreas de atrofia iriana causando polícoria; 15B e 15C mostram alterações oculares do paciente RGS (família 6), evidenciando atrofia de estroma iriano, ectrópio uveal, embriotóxon posterior e adesões iridocorneanas periféricas.....	110
Figura 16 -	Paciente LGS, indivíduo mais jovem da família 6, com glaucoma diagnosticado desde o nascimento. Observa-se aplanamento da região média da face devido à hipoplasia de maxilares, além de hipertelorismo e malformações dentárias, caracterizada pela ausência de incisivos laterais superiores.....	110
Figura 17 -	Seqüenciamento direto do produto da PCR evidenciando uma nova mutação em heterozigose no gene <i>GJAI</i> . 17A mostra indivíduo controle. 17B mostra indivíduo portador da mutação GCG→GTG (seta), resultando na alteração do aminoácido localizado no códon 253 (Ala253Val).....	111

Figura 18 - Heredograma da família 6 evidenciando seis indivíduos acometidos pela síndrome associada à glaucoma. O caso-índice (seta) e seu irmão (quadrados azuis) apresentam mutações nos genes *FOXC1* e *GJAI* e clinicamente apresentam fenótipos menos graves que os demais pacientes acometidos por mutações apenas no gene *FOXC1*. Observa-se uma transmissão autossômica dominante da síndrome com segregação concomitante da mutação no gene *FOXC1*. SAR = Síndrome de Axenfeld-Rieger..... 112

Figura 19 - 19A - Avaliação dos membros da família 6, segundo digestão do produto da PCR do gene *GJAI* (região 2) com a enzima *HhaI*. M = marcador de peso molecular "ladder 1Kb"; 1 e 3 = pacientes OGS (caso-índice) e RGS, portadores da mutação Ala253Val (fragmentos de 1079, 914 e 165 pb); 2 e 4 = esposa e filho do paciente OGS, respectivamente, ambos não portadores da mutação (fragmentos de 914 e 165 pb). 19B - Avaliação do grupo controle segundo digestão do produto da PCR do gene *GJAI* (região 2) com a enzima *HhaI*. M = marcador de peso molecular "ladder 1Kb"; 1 = produto da PCR não digerido (fragmento de 1079 pb); 2 = controle positivo para a mutação Ala253Val em heterozigose (fragmentos de 1079, 914 e 165 pb); 3 a 11 = indivíduos do grupo controle, não portadores da mutação (fragmentos de 914 e 165 pb).... 113

RESUMO

A Síndrome de Axenfeld-Rieger é uma entidade clínica rara, de transmissão autossômica dominante e grande variabilidade clínica, podendo chegar à penetrância incompleta. Manifesta-se clinicamente por malformações do segmento anterior do olho acompanhada ou não de malformações extra-oculares, das quais as mais comuns são alterações dos ossos craniofaciais e dos dentes e falência de involução da pele peri-umbilical. O principal fator de morbidade da síndrome é a associação com glaucoma de desenvolvimento, presente em aproximadamente 50% dos indivíduos afetados. Dois genes, *PITX2*, localizado no cromossomo 4q25, e *FOXC1*, no cromossomo 6 p25, estão associados à Síndrome de Axenfeld-Rieger. Recentemente, identificou-se o gene *GJA1* associado à Síndrome de Displasia Oculodentodigital, a qual compartilha aspectos clínicos com a Síndrome de Axenfeld-Rieger tais como malformações do segmento anterior ocular, glaucoma e alterações ósseas e dentárias, tornando-se, assim também, mais um gene candidato para a Síndrome de Axenfeld-Rieger. O objetivo deste estudo foi avaliar a frequência e os tipos de mutações nos genes *PITX2*, *FOXC1* e *GJA1* em pacientes portadores da Síndrome de Axenfeld-Rieger associada a glaucoma, além de correlacionar possíveis alterações moleculares com aspectos clínicos dos pacientes. Para tanto, foram examinados oito indivíduos (casos-índice) acometidos pela síndrome associada a glaucoma, assim como seus familiares. Após avaliação oftalmológica e sistêmica, foram coletados 5ml de sangue periférico para extração de DNA genômico, o qual foi amplificado por reação em cadeia de polimerase utilizando-se pares de iniciadores específicos para as regiões codificadoras e limites íntron/exon dos genes *PITX2*, *FOXC1* e *GJA1*, procedendo-se com o sequenciamento automático para o rastreamento de mutações. Não foram encontradas mutações no gene *PITX2*. No gene *FOXC1* foram encontradas uma inserção (1359-1360insGGC), uma deleção (718-719delCT) e uma mutação de ponto do tipo sem sentido (Trp152STOP) entre as famílias estudadas. O paciente portador da deleção no gene *FOXC1* era um caso isolado e apresentava apenas alterações oculares da síndrome. As outras duas mutações ocorreram em pacientes com manifestações oculares e sistêmicas da doença, estando a inserção presente em um caso isolado e a mutação sem sentido em seis indivíduos da mesma família com padrão de transmissão autossômico dominante. O rastreamento de mutações no gene *GJA1* evidenciou uma mutação de ponto do tipo sentido trocado (Ala253Val) em três indivíduos da mesma família, sendo que um deles era

cl clinicamente normal e dois sintomáticos que apresentavam concomitantemente a mutação Trp152STOP no gene *FOXC1*. Esta é a primeira descrição de uma mutação no gene *GJAI* em pacientes inequivocamente portadores da Síndrome de Axenfeld-Rieger. As frequências de mutações observadas nos genes *PITX2*, *FOXC1* e *GJAI* em oito famílias brasileiras com Síndrome de Axenfeld-Rieger e glaucoma de desenvolvimento associado foram de 0%, 37,5% e 12,5%, respectivamente, sendo esta última em combinação com a mutação Trp152STOP no gene *FOXC1*. Apesar da amostragem reduzida, observou-se uma tendência a maior agressividade do glaucoma em pacientes portadores de mutação somente no gene *FOXC1* do que nos indivíduos portadores de mutação concomitante no gene *FOXC1* e no gene *GJAI*, sugerindo um possível efeito protetor da mutação Ala253Val no gene *GJAI* nesta família. Outros estudos são necessários, contudo, para definir a função do gene *GJAI* na etiopatogênese da Síndrome de Axenfeld-Rieger.

Palavras-chave: genética humana, mutação, glaucoma

ABSTRACT

Axenfeld-Rieger Syndrome (ARS) is a rare disorder, usually transmitted in an autosomal dominant pattern characterized by anterior segment dysgenesis and often associated with developmental glaucoma. In addition to the ocular changes observed in ARS, syndromic features can also occur, such as facial bone defects, teeth anomalies and peri-umbilical skin involution. Two transcription factor genes, *PITX2* on chromosome 4q25 and *FOXC1* on chromosome 6p25, have been associated with the ARS phenotype through mutational events. Recently, the *GJAI* gene (connexin 43), associated with oculodentodigital dysplasia (ODDD) syndrome, which presents some similarities with ARS, was identified. The ODDD syndrome is characterized by malformations that involve the face, eyes, teeth and bones. The ocular abnormalities include microphthalmos and anterior segment dysgenesis that may lead to glaucoma as well. The main purpose of this study was to evaluate *FOXC1*, *PITX2* and *GJAI* genes mutations in Brazilian patients with ARS. Eight unrelated patients affected by ARS (all of them with glaucoma and 5 without systemic malformations) and their families were ophthalmologically evaluated and had their blood collected for DNA extraction purposes. The coding regions and intron/exon boundaries of these genes were completely evaluated through direct sequencing. Among the 8 patients, 3 (37,5%) presented with different structural alterations in the *FOXC1* gene. A deletion in heterozygosis of two bases downstream the forkhead domain was observed in a patient with no systemic malformations (718-719delCT). An insertion of three bases, also downstream the forkhead domain, was identified in a patient with systemic malformation (1359-1360insGGC). A new nonsense mutation (Trp152STOP) was identified in the forkhead domain of the *FOXC1* gene in another patient with ARS and systemic alterations as well. One patient harbored the mutation Ala253Val in the *GJAI* gene (12,5%). No mutations were identified in the *PITX2* gene among these individuals. Patients who carried the *GJAI* (Ala253Val) and *FOXC1* (Trp152STOP) mutations (from the same family) developed less severe glaucoma compared with family members presenting *FOXC1* (Trp152STOP) mutation alone. Three new structural alterations of the *FOXC1* gene and one new mutation in the *GJAI* gene were described in Brazilian patients with ARS and the frequency of mutations in the *PITX2*, *FOXC1* and *GJAI* genes in this study were 0%, 37,5% and 12,5%, respectively. Despite the small number of patients, we found a slight trend to more severe glaucoma in patients with *FOXC1* mutations compared to those without them, except in the

two patients with *FOXC1* and *GJAI* associated mutations, suggesting an attenuation effect of *GJAI* gene mutation (Ala253Val). However, other studies are necessary to define the exact role of *GJAI* in ARS.

Key-words: human genetics, mutation, glaucoma

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Histórico

O primeiro relato de alterações oculares compatíveis com o amplo espectro de manifestações que atualmente compõem a Síndrome de Axenfeld-Rieger data de 1883, quando VOSSIUS¹ descreveu o caso de uma criança com ausência parcial de tecido iriano em um olho e ectopia pupilar com atrofia do estroma iriano no olho contralateral.

Em 1920, AXENFELD² chamou de “*embryotoxon cornea posterius*” a uma linha branca na superfície posterior da córnea periférica, que distava aproximadamente 1 mm do limbo e à qual se aderiam feixes de tecido iriano que atravessavam o ângulo da câmara anterior. Nesta descrição inicial, AXENFELD observou também a presença de hipoplasia leve do estroma iriano e de um coloboma parcial da íris.

Em 1934, no Encontro da Sociedade de Oftalmologia de Viena, RIEGER³ descreveu dois pacientes com hipoplasia de íris associada a achados oculares inespecíficos, como a presença, em um deles, de um tecido anormal no ângulo iridocorneano e o aumento da pressão ocular. No mesmo ano, ROSSANO⁴ descreveu o caso de um pai e filho com fenótipos semelhantes que, além das alterações oculares, apresentavam também alterações faciais compatíveis com hipoplasia dos ossos maxilares.

Em 1935, RIEGER⁵ descreveu seus achados detalhadamente e, relatando o caso de uma família (mãe e dois filhos) com hipoplasia do estroma anterior da íris associada a pupilas ectópicas e irregulares, postulou que estas alterações eram devidas a uma inibição do desenvolvimento embrionário durante o segundo mês de gestação, sendo transmitidas como herança dominante. A este fenótipo RIEGER denominou “*dysgenesis mesodermalis corneae et iridis*”.

¹ VOSSIUS, A. *apud*, ALWARD, W. L. M. Axenfeld-Rieger syndrome in the age of molecular genetics. **Am J Ophthalmol**, 130:107-15, 2000

² AXENFELD, T. H. *apud*, ALWARD, W. L. M. Axenfeld-Rieger syndrome in the age of molecular genetics. **Am J Ophthalmol**, 130: 107-5, 2000.

³ RIEGER, H. *apud*, ALWARD, W. L. M. Axenfeld-Rieger syndrome in the age of molecular genetics. **Am J Ophthalmol**, 130: 107-15, 2000.

⁴ ROSSANO, R. *apud*, ALWARD, W. L. M. Axenfeld-Rieger syndrome in the age of molecular genetics. **Am J Ophthalmol**, 130: 107-15, 2000.

⁵ RIEGER, H. *apud*, ALWARD, W. L. M. Axenfeld-Rieger syndrome in the age of molecular genetics. **Am J Ophthalmol**, 130: 107-15, 2000.

MATHIS⁶, em 1936, observou que os pacientes descritos por RIEGER apresentavam redução no número de dentes e hipotetizou que estas alterações eram devidas a uma inibição do desenvolvimento durante a sexta ou sétima semanas gestacionais, o que correspondia ao período em que RIEGER acreditava ocorrerem as alterações oculares. As observações de MATHIS foram corroboradas por RIEGER⁷ em 1941, que observou a presença de alterações nos ossos faciais dos seus pacientes além das alterações dentárias previamente descritas.

1.2 - Definição

As diversas denominações que a síndrome recebeu no passado baseavam-se nos possíveis mecanismos embriológicos que levavam à sua manifestação clínica (SHIELDS, 1983). Termos como “disgenesia mesodérmica da córnea e íris” (AXENFELD, 1920⁸) e “síndrome de clivagem da câmara anterior” (REESE e ELLSWORTH, 1966) foram amplamente empregados, mas o avanço no conhecimento da embriologia humana mostrou que estas nomenclaturas não eram apropriadas, pois as alterações nas estruturas oculares são originadas de defeitos nas células da crista neural (SHIELDS, 1983).

A procura por uma terminologia mais adequada, que classificasse as alterações de acordo com as suas características clínicas, levou à formulação de três grupos distintos: “Anomalia de Axenfeld”, “Anomalia de Rieger” e “Síndrome de Rieger” (SHIELDS, 1983). Na Anomalia de Axenfeld, as alterações estavam restritas à periferia da córnea e ao ângulo iridocorneano. Quando às alterações da periferia da córnea e do ângulo somavam-se alterações irianas, denominava-se Anomalia de Rieger. Finalmente, a Síndrome de Rieger compreendia a presença de todas estas alterações oculares associadas a

⁶ MATHIS, H. *apud*, ALWARD, W. L. M. Axenfeld-Rieger syndrome in the age of molecular genetics. **Am J Ophthalmol**, 130: 107-15, 2000.

⁷ RIEGER, H. *apud*, ALWARD, W. L. M. Axenfeld-Rieger syndrome in the age of molecular genetics. **Am J Ophthalmol**, 130: 107-15, 2000.

⁸ AXENFELD, T. H. *apud*, ALWARD, W. L. M. Axenfeld-Rieger syndrome in the age of molecular genetics. **Am J Ophthalmol**, 130: 107-5, 2000.

alterações sistêmicas. Além destes grupos, outras entidades clínicas consideradas distintas, fazem diagnóstico diferencial com os fenótipos de Axenfeld-Rieger. Dentre estas entidades destacam-se a hipoplasia de íris, a anomalia da iridogoniodisgenesia, a síndrome da iridogoniodisgenesia e a iridogoniodisplasia familiar associada a glaucoma (ALWARD, 2000), cujas características clínicas encontram-se na Tabela I.

Tabela I - Características clínicas das entidades que envolvem os fenótipos de Axenfeld-Rieger e moléstias relacionadas

Malformações	Anomalia de Axenfeld	Anomalia de Rieger	Síndrome de Rieger	Hipoplasia de íris	Síndrome de iridogoniodisgenesia	Iridogoniodisplasia familiar associada a glaucoma
Linha de Schwalbe espessada e anteriorizada	X	X	X			
Adesões iridocorneanas periféricas	X	X	X		X	X
Hipoplasia de íris		X	X	X	X	X
Policoria		X	X			
Corectopia		X	X			
Alterações sistêmicas			X		X	

Contudo, a diferenciação clínica entre estes grupos nem sempre era possível, ou pela sutileza das alterações irianas, ou pela ocorrência de sobreposições nas manifestações clínicas entre anomalia e síndrome (SHIELDS, 1983). A sobreposição dos fenótipos com conseqüente dificuldade de elaboração de um diagnóstico clínico preciso levou a suposições de que o espectro de alterações oculares e sistêmicas tratava-se, na realidade, de um distúrbio único do desenvolvimento embrionário (REESE e ELLSWORTH, 1966; ALKEMADE, 1969; WARING et al, 1975).

Em 1983, através de estudos de correlação clínico-patológica, SHIELDS propôs que as diferentes categorias fossem agrupadas sob a nomenclatura única de “Síndrome de Axenfeld-Rieger”. SHIELDS observou que, apesar de pertencerem a categorias clínicas

distintas, os pacientes estudados possuíam alterações anátomo-patológicas oculares semelhantes. Além disso, algumas características epidemiológicas eram comuns a estes pacientes, como bilateralidade das alterações oculares, alta incidência de glaucoma associado, presença de história familiar com herança autossômica dominante, associação a alterações sistêmicas e ausência de predileção sexual. A instituição de uma nomenclatura única manteve referência às categorias clínicas antigas, mas simplificou o diagnóstico e permitiu que o paciente pudesse ser avaliado de forma mais sistemática na busca de alterações sistêmicas associadas às oculares (SHIELDS, 1983).

1.3 - Características Clínicas

1.3.1 - Manifestações oculares

As estruturas oculares envolvidas na Síndrome de Axenfeld-Rieger são a córnea, o ângulo iridocorneano e a íris.

1.3.1.1 - Córnea

A linha de Schwalbe é a estrutura da córnea comprometida na síndrome. Esta linha representa a zona de transição entre o endotélio corneano e o endotélio do trabeculado e é originalmente formada pela inserção oblíqua da malha uveal na parede anterior do sulco escleral (SPENCER et al, 1968).

Em pacientes com Síndrome de Axenfeld-Rieger, a linha de Schwalbe encontra-se espessada e anteriorizada, podendo estender-se por toda a circunferência posterior da córnea (SHIELDS, 1983). Quando muito anteriorizada, pode ser observada ao exame externo como uma linha branca na região posterior da córnea, próximo ao limbo, condição inicialmente chamada por AXENFELD de embriotóxon posterior [Figura 1].

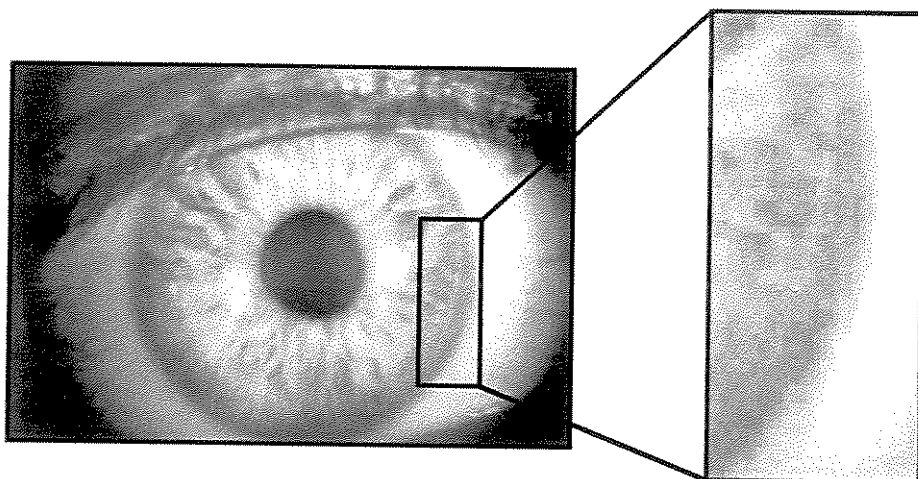


Figura 1 - Embriotóxon posterior caracterizado pela linha de Schwalbe espessada e anteriorizada (detalhe) vista à biomicroscopia (adaptado de HONKANEN et al, 2003).

Estudos de histoquímica e microscopia revelaram que a linha de Schwalbe anormalmente espessada é composta por colágeno denso e substância basal, ambos recobertos por uma camada simples de células fusiformes com membrana basal que pode estender-se tanto sobre o trabeculado anterior como se continuar com a membrana de Descemet (SHIELDS, 1983). Em alguns casos, a linha de Schwalbe anormal pode estar separada da córnea por uma fina membrana (WOLTER et al, 1967).

O achado isolado desta linha de Schwalbe anormal pode representar uma forma frustra da síndrome, pois não aumenta o risco de glaucoma secundário e não está associada a alterações sistêmicas (SHIELDS et al, 1985). Além disso, a linha de Schwalbe espessada e anteriorizada pode estar presente em até 15% da população geral, não sendo considerada, portanto, uma alteração patognomônica da síndrome (SHIELDS et al, 1985).

A córnea não apresenta outras alterações características da síndrome, podendo ocasionalmente apresentar mudanças no tamanho, na forma e na transparência (AWAN, 1977; DARK e KIRKHAM, 1968). O endotélio corneano é normal, com a presença de células hexagonais de limites bem definidos, à exceção de pacientes idosos ou com pressão ocular cronicamente elevada, em que alterações discretas na morfologia celular são comuns (SHIELDS, 1983).

1.3.1.2 - Ângulo iridocorneano

As alterações observadas na região do ângulo da câmara anterior, formado pela junção entre a córnea e a íris, são representadas por adesões iridocorneanas periféricas e por anormalidades ultra-estruturais na malha trabecular.

As adesões entre a íris periférica e a córnea, mais especificamente na altura da linha de Schwalbe, são formadas por feixes de tecido de cor e textura semelhantes à íris adjacente, podendo variar em número e extensão (SHIELDS, 1983) [Figura 2]. Estas adesões periféricas podem se inserir anteriormente, posteriormente ou sobre a linha de Schwalbe e, apesar de serem constituídas por um tecido semelhante ao do estroma iriano, podem estar associadas a uma camada simples de células fusiformes com membrana basal inconstante. Esta camada simples de células fusiformes, por vezes, é a única constituinte da ligação periférica entre a córnea e a íris (SHIELDS, 1983).

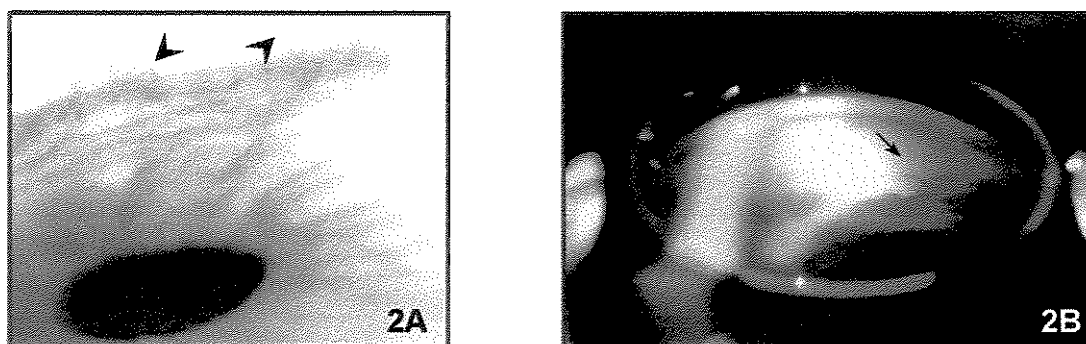


Figura 2 - Vista gonioscópica das adesões iridocorneanas periféricas. 2A mostra adesões periféricas grosseiras, de extensão variável (cabeças de seta) (adaptado de HONKANEN et al, 2003); 2B evidencia adesões periféricas menos pronunciadas aderidas ao embriotoxon posterior (seta).

O ângulo da câmara anterior encontra-se aberto por trás das adesões iridocorneanas periféricas e, portanto, o trabeculado é visível. O esporão escleral, contudo, apresenta-se geralmente encoberto em extensão variável, devido à inserção alta do estroma da íris no terço posterior do trabeculado (SHIELDS, 1983; SHIELDS et al, 1985). À microscopia, a malha trabecular é composta por lamelas estreitas e compactadas nas suas porções mais externas e o canal de Schlemm é rudimentar e pode estar ausente (SHIELDS, 1983).

1.3.1.3 - Íris

As alterações na íris se caracterizam tanto pelas adesões periféricas à córnea como por áreas de atrofia no seu estroma. A atrofia estromal ocorre em intensidades diferentes, podendo ocasionar a formação de soluções de continuidade (pseudocoria) que podem vir acompanhadas de deformação e desvio da pupila (corectopia) e ectrópio de úvea (SHIELDS, 1983). O desvio da pupila orienta-se tipicamente em direção a uma adesão periférica proeminente, enquanto a área de atrofia situa-se na porção iriana contralateral ao da corectopia (SHIELDS, 1983) [Figura 3]. Recobrimdo a superfície anterior da íris e o ângulo iridocorneano, encontra-se, em alguns casos, uma camada simples de células fusiformes com membrana basal. Esta camada celular é mais freqüente nas regiões da íris para as quais a corectopia e o ectrópio de úvea se direcionam (SHIELDS, 1983; TROEBER e ROCHELS, 1980). Na região de atrofia de íris os vasos sanguíneos mostram uma grande quantidade de membrana basal e, quando examinados por angiografia fluoresceínica, revelam defeitos focais de enchimento (SHIELDS, 1983).

As alterações do estroma iriano podem ter caráter progressivo, principalmente nos primeiros anos de vida (CROSS e MAUMENEE, 1973), enquanto as adesões periféricas tendem a ser estáveis, podendo sofrer apenas um aumento na sua espessura com o decorrer do tempo (SHIELDS, 1983).

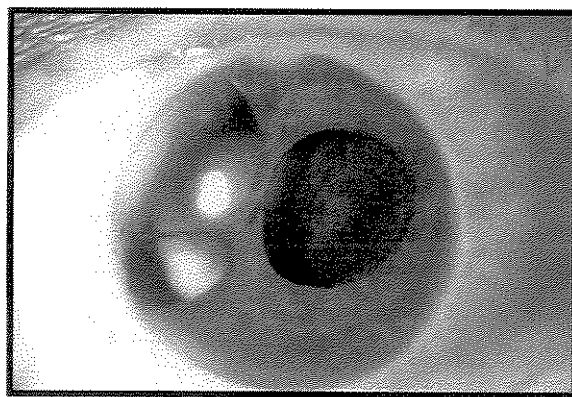


Figura 3 - Alterações irianas características da Síndrome de Axenfeld-Rieger, observando-se extensa atrofia do estroma da íris acometendo sua espessura total na região temporal, associada a corectopia (desvio pupilar) em sentido oposto, além de ectrópio de úvea na borda nasal da pupila (adaptado de KANSKI, 1998).

1.3.1.4 - Outras alterações oculares

Apesar de outras alterações oculares já terem sido descritas em associação à Síndrome de Axenfeld-Rieger, elas não ocorrem com frequência suficiente para serem consideradas pertencentes ao espectro clássico de manifestações. Destas, a mais comum é a presença de estrabismo (SHIELDS et al, 1985), além de outras menos frequentes ainda como dermóides límbicos, catarata, descolamento de retina, degeneração macular, coloboma coriorretiniano, hipoplasia de coróide e hipoplasia de nervo óptico (SHIELDS, 1983; HENKIND e FRIEDMAN, 1971).

1.3.1.5 - Associação com glaucoma

A associação entre Síndrome de Axenfeld-Rieger e glaucoma ocorre em aproximadamente 50% dos casos (SHIELDS, 1983). O glaucoma pode-se tornar manifesto durante a infância ou, mais frequentemente, durante a adolescência ou início da idade adulta (SHIELDS, 1983). Aparentemente, o glaucoma é mais frequente em pacientes com defeitos no estroma iriano, mas a extensão desses defeitos não apresenta relação direta com o aumento da pressão ocular (SHIELDS et al, 1985). O principal fator de risco nesses pacientes para o desenvolvimento de glaucoma é a inserção alta da íris no trabeculado posterior (SHIELDS, 1983). O glaucoma associado à síndrome costuma ser de difícil controle, muito raramente apresenta regressão espontânea (GREHN e MACHENSEN, 1982) e geralmente resulta em graves alterações do disco óptico e em defeitos no campo visual (SHIELDS et al, 1985).

1.3.2 - Manifestações extra-oculares

As malformações sistêmicas mais comumente associadas à Síndrome de Axenfeld-Rieger incluem aquelas que afetam os dentes e os ossos faciais, porém uma grande variedade de outras alterações já foi descrita numa frequência menor de casos (SHIELDS et al, 1985).

1.3.2.1 - Alterações dentárias

As alterações dentárias compreendem defeitos na forma e no número dos dentes. Podem estar presentes como uma diminuição na coroa dentária (microdontia), diminuição do número e alargamento do espaço entre os dentes (hipodontia) e diminuição focal do número de dentes (oligodontia ou anodontia). Os dentes que mais freqüentemente estão ausentes são os primeiros molares e os incisivos centrais (CHOSAK e ROSENZWEIG, 1966; CROSS et al, 1979).

1.3.2.2 - Alterações faciais

As alterações dos ossos faciais foram inicialmente descritas por RIEGER e se caracterizam por hipoplasia dos ossos maxilares, com conseqüente aplanamento da região média da face, retração secundária do lábio superior e protrusão do lábio inferior, mais evidentes se associados a alterações dentárias (SHIELDS et al, 1985). Outras alterações faciais como hipertelorismo, telecanto e alargamento da base nasal foram igualmente descritas em associação à síndrome (De HAUWERE et al, 1973; WESLEY et al, 1978).

1.3.2.3 - Outras alterações

A redundância de pele ao redor da cicatriz umbilical e a presença de hipospádias são alterações observadas com certa freqüência na síndrome (JORGENSEN et al, 1978; CROSS et al, 1979). Alterações na hipófise são menos freqüentes, mas podem ser o achado mais grave, manifestando-se como síndrome da sela túrcica vazia (SHIELDS, 1983; KLEINMAN et al, 1981), como deficiência de hormônio de crescimento e baixa estatura (FEINGOLD et al, 1969; SADEGHI-NEJAD e SENIOR, 1974) ou como cisto aracnóide para-selar congênito (SHIELDS, 1983).

Diversas outras alterações sistêmicas associadas já foram descritas, como albinismo oculocutâneo (LUBIN, 1981), malformações cardíacas, surdez neurosensorial, retardo mental e manifestações neurológicas e dermatológicas diversas

(ALKEMADE, 1969), mas por terem frequência esporádica, não compõem o quadro clínico característico da síndrome. Estas observações sugerem que pacientes portadores da Síndrome de Axenfeld-Rieger estão sujeitos a apresentar uma ampla variedade de manifestações clínicas diferentemente daquelas que normalmente a caracterizam (SHIELDS et al, 1985).

1.3.3 - Diagnóstico

Embora o diagnóstico clínico da síndrome possa ocorrer ao nascimento ou na idade adulta, a maioria dos casos é observada durante a infância e adolescência pela descoberta de alterações irianas, glaucoma, redução visual ou mesmo pelo achado de alterações sistêmicas (SHIELDS et al, 1985). A presença de história familiar positiva auxilia o diagnóstico, pois, classicamente, o padrão de herança é autossômico dominante, mesmo sendo freqüentes os casos isolados (SHIELDS et al, 1985).

1.3.4 - Tratamento

Sob o aspecto oftalmológico, o tratamento do paciente com Síndrome de Axenfeld-Rieger deve-se concentrar no controle do glaucoma, fator de grande morbidade que geralmente se manifesta nas primeiras décadas de vida ou, mais raramente, na idade avançada, e que pode levar à cegueira (SHIELDS, 1983).

1.3.4.1 - Tratamento clínico

O tratamento clínico baseia-se na redução da produção do humor aquoso através de medicamentos tópicos ou sistêmicos, com conseqüente diminuição da pressão intra-ocular (SHIELDS et al, 1985). No passado, mióticos como a pilocarpina eram preconizados na tentativa de aumentar o fluxo de escoamento do humor aquoso, mas esta terapia não é mais recomendada, pois a inserção alta da íris pode causar um colapso da malha trabecular secundária ao espasmo da musculatura ciliar induzida por este tipo de medicamento (SHIELDS et al, 1985).

1.3.4.2 - Tratamento cirúrgico

Na incapacidade de controle pressórico com tratamento clínico, deve-se optar pelo tratamento cirúrgico. A trabeculoplastia a laser é um método de tratamento de sucesso limitado, já que a presença de adesões iridocorneanas periféricas prejudica sua realização, assim como a inserção alta da íris aumenta as chances de se desenvolverem goniossinéquias. Além disso, devido à imaturidade da malha trabecular, o aumento do espaços entre as suas lamelas não proporciona melhora no fluxo de escoamento. (SHIELDS et al, 1985).

A goniotomia é prejudicada pelas adesões iridocorneanas periféricas e pela inserção alta da íris e a trabeculotomia geralmente não alcança êxito devido à imaturidade ou ausência do canal de Schlemm (LUNTZ, 1979).

Assim, o tratamento cirúrgico ideal é a trabeculectomia, com o objetivo de criar uma via de escoamento adicional ao humor aquoso (SHIELDS et al, 1985).

1.4 - Mecanismos Fisiopatológicos

A hipótese de que a variedade de manifestações encontradas na Síndrome de Axenfeld-Rieger deve-se a um defeito embrionário nas estruturas derivadas das células da crista neural é consistente com a maioria dos achados clínicos (SHIELDS, 1983).

Durante a embriogênese ocular normal, a vesícula do cristalino inicia sua invaginação a partir do placóide óptico ectodérmico na terceira semana gestacional e, ao se desprender completamente do ectoderma superficial na sexta semana, está envolvida por uma massa de células neuroectodérmicas provenientes da crista neural que formam o disco óptico (SHIELDS, 1983). Estas células da crista neural sofrem três ondas de migração entre o ectoderma superficial e a vesícula do cristalino, que originam, sequencialmente, o endotélio corneano primordial, o estroma da córnea e, finalmente, a membrana pupilar e o estroma da íris (HAY, 1980; WULLE, 1972). É esta mesma linhagem de células que dá origem ao mesênquima da hipófise, dos ossos e cartilagens faciais e das papilas dentárias (JOHNSTON et al, 1973; EDWARDS e TORCZYNSKI, 1981).

Na sétima semana gestacional, as células da crista neural que originarão a malha trabecular já estão localizadas na região do ângulo iridocorneano (TRIPATHI et al, 1996), e no início do quinto mês de gestação, encontram-se recobertas pelo endotélio corneano primordial que se estende também sobre as estruturas iridopupilares, criando uma cavidade fechada (HANSSON e JERNDAL, 1971). Esta membrana endotelial contínua vai desaparecendo da região pupilar em direção ao ângulo iridocorneano (WORST, 1966), tornando-se progressivamente menos espessa por volta do sétimo mês gestacional e fenestrada ao final da gestação e durante as primeiras semanas de vida pós-natal (HANSSON e JERNDAL, 1971).

Independentemente da reabsorção do endotélio corneano primordial, o endotélio da malha trabecular começa a sofrer fenestração a partir da décima semana gestacional (TRIPATHI et al, 1996), iniciando-se no lado da câmara anterior e progredindo em direção ao canal de Schlemm (TAWARA e INOMATA, 1981). O canal de Schlemm, por sua vez, é derivado do folheto mesodérmico, e torna-se vacuolado a partir do quinto mês gestacional (TRIPATHI et al, 1996).

No quinto mês de gestação, a superfície anterior da íris insere-se na margem do endotélio corneano, recobrimo as células que darão origem à malha trabecular. A progressiva diferenciação das células endoteliais da córnea e do ângulo iridocorneano forma, na região de transição entre a córnea e o tecido uveal, uma linha de demarcação que originará a linha de Schwalbe (HANSSON e JERNDAL, 1971). Com o decorrer da gestação ocorre um reposicionamento posterior da íris em relação à córnea e esclera e, ao nascimento, a inserção da íris encontra-se próxima do esporão escleral, continuando sua migração posterior durante os primeiros anos de vida (TRIPATHI et al, 1996; ANDERSON, 1981).

O mecanismo fisiopatológico proposto por SHIELDS, em 1983, baseia-se no retardo do desenvolvimento das estruturas oculares anteriores derivadas das células da crista neural ao final do período gestacional, causando uma retenção do endotélio corneano primordial em regiões da íris e do ângulo iridocorneano e impedindo a maturação das estruturas responsáveis pelo escoamento do humor aquoso.

SHIELDS (1983) propôs que a membrana anormal observada sobre a íris e o ângulo da câmara anterior representa resquícios do endotélio corneano primordial. Na superfície anterior da íris, a contração desta membrana residual ocasiona corectopia, ectrópio de úvea, atrofia estromal e pseudocoria. No ângulo iridocorneano, a persistência desta membrana durante o terceiro trimestre da gestação pode causar tração na periferia da íris, levando ao surgimento das adesões características. Após o nascimento, partes desta membrana podem desaparecer, mas as adesões da íris com a córnea permanecem e sua contração pode causar um aumento na espessura das adesões.

A linha de Schwalbe apresenta-se anteriorizada e espessada devido a uma atividade metabólica anormal do endotélio corneano primordial desta região (JERNDAL et al, 1978) e seu deslocamento anômalo causa tração subsequente nas lamelas trabeculares (SHIELDS, 1983).

A inserção alta da íris, ao nível do trabeculado posterior, é causada por um retardo no recesso posterior do tecido uveal que se inicia durante o quinto mês de gestação e é a responsável pelo glaucoma (SHIELDS, 1983) [Figura 4]. Além disso, a formação de um canal de Schlemm rudimentar associa-se ao fato de que o processo de maturação progride de forma centrífuga (TAWARA e INOMATA, 1981), apesar desta estrutura derivar do mesoderma e não de células da crista neural (TRIPATHI et al, 1996).

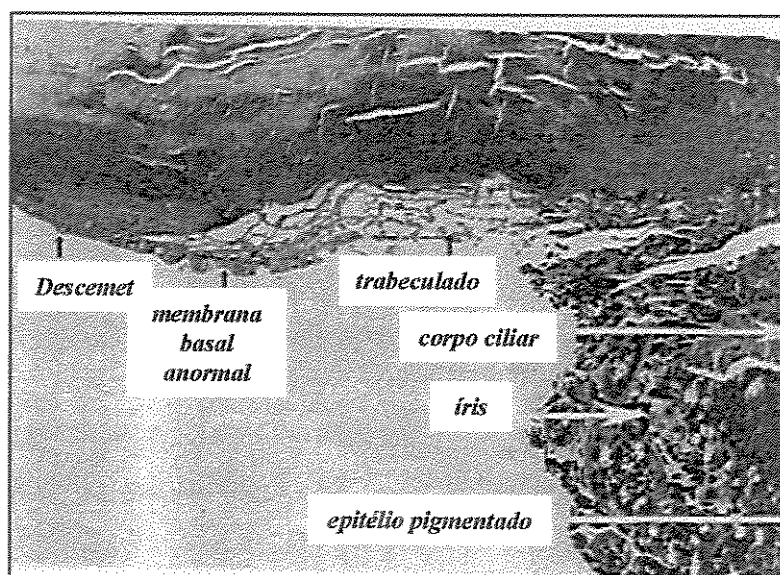


Figura 4 - Corte histopatológico da região do ângulo iridocorneano evidenciando a inserção alta da íris no trabeculado, o qual apresenta lamelas rudimentares (adaptado de SHIELDS, 1983).

Por fim, a teoria do defeito embrionário relacionado às células da crista neural explica as alterações envolvendo a hipófise, os ossos faciais e os dentes (KLEINMAN et al, 1981; JOHNSTON et al, 1973; EDWARDS e TORCZYNSKI, 1981). Achados sistêmicos mais difíceis de serem correlacionados são aqueles envolvendo o surgimento de hipospádias e a redundância da pele peri-umbilical, apesar de que, neste último caso, o anel umbilical primitivo desenvolve-se a partir de células da crista neural presentes na porção lateral da placa ectodérmica (LANGMAN, 1981). Alterações sistêmicas mais raramente associadas à Síndrome de Axenfeld-Rieger demonstram a possibilidade de manifestações clínicas variadas por envolverem estruturas originadas de células da crista neural (SHIELDS, 1983).

1.5 - Genética em Oftalmologia

A estimativa do mapeamento de aproximadamente 30.000 genes pelo Projeto Genoma Humano permite uma perspectiva única na pesquisa em oftalmologia por possibilitar que diversas doenças oculares, dentre elas as disgenesias do segmento anterior do olho e o glaucoma, sejam estudadas do ponto de vista molecular (SAMPLES, 2003).

Os estudos de genética em oftalmologia nos últimos anos, particularmente no glaucoma, levou à identificação de vários genes e *loci*. Estudos avaliando a correlação genótipo/fenótipo permitiram a observação de manifestações clínicas e de respostas terapêuticas distintas de acordo com a alteração genética encontrada (VASCONCELLOS, 2001; VASCONCELLOS et al, 2003, SAMPLES, 2003; MacDONALD et al, 2004). O melhor entendimento de cada uma destas mutações específicas pode ser importante para o diagnóstico precoce e para a instituição do tratamento adequado, fazendo com que, nas próximas décadas, a oftalmologia clínica e a genética estejam fortemente interrelacionadas (VASCONCELLOS, 2001; SAMPLES, 2003).

1.5.1 - Glaucoma associado a anomalias do desenvolvimento

A coexistência de glaucoma e malformações das estruturas anteriores do olho, tais como a córnea, íris, ângulo iridocorneano e cristalino recebem a denominação genérica de glaucomas do desenvolvimento (SHIELDS et al, 1996). Dentre estas anomalias, destacam-se a aniridia, a Anomalia de Peters e a Síndrome de Axenfeld-Rieger com toda a sua diversidade fenotípica.

A aniridia é uma condição bilateral caracterizada basicamente pela ausência parcial ou total da íris que pode ser herdada de forma autossômica dominante ou ocorrer esporadicamente. Quando sua ocorrência é esporádica, associa-se a tumor renal (tumor de Wilms) em cerca de 30% dos casos (MacDONALD et al, 2004). O gene associado à aniridia é o *PAX6*, localizado no cromossomo 11p13 (TON et al, 1991) cujas mutações na sua estrutura estão presentes em todos os casos familiares da doença (GLASER et al, 1994).

A Anomalia de Peters caracteriza-se por opacificação da córnea e adesões de grau variável entre esta estrutura e a íris e o cristalino (STONE et al, 1976). Ocorre de forma geralmente esporádica, mas já foram descritos casos de transmissão autossômica dominante (HOLMSTROM et al, 1991) e recessiva (BOEL et al, 1979). A Anomalia de Peters, quando não está associada a alguma síndrome clínica mais ampla, encontra-se relacionada a mutações nos genes *PAX6* (HOLMSTROM et al, 1991; HANSON et al, 1994) e *PITX2* (DOWARD et al, 1999).

1.6 - Aspectos Genéticos da Síndrome de Axenfeld-Rieger

O avanço no conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na Síndrome de Axenfeld-Rieger não foi acompanhado por novas descobertas no campo da genética desde que RIEGER postulou, em 1935, o padrão de transmissão autossômica dominante. As pesquisas na área da biologia molecular ganharam impulso com os estudos de MURRAY et al (1992), mostrando relação entre a síndrome e alterações no cromossomo 4. Desde então, várias descobertas foram feitas no sentido de caracterizar as manifestações clínicas sob o aspecto molecular, o que permitiu um maior entendimento sobre a interrelação dos fenótipos conhecidos (ALWARD, 2000).

O primeiro gene descoberto diretamente envolvido na Síndrome de Axenfeld-Rieger foi o *PITX2* ("*Paired-like Homeodomain Transcription Factor 2*" - MIM 601542), localizado no cromossomo 4q25 e pertencente à família *homeobox*, ou seja, capaz de regular a expressão de outros genes durante o desenvolvimento embrionário (SEMINA et al, 1996a). O segundo gene identificado associado à Síndrome de Axenfeld-Rieger foi o *FOXC1* ("*Forkhead Box C1*" - MIM 601090) que se localiza no cromossomo 6p25 (NISHIMURA et al, 1998). Além destes genes já identificados, evidências sugerem que o gene *PAX6* ("*Paired Box Gene 6*" - MIM 607108) no cromossomo 11p13 (RIISE et al, 2001) e o gene *MAF* ("*V-MAF Avian Musculoaponeurotic Fibrosarcoma Oncogene Homolog*" - MIM 177075) no cromossomo 16q24 (FERGUSON e HICKS, 1987; JAMIESON et al, 2000) possam estar envolvidos nas malformações da síndrome. Um outro *locus* na região 13q14 (RIEG2 - MIM 601499) mostrou evidências de associação com a Síndrome de Axenfeld-Rieger, mas nenhum gene foi identificado até o momento (PHILLIPS et al, 1996).

Por fim, o gene *GJA1* ("*Gap Junction Protein, Alpha 1*" - MIM 121014), envolvido na Displasia Oculodentodigital (PAZNEKAS et al, 2003) e localizado no cromossomo 6q21-q23.2, determina um fenótipo de malformações oculares e faciais que se assemelham parcialmente àquelas encontradas na Síndrome de Axenfeld-Rieger, sugerindo que este possa ser mais um possível gene candidato na complexa fisiopatologia desta entidade.

1.6.1 - Gene *PITX2*

1.6.1.1 - Identificação do gene *PITX2*

O aprimoramento das técnicas de biologia molecular permitiu a investigação de alterações cromossômicas relacionadas à Síndrome de Axenfeld-Rieger. O trabalho pioneiro de LIGUTIC et al (1981) demonstrou a presença, através de análise citogenética de cromossomos obtidos de células de sangue periférico, de uma deleção intersticial do

braço longo do cromossomo 4 em uma paciente de 9 anos de idade com cariótipo 46 XX del (4)(q23q27) e Síndrome de Axenfeld-Rieger. Esta descrição inicial sugeriu associação da síndrome com deleções cromossômicas localizadas no braço longo do cromossomo 4, no intervalo 4q23q27.

MOTEGI et al (1988), estudando uma paciente recém-nascida com múltiplas malformações sugestivas de monossomia 4q26 sem a Síndrome de Axenfeld-Rieger, realizaram análise citogenética e observaram deleção intersticial no braço longo do cromossomo 4 sem evidências de translocação do segmento deletado para outro cromossomo. O cariótipo identificado foi 46 XX del (4)(q26q27) e assim, o segmento 4q26 foi excluído como região candidata à Síndrome de Axenfeld-Rieger.

VAUX et al (1992) analisaram bandas cromossomais de um recém-nascido com características clínicas da Síndrome de Axenfeld-Rieger e observaram a deleção de um cromossomo 4 que envolvia a banda q26 e a banda q25, com cariótipo resultante de 46 XX del (4)(q25q27). Por ter o segmento 4q26 sido previamente excluído por MOTEGI et al (1998) como região envolvida na síndrome, foi sugerido que o *locus* pudesse se situar no segmento 4q25.

MURRAY et al (1992), através de estudos análise de ligação utilizando marcadores do tipo minissatélites, sugeriram que o gene *EGF* ("Epidermal Growth Factor"), localizado no cromossomo 4, pudesse estar envolvido na síndrome. No ano seguinte, MURRAY et al (1993) refutaram esta hipótese utilizando marcadores microssatélites, cromossomos artificiais de levedura (YACs) e cosmídeos, com os quais analisaram rearranjos cromossomais originados de translocações balanceadas envolvendo os cromossomos 4 (4q26) e 16 (16q22.1) em uma família de duas gerações com a Síndrome de Axenfeld-Rieger, pois não encontraram mutações em nenhum dos 24 exons pesquisados do *EGF*.

Em 1994, LEGIUS et al estudaram três gerações de uma família holandesa com Síndrome de Axenfeld-Rieger cujas alterações estavam restritas aos olhos e aos ossos faciais. A análise de ligação ao gene *EGF* e ao marcador D4S193, ambos localizados no cromossomo 4q25, identificaram uma região de 9 cM com *lod score* menor que -2 e, assim, foi sugerido que não havia ligação entre esta região cromossomal e a síndrome com manifestações extra-oculares envolvendo os ossos faciais.

MAKITA et al (1995) estudaram um paciente com a síndrome envolvendo alterações oculares e umbilicais. No estudo citogenético foi utilizado o método de bandas cromossomais obtidas a partir de linfócitos periféricos e encontrou-se uma translocação recíproca. O cariótipo obtido foi 46 XY t(1;4)(q23.1;q25) e foi reafirmada a hipótese de que o gene causador deveria estar localizado no segmento 4q25q26.

DATSON et al (1996) restringiram a região onde o gene poderia estar localizado. Utilizando linhagens celulares de pacientes afetados e técnicas envolvendo hibridização fluorescente *in situ* (FISH) e YACs fragmentados, mapearam a região candidata entre dois pontos de quebra para translocações, compreendendo uma extensão de 50 kb e situada a 100-150 kb do marcador D4S193 no sentido centromérico.

Simultaneamente e com metodologia alternativa, SEMINA et al (1996b) utilizaram híbridos de células somáticas e seqüências de cosmídeos para mapear a região candidata ao gene. Foram avaliadas sete famílias com Síndrome de Axenfeld-Rieger e, da mesma forma que DATSON et al (1996), encontrou-se uma região de aproximadamente 50 kb de extensão entre dois pontos independentes de quebra para translocação, sugerindo tratar-se de inativação de um único gene. Além de refinar a região candidata, o gene *EGF* foi rastreado em busca de mutações e, como foram encontrados resultados negativos, foi definitivamente excluído como gene candidato a causador da síndrome.

Finalmente, SEMINA et al (1996a) identificaram o primeiro gene comprovadamente envolvido na síndrome através de clonagem posicional baseada em pesquisa de genes candidatos e análises de ligação. Foram estudadas 10 famílias em que pelo menos um dos seus integrantes apresentava manifestações clássicas da síndrome, como as alterações do segmento anterior do olho, hipodontia e falência de involução da pele peri-umbilical. O gene *PITX2*, inicialmente denominado *RIEG*, foi identificado no cromossomo 4q25 e o rastreamento de mutações na sua estrutura demonstrou a presença de seis delas, todas diferentes entre si, neste estudo inicial de SEMINA et al (1996a). A partir de então, inúmeros estudos de rastreamento têm identificado mutações no *PITX2* associadas à Síndrome de Axenfeld-Rieger [Tabela II].

Tabela II - Mutações descritas no gene *PITX2* associadas à Síndrome de Axenfeld-Rieger

Mutação	Referência
T744A (Leu→Gln)	SEMINA et al (1996a)
A785C (Thr→Pro)	
G855C (Arg→Pro)	
G981A (TGA→STOP)	
G→C; +5-íntron 3	
A→G; -11-íntron 3	KULAK et al (1998)
G789A (Arg31His)	
C833T (Arg46Trp)	
T68P (Thr→Pro)	
L54P (Leu→Glu)	
C851T	PERVEEN et al (2000)
A845T	
G→C; -1-íntron 2	
A→T; -2-íntron 3	
C ins 1083	
A del 939	KOZLOWSKI & WALTER (2000)
AA del 868-869	
1235-1236, TA→AAG	
Leu16Gln	
Thr30Pro	
Arg53Pro	BORGES et al (2001)
1-pb del 690	
K88E (Lys→Glu)	
G830C (Val83Leu)	
7aaDupl (713-733)	
C744T (Pro26Leu)	PHILLIPS (2002)
G851C (Arg 52Pro)	
A906C (Asn108Thr)	
C896G (Leu→Val)	
del (T) 1261	
del G114; exon 3	LINES et al (2004)
-1 G→T; exon 3	
del C416; exon 4	

1.6.1.2 - Estrutura do gene *PITX2*

O gene *PITX2* compreende uma sequência de 18 kb e consiste de 4 exons, com extensões de 572 pb, 57 pb, 206 pb e 1290 pb, respectivamente, estando seu códon de iniciação localizado no exon 2 (SEMINA et al, 1996a) [Figura 5].

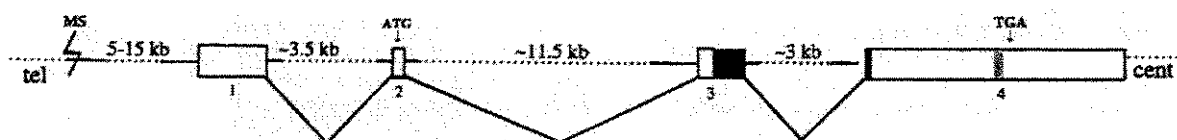


Figura 5 - Organização genômica do *PITX2*. Os retângulos numerados representam os 4 exons, as linhas horizontais os introns com o respectivo tamanho indicado pelos números sobre elas. ATG é o códon de iniciação no exon 2 e TGA é o códon de terminação no exon 4. O retângulo negro representa a região homeobox e o cinza representa a sequência conservada de 14 aminoácidos. As extremidades centroméricas e teloméricas estão representadas por “cent” e “tel”, respectivamente (modificado de SEMINA et al, 1996a).

O *PITX2* é membro de uma família de fatores de transcrição do tipo *homeobox* (SEMINA et al, 1996a). As proteínas *homeobox* caracterizam-se por apresentar uma sequência de 60 aminoácidos que se liga ao DNA, denominada homeodomínio, com capacidade de regular a expressão gênica durante o desenvolvimento embrionário (ESPINOZA et al, 2002).

O gene *PITX2* codifica uma sequência polipeptídica de 33 kDa de peso molecular chamada *solurshin* (SEMINA et al, 1996a; SAADI et al, 2003) e seu homeodomínio consiste de três regiões helicoidais (KISSINGER et al, 1990; GEHRING et al, 1994). As hélices 1 e 2 conferem estabilidade ao homeodomínio, sendo que a hélice 2, ligada a grupamentos fosfato do DNA, ajuda na estabilização da ligação entre a hélice 3 e resíduos específicos de DNA (SCOTT et al, 1989; AMENDT et al, 1998; KULAK et al, 1998).

O homeodomínio do *PITX2* compartilha forte identidade com os homeodomínios pareado e bicoidal (SAADI et al, 2003). A subfamília bicoidal, da qual a *solurshin* faz parte, é definida pela presença de lisina na posição 50 da hélice 3 do homeodomínio (AMENDT et al, 1998), essencial na função de reconhecimento e ligação ao dinucleotídeo 3'-CC da sequência 5'-TAATCC-3' do DNA (HANES e BRENT, 1989; TREISMAN et al, 1989; GEHRING et al, 1994; AMENDT et al, 1998). A posição 50 do homeodomínio, além de fundamental para a ligação do *PITX2* ao DNA, possibilita a ocorrência de dimerização, ou seja, a possibilidade de associação estável entre duas cópias de uma mesma cadeia polipeptídica (SAADI et al, 2003).

Existem três isoformas descritas do gene *PITX2* (isoformas “a”, “b” e “c”), que codificam proteínas de 271, 317 e 324 aminoácidos, respectivamente (ARAKAWA et al, 1998). As três isoformas diferem na sua porção N-terminal, mas mantêm o homeodomínio característico de 60 aminoácidos e uma sequência conservada de 14 aminoácidos na sua porção C-terminal (LINES et al, 2002). Esta sequência conservada de aminoácidos da porção C-terminal é característica dos membros da família *Pitx*, assim como de várias proteínas que apresentam este domínio (SEMINA et al, 1996a). Estas proteínas são expressas em alto grau na diferenciação das estruturas craniofaciais, sugerindo uma importante função regulatória da porção C-terminal no desenvolvimento desta região (AMENDT et al, 1999).

1.6.1.3 - Função do gene *PITX2*

O gene *PITX2* encontra-se expresso na diferenciação do mesênquima periocular (KOZLOWSKI e WALTER, 2000) e no desenvolvimento da hipófise (GAGE e CAMPER, 1997), do cordão umbilical e da lâmina dentária (SEMINA et al, 1996a) e está relacionado ao desenvolvimento da assimetria esquerda-direita durante o início da embriogênese (LOGAN et al, 1998; RYAN et al, 1998).

Tais fatos sugerem que o gene atue em múltiplos tecidos através da interação com outros fatores de transcrição (SEMINA et al, 1996a). Um exemplo é a interação entre o gene *PITX2* e o fator de transcrição *Pit-1*, essencial no controle da diferenciação celular da hipófise e na expressão dos seus hormônios, como o hormônio estimulante da tireóide, o hormônio do crescimento e a prolactina (SIMMONS et al, 1990; AMENDT et al, 1999). A interação entre o *Pit-1* e o *PITX2* ocorre na porção C-terminal deste último e promove tanto o aumento de atividade de ligação ao DNA como o de transcrição (AMENDT et al, 1999). A interferência na interação entre o *Pit-1* e o *PITX2* pode ocorrer na presença de mutação com ganho de função negativa (SAADI et al, 2003), formando um heterodímero não-funcionante entre o alelo normal e o mutante do *PITX2* que impede a sinergia com o *Pit-1* (SAADI et al, 2001). Na impossibilidade de interação com o *Pit-1* ou outro cofator, a porção C-terminal pode interagir com o domínio da porção N-terminal e diminuir a sua ligação ao DNA e a sua atividade de transcrição (AMENDT et al, 1999).

1.6.1.4 - Tipos de mutações no gene *PITX2*

As alterações estruturais do gene *PITX2* podem ser causadas por rearranjos cromossômicos (FLOMEN et al, 1998), deleções (SEMINA et al, 1996a; SCHINZEL et al, 1997; FLOMEN et al, 1998) ou mutações de ponto. A presença de um dos alelos não funcionante é denominada haploinsuficiência (SEMINA et al, 1996a). Nesta situação, havendo apenas 50% da ligação normal ao DNA resultante do alelo residual do *PITX2*, há grande possibilidade de ocorrência de manifestações graves da síndrome (KOZLOWSKI e WALTER, 2000). Na haploinsuficiência há uma perda total da função exercida pelo alelo ausente (mutação do tipo sem sentido), mas no caso do alelo mutante encontrar-se presente (mutações do tipo sentido trocado), a sua atividade residual contribui para a manifestação de fenótipos menos graves (KOZLOWSKI e WALTER, 2000).

As mutações de ponto do tipo sentido trocado podem não significar propriamente perda de função, mas, ao contrário, ganho de função negativa (SAADI et al, 2001; AMENDT et al, 1999). Uma mutação com função negativa dominante pode causar tanto aumento da capacidade de ligação ao DNA (QUENTEN et al, 2002) como da capacidade de transcrição do gene (PRISTON et al, 2001). Em ambas as situações,

um quadro clínico grave da síndrome pode se manifestar, sugerindo que o aumento de atividade do alelo mutante pode ser tão prejudicial quanto a sua completa deleção (SAADI et al, 2003). Estas diferenças na expressão do gene *PITX2* podem ser a base para a variabilidade das manifestações clínicas observadas na síndrome (KOZLOWSKI e WALTER, 2000).

A integridade da estrutura conformacional do homeodomínio do *PITX2* é essencial às funções de ligação ao DNA e de transcrição do gene (PRISTON et al, 2001) e, como as mutações ocorrem predominantemente neste domínio (SEMINA et al, 1996a), estas poderiam levar à uma disfunção das mesmas (AMENDT et al, 1999). Se a mutação localizar-se em regiões hidrofóbicas do homeodomínio pode ocorrer uma desorganização estrutural com conseqüente inibição de ligação ao DNA e, se localizada na hélice 3 do homeodomínio, pode interferir na estabilidade do complexo DNA-proteína, levando tanto à perda parcial da capacidade de transcrição como de ligação ao DNA (KOZLOWSKI e WALTER, 2000).

1.6.2 - Gene *FOXC1*

1.6.2.1 - Identificação do gene *FOXC1*

A região subtelomérica do braço curto do cromossomo 6 tem sido relacionada ao aparecimento de malformações oculares desde 1996, quando foram identificados *loci* associados à anomalia de iridogoniodisgenesia (MEARS et al, 1996). Subseqüentemente foi observado que pacientes portadores de iridogoniodisplasia familiar (JORDAN et al, 1997) e iridogoniodisplasia familiar associada a glaucoma (MORISSETTE et al, 1997) e anomalia de Axenfeld-Rieger também apresentavam mutações nesta região cromossômica, sugerindo que estas doenças, na época consideradas clinicamente distintas, pudessem ser alélicas (JORDAN et al, 1997).

MIRZAYANS et al (1997) relacionaram a anomalia de iridogoniodisgenesia à região 6p25 e GOULD et al (1997), estudando uma família com sete indivíduos portadores de manifestações apenas oculares da Síndrome de Axenfeld-Rieger, estabeleceram, por meio de estudos de ligação, associação com o marcador D6S344, obtendo um *lod score* de 3,31 e reforçando a teoria de que estas entidades seriam doenças alélicas.

NISHIMURA et al (1998), objetivando mapear um gene para glaucoma congênito primário e de desenvolvimento, avaliaram molecularmente um paciente portador de translocação balanceada entre os cromossomos 6p25 e 13q22. Para identificação e clonagem dos pontos de quebra da translocação foram utilizados híbridos de células somáticas. O ponto de quebra de translocação no 6p25 foi identificado numa região de 5 cM, flanqueado pelos marcadores D6S344 e D6S477. Cromossomos artificiais bacterianos (BACs) foram obtidos da região próxima ao marcador D6S344 e a região contendo o ponto de quebra foi clonado. A sequência de nucleotídeos ao redor do ponto de quebra foi analisada e genes homólogos foram pesquisados, chegando-se ao gene *FKHL7* ("Forkhead Human Drosophila-Like 7"), previamente mapeado no locus 6p25 por LARSSON et al (1995). Este gene foi posteriormente denominado *FOXC1* ("Forkhead Box C1"). Pela grande expressão deste gene nos tecidos oculares, foi sugerida sua associação a fenótipos com glaucoma, mas como não era possível determinar seu envolvimento etiológico direto, realizou-se rastreamento de mutações em seis pacientes com glaucoma congênito primário e em 13 pacientes com Síndrome de Axenfeld-Rieger apresentando apenas manifestações oculares. Quatro indivíduos com Síndrome de Axenfeld-Rieger apresentaram mutações no gene *FOXC1* (del 11 pb, Ser131Leu, Ile126Met, Phe112Ser) sugerindo a associação deste com a doença.

Simultaneamente, MEARS et al (1998) estudaram cinco famílias com indivíduos portadores de malformações compatíveis com Síndrome de Axenfeld-Rieger. Em três destas famílias os pacientes não apresentavam alterações extra-oculares. Obteve-se, por meio de análise de ligação, associação da moléstia ao cromossomo 6 (6p25) entre as famílias que não manifestavam alterações sistêmicas da síndrome. Nesta região estava incluído o gene *FOXC1* e, portanto, o mesmo foi considerado candidato. A seguir, realizou-se o rastreamento de mutações no gene *FOXC1* por sequenciamento direto dos produtos de reação em cadeia da polimerase (PCR). Observou-se a presença de uma deleção de 10 pb entre o códon de iniciação e a região de ligação ao DNA e de duas mutações de sentido trocado, Ser82Thr e Ile87Met. As três mutações encontradas estavam presentes em pacientes portadores da Síndrome de Axenfeld-Rieger com manifestações apenas oculares.

Os estudos pioneiros de NISHIMURA et al (1998) e de MEARS et al (1998) descrevendo mutações no gene *FOXC1* em casos de Síndrome de Axenfeld-Rieger mostraram sua ocorrência em pacientes com fenótipos variados entre si, mas com alterações restritas ao segmento anterior do olho, sem demonstrar relação direta entre estas mutações e a existência de alterações extra-oculares.

MYRZAYANS et al (2000) estudaram uma família de três gerações com nove indivíduos portadores da Síndrome de Axenfeld-Rieger incluindo manifestações extra-oculares. A análise de ligação com o marcador D6S344 resultou em um *lod score* máximo de 2,71. O rastreamento de mutações no gene *FOXC1* nesta família revelou a presença de mutação do tipo sem sentido (Gln23Stop) entre os indivíduos afetados. Assim, MYRZAYANS et al (2000) descreveram a primeira associação entre uma mutação no gene *FOXC1* e a presença de manifestações extra-oculares da Síndrome de Axenfeld-Rieger e sugeriram que o mecanismo de haploinsuficiência poderia também estar relacionado à ocorrência de fenótipos envolvendo o desenvolvimento craniofacial, dentário e umbilical.

1.6.2.2 - Estrutura do gene *FOXC1*

O gene *FOXC1* não apresenta introns e contém uma sequência única de 1659 pb que codifica uma proteína de 553 aminoácidos (NISHIMURA et al, 1998; MEARS et al, 1998). Este gene apresenta domínios de ativação da transcrição nas suas porções N e C-terminais, localizados respectivamente, nas posições 1-51 e 466-553 [Figura 6]. Ambas as regiões são necessárias para a ativação do processo de transcrição, podendo atuar em conjunto ou independentemente (BERRY et al, 2002). O domínio de ativação da porção C-terminal pode servir como um ativador geral capaz de iniciar o processo a partir de uma variedade de promotores que ainda não foram completamente identificados, enquanto a porção N-terminal é responsável pela ativação de genes específicos (BERRY et al, 2002). A sequência de aminoácidos destas porções é altamente conservada entre os homólogos do *FOXC1*, sugerindo que estes resíduos têm grande importância funcional (BERRY et al, 2002).

O gene *FOXC1* apresenta um domínio de ligação ao DNA chamado *forkhead* (NISHIMURA et al, 1998) [Figura 6]. Este domínio foi originalmente descrito como uma região homóloga e altamente conservada em relação à proteína *forkhead* da *Drosophila melanogaster* (gene *FKHL7*) e à proteína fator nuclear hepático 3 do rato (gene *FREAC3*) (WEIGEL & JACKLE, 1990) e sua denominação é proveniente do fato de que mutações no gene *FKHL7* da *Drosophila* causam a duplicação das estruturas da sua região cefálica (HONKANEN et al, 2003). A família *forkhead* vem sendo amplamente estudada desde 1994, quando foram clonados os primeiros genes humanos com este domínio (PIERROU et al, 1994).

O domínio *forkhead* apresenta uma sequência conservada de 110 aminoácidos que se liga a resíduos específicos de DNA (PIERROU et al, 1994). O domínio é uma variante do motivo “hélice-volta-hélice”, consistindo de três α -hélices e duas grandes alças que origina uma estrutura com duas “asas”, W1 e W2 (NISHIMURA et al, 1998; PIERROU et al, 1994; SALEEM et al, 2001). A primeira hélice atua em conjunto com a asa 2 promovendo uma ligação estável ao DNA (MURPHY et al, 2004). A segunda hélice é responsável por contatos adicionais ao DNA (LINES et al, 2002) e, na terceira hélice, encontra-se a porção C-terminal, tornando-a a hélice de reconhecimento formadora da sequência de contatos específicos ao segmento GTAAA[T/c]AAA do DNA (PIERROU et al, 1994). As asas 1 e 2 estão, provavelmente, envolvidas na sequência de reconhecimento do DNA e, além disso, a asa 2 exerce também função auxiliar na ativação da transcrição do *FOXC1* (MURPHY et al, 2004).

Finalmente, o gene *FOXC1* possui um domínio inibitório de transcrição localizado entre os aminoácidos 215-366 [Figura 6]. Este domínio, juntamente com os domínios de ativação, serve para modular a atividade transcricional, mantendo o *FOXC1* sob complexo mecanismo regulatório (BERRY et al, 2002). Por ser uma fosfoproteína, a atividade do domínio inibidor pode ser regulada através de fosforilação, o que causa uma mudança na sua conformação estrutural e limita a disponibilidade de domínios de ativação para os contatos proteína-proteína necessários à completa ativação transcricional (BERRY et al, 2002). Possivelmente as proteínas quinases que podem fosforilar o *FOXC1* incluem as caseínas-quinases I e II, glicogênio-sintetase-quinase 3, proteína-quinase A e proteína-quinase C (BERRY et al, 2002).



Figura 6 - Organização genômica do gene *FOXC1*. Os retângulos acinzentados representam as seqüências não-codificadoras, ATG é o códon de iniciação, TGA é o código de terminação, o retângulo negro representa o domínio de ligação *forkhead*, os retângulos amarelos representam os domínios de ativação da transcrição e o retângulo azul o domínio de inibição (modificado de LINES et al, 2002).

1.6.2.3 - Função do gene *FOXC1*

O gene *FOXC1* é membro de uma família de fatores de transcrição envolvidos no desenvolvimento embrionário de órgãos como o coração, o fígado, os rins, o músculo e a próstata (PIERROU et al, 1994; LARSSON et al, 1995; KAUFMAN e KNOCHEL, 1996), além das estruturas craniofaciais (MEARS et al, 1998). Durante a organogênese ocular do feto expressa-se nas estruturas craniofaciais, especialmente nos mesênquimas periocular e pré-endotelial, na esclera e na córnea (MEARS et al, 1998). Após o período fetal, expressa-se no epitélio da conjuntiva, da malha trabecular e da íris (MEARS et al, 1998).

1.6.2.4 - Tipos de mutações no gene *FOXC1*

Diferentes alterações estruturais têm sido observadas no *FOXC1*, incluindo deleções, duplicações, mutações do tipo sentido trocado e do tipo sem sentido, todas afetando de forma variável a estabilidade da ligação ao DNA, a ativação de genes-alvo e a própria regulação transcricional (LINES et al, 2002; BERRY et al, 2002; LEHMANN et al, 2002; KOMATIREDDY et al, 2003; MURPHY et al, 2004).

As deleções de pares de bases resultam na ausência ou na terminação prematura da transcrição do domínio *forkhead* (NISHIMURA et al, 1998). As duplicações cromossômicas envolvendo a região 6p25 são igualmente prejudiciais ao adequado funcionamento do *FOXC1* (NISHIMURA et al, 2001), já que o aumento da atividade transcricional dificulta o controle regulatório pelos domínios de inibição (BERRY et al, 2002; KOMATIREDDY et al, 2003). O aumento da atividade do gene *FOXC1* em casos de duplicação pode ser causado pela interação do segmento duplicado com genes desconhecidos (LEHMANN et al, 2000; NISHIMURA et al, 2001; LINES et al, 2002).

As mutações do tipo sentido trocado localizam-se no domínio *forkhead*, em posições altamente conservadas (SUZUKI et al, 2001). De acordo com a sua localização dentro do domínio, estas mutações podem resultar em fenótipos mais ou menos graves. As mutações localizadas na hélice 1 levam a uma maior redução da síntese protéica codificada pelo *FOXC1* (SALEEM et al, 2003) e, portanto, produzem fenótipos geralmente mais graves do que as mutações ocorridas nas hélices 2 e 3 (NISHIMURA et al, 1998; MEARS et al, 1998). Em 2002, PANICKER et al descreveram a primeira mutação do tipo sentido trocado localizada numa região altamente conservada da segunda asa do domínio *forkhead* que resultou num fenótipo de alterações exclusivamente oculares, mas com características graves que ocasionaram cegueira. As mutações do tipo sentido trocado parecem diminuir a capacidade de ligação ao DNA com conseqüente diminuição da ativação transcricional (SALEEM et al, 2001; NISHIMURA et al, 2001), mesmo na presença de atividade residual do gene (SALEEM et al, 2003). Alelos com mutação do tipo sentido trocado podem apresentar até 56% de atividade residual, mas ainda assim são capazes de produzir malformações em pacientes heterozigotos (SALEEM et al, 2001) e, segundo MIRZAYANS et al (2000), talvez a presença de atividade residual do *FOXC1* resulte em fenótipos menos agressivos, apesar de não ser possível ainda estabelecer uma correlação genótipo/fenótipo bem definida (MURPHY et al, 2004).

As mutações do tipo sem sentido podem se localizar entre o códon de iniciação e o domínio *forkhead* e causam haploinsuficiência (SUZUKI et al, 2001; LINES et al, 2002; WUDUNN, 2002), mecanismo que pode ser responsável pelos fenótipos mais graves

da síndrome (MIRZAYANS et al, 2000). Em casos de haploinsuficiência, a penetrância da síndrome é variável e depende de predisposição genética individual (SMITH et al, 2000) podendo manifestar-se de forma restrita ao olho ou com malformações presentes sistemicamente (KOMATIREDDY et al, 2003; SMITH et al, 2000) [Tabela III].

Tabela III - Mutações descritas no *FOXC1* e sua diversidade fenotípica

Mutação	Fenótipo	Referência
Ser131Leu	Alterações oculares	NISHIMURA et al (1998)
Ile126Met		
Phe112Ser*		
Del 11-pb (153-162)		
Trans 2:6		
Trans 6:13	Alterações oculares	MEARS et al (1998)
Ser82Thr		
Ile87Met		
Del 10-pb (93-102)		
Del 1-pb 210		
Gln23STOP	Alterações oculares e sistêmicas	SWIDERSKI et al (1999)
Pro79Leu	Alterações oculares e sistêmicas	MYRZAYANS et al (2000)
Del 10-pb (99-108)	Alterações oculares	NISHIMURA et al (2001)
Del 8-pb (116-123)		
Del 1-pb (1512)		
Ins 22-pb (ins 22-47)		
Ins 1-pb (262-265)		
Dupl 6p25		
Leu86Phe	Alterações oculares e sistêmicas	SALEEM et al (2001)
Pro79Thr	Alterações oculares e sistêmicas	SUZUKI et al (2001)
Deleções e duplicações intersticiais (6p25)	Alterações oculares e sistêmicas	LEHMANN et al (2002)
Met161Lys	Alterações oculares	PANICKER et al (2002)
Gln2STOP		
Gln123STOP		
Phe112Ser*		
Gln165Arg		
Arg169Pro	Alterações oculares e sistêmicas	MURPHY et al (2004)
Ile91Thr		
	Alterações oculares	MORTEMOUSQUE et al (2004)

* Mesma mutação com fenótipos diferentes

1.6.3 - Gene *GJA1*

1.6.3.1 - Identificação do gene *GJA1*

GLADWIN et al (1997) estudaram molecularmente 54 indivíduos distribuídos em seis famílias em que pelo menos um dos membros era portador de Displasia Oculodentodigital (DODD) com o objetivo de mapear um *locus* para a síndrome. Como não havia genes candidatos, foi realizada uma ampla pesquisa do *locus* utilizando marcadores do tipo microssatélites para os cromossomos 3, 6, 14, 15 e 17. Ao final, a análise de ligação mapeou o *locus* da síndrome no cromossomo 6, bandas 6q22q24, num intervalo de 28 cM entre os marcadores D6S474 na extremidade centromérica e D6S292 na telomérica.

BOYADJIEV et al (1999) estudaram 69 indivíduos caucasianos distribuídos em sete famílias, dos quais 34 apresentavam DODD. Na análise de ligação foram utilizados 19 marcadores microssatélites para o cromossomo 6q e a região candidata ao *locus* foi limitada a uma extensão de 1,01 cM (no sexo masculino) e 2,87 cM (no sexo feminino), compreendida entre os marcadores D6S266/D6S261 na extremidade centromérica e D6S1639 na telomérica.

PAZNEKAS et al (2003) avaliaram 60 indivíduos distribuídos em 17 famílias afetadas pela DODD e identificaram o gene *GJA1*, no cromossomo 6q22q23, como o responsável pela síndrome. O rastreamento de mutações demonstrou que elas estavam presentes em todos os indivíduos clinicamente afetados. As 17 mutações encontradas estavam distribuídas pelos domínios citoplasmático, transmembrana e extra-celular. Recentemente, VASCONCELLOS et al (2004) identificaram nova mutação no *GJA1* numa família brasileira de três gerações com oito indivíduos acometidos por DODD e confirmaram os achados de PAZNEKAS et al (2003).

1.6.3.2 - Estrutura do gene *GJA1*

As junções do tipo fenda (*gap junctions*) funcionam como conexões diretas entre os citoplasmas de células adjacentes, permitindo um fluxo intercelular direto e de baixa resistência para a passagem de íons, pequenas moléculas e alguns sinalizadores moleculares intra-celulares, como o AMPc e o Ca^{2+} , regulando assim o crescimento e desenvolvimento celular (COOPER, 2001; WHITE, 2002).

A unidade formadora das junções do tipo fenda é o conexon, estrutura hexagonal formada por seis subunidades protéicas denominadas conexinas. Conexons de células adjacentes podem se alinhar, formando, desse modo, um canal direto de comunicação intercelular (COOPER, 2001).

A expressão tecidual das conexinas pode ser variada e múltiplos tipos de conexinas podem se associar para formar junções do tipo fenda (PAZNEKAS et al, 2003). A diversidade de conexinas formadoras de conexons resulta em características específicas de permeabilidade intercelular, com efeitos diferentes no crescimento e desenvolvimento tecidual (ELFGANG et al, 1995; WHITE, 2002). Quando a junção do tipo fenda é formada por dois conexons que possuem conexinas iguais, o canal é chamado de homotípico. Caso cada hemicanal possua conexinas diferentes entre si, o canal é denominado heterotípico. Da mesma forma, se um conexon apresenta apenas um tipo de conexina, ele é chamado de conexon homomérico, mas se as conexinas forem diferentes entre si, ele é denominado de conexon heteromérico.

O gene *GJAI* codifica a proteína conexina 43, sendo este gene composto por dois exons separados por um íntron de 11 kb. O primeiro exon apresenta um RNAm não-codificante com 191 pb e o segundo exon consiste em uma sequência codificante de 1149 pb além de uma sequência 5' não-traduzível de 16 pb e uma sequência 3' não-traduzível de aproximadamente 1732 pb (PAZNEKAS et al, 2003).

A conexina 43, assim como os demais membros da família das conexinas, é composta molecularmente por quatro domínios transmembrana, dois domínios extra-celulares e três domínios intra-citoplasmáticos, sendo estes últimos constituídos por uma alça intra-citoplasmática, uma porção N-terminal e uma porção C-terminal (WILLECKE et al, 2002; KELSELL et al, 2001; WHITE, 2002). Os quatro domínios transmembrana são denominados 1M, 2M, 3M e 4M e relacionam-se à permeabilidade iônica do conexon (KRUTOVSKIKH e YAMASAKI, 2000). Os dois domínios extra-celulares são chamados de E1 e E2, constituindo-se de alças de aminoácidos responsáveis pelo adequado acoplamento entre conexons para a formação da junção do tipo fenda, além de permitirem uma compatibilidade seletiva entre conexons diferentes na formação de canais heterotípicos. Dos três domínios intra-citoplasmáticos, a porção

N-terminal é formada por cerca de 20 aminoácidos e relaciona-se com a voltagem de abertura dos canais (RUBIN et al, 1992; VERSELIS et al, 1994), enquanto a porção C-terminal é a mais variável entre as conexinas, exercendo, no caso da conexina 43, função na fosforilação de quinases e na adesão intercelular através de complexos formados com junções compactas (TOYOFUKU et al, 1998; GIEPMANS e MOOLENNAR, 1998). O terceiro domínio intra-celular é a alça citoplasmática (IL), de composição e tamanho muito diverso entre as diferentes conexinas. Na conexina 43, a alça citoplasmática possui uma sequência de 6 a 7 aminoácidos próximos a 3M que se relacionam à permeabilidade do canal (BECKER et al, 1995) [Figura 7].

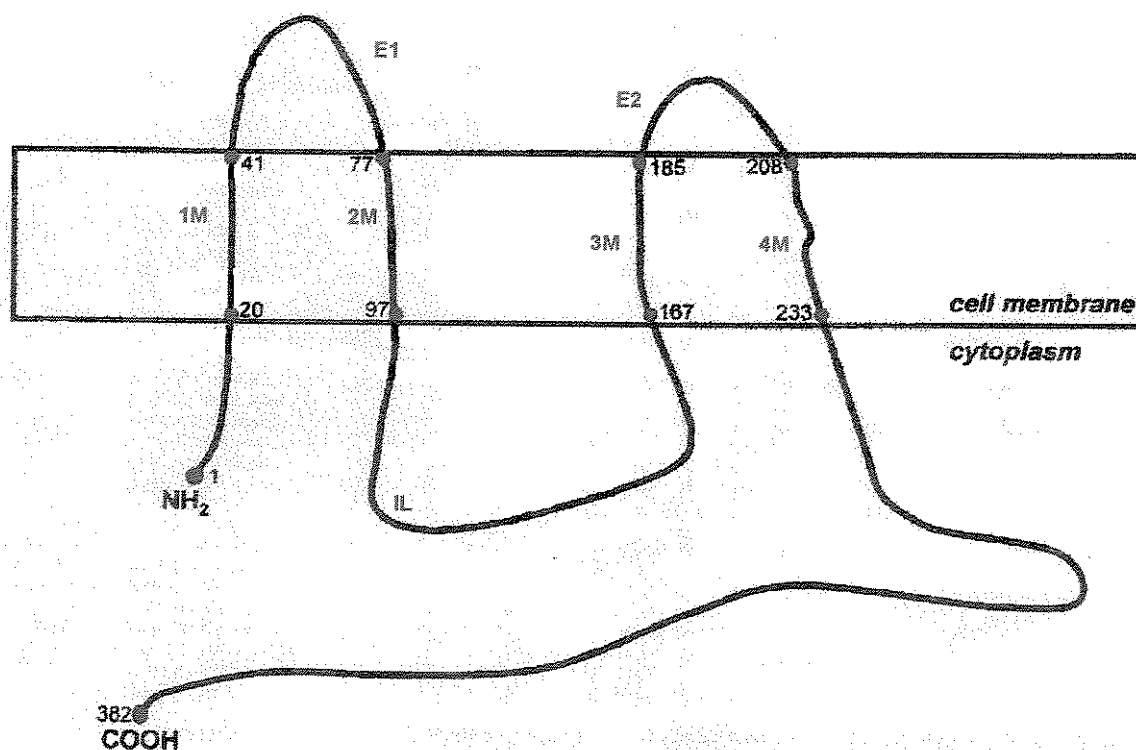


Figura 7 - Desenho esquemático da proteína conexina 43. Os círculos avermelhados representam o primeiro e o último aminoácidos de cada domínio. E1 e E2 representam os domínios extra-celulares; M1, M2, M3 e M4 representam os domínios transmembrana; NH₂ representa a porção N-terminal; IL a alça intra-citoplasmática; e COOH a porção C-terminal. *Cell membrane* = membrana celular; *cytoplasm* = citoplasma. (modificado de PAZNEKAS et al, 2003).

1.6.3.3 - Função do gene *GJA1*

As estruturas oculares representam uma rica fonte de interação entre conexinas diferentes, que se expressam principalmente no cristalino, na retina neural e no corpo ciliar (VANEY e WEILER, 2000). No corpo ciliar, as camadas pigmentada externa e não-pigmentada interna se mantêm justapostas através de junções do tipo fenda presentes ao longo de suas membranas celulares apicais. A permeabilidade iônica entre estas duas camadas ocorre através de canais heterotípicos mediados por cálcio que regulam a secreção ativa de humor aquoso. O padrão de distribuição das conexinas nos epitélios é seletivo, sendo a conexina 43 expressa no epitélio pigmentado e localizada preferencialmente próximo à superfície apical destas células (VANEY e WEILER, 2000). Uma alteração na função desta conexina pode resultar num desequilíbrio entre a produção do humor aquoso pelo corpo ciliar e o seu escoamento pelo trabeculado, com conseqüente glaucoma (PAZNEKAS et al, 2003).

Além do epitélio pigmentado do corpo ciliar, a conexina 43 expressa-se também no epitélio anterior e lateral do cristalino durante o início do período embrionário, exercendo importante função no desenvolvimento das estruturas oculares anteriores, conforme observado em modelos animais de vertebrados inferiores (WHITE, 2002). O cristalino é responsável pela emissão de sinais que ativam a expressão da N-caderina, uma molécula de adesão intercelular envolvida na diferenciação do mesênquima periocular em endotélio e estroma corneanos, ambos derivados de células da crista neural (BEEBE e COATS, 2000).

Além de estar envolvida na diferenciação das estruturas oculares, a conexina 43 é a principal proteína presente nas junções do tipo fenda que interligam os osteoblastos humanos, mediando, desta forma, a comunicação intercelular no tecido ósseo (CIVITELLI et al, 1993). A comunicação entre os osteoblastos permite que estas células trabalhem em sincronia durante os processos de produção e deposição de matriz orgânica óssea e sua subsequente calcificação (CIVITELLI et al, 1993). Além de formação e mineralização, o processo de remodelamento ósseo envolve a ação integrada de osteócitos e osteoclastos, que atuam de forma coordenada através de junções do tipo fenda. Assim, a ausência de expressão da conexina 43 durante a fase embrionária pode resultar na migração

de células da crista neural hipoplásicas, causando defeitos na ossificação do crânio e da face (CIVITELLI et al, 1993; LECANDA et al, 2000).

1.6.4 - Outros genes e *loci*

Os estudos de prevalência de mutações nos genes *PITX2* e *FOXC1* em pacientes portadores da Síndrome de Axenfeld-Rieger sugerem a existência de outros *loci* e de outros genes envolvidos nesta entidade que ainda não foram identificados. Esta heterogeneidade genética é evidente desde a década de 70 do século passado, quando estudos mostraram a associação de fenótipos de Axenfeld-Rieger com alterações cromossômicas, tais como a deleção do cromossomo 10 (HERVÉ et al, 1984).

AKAZAWA et al, em 1981, e STATHACOPOULOS et al, em 1987, descreveram deleções no braço longo do cromossomo 13 associados a fenótipos de Axenfeld-Rieger. No estudo de AKAZAWA et al (1981), o paciente estudado apresentava um fenótipo de Axenfeld-Rieger associado à presença de micrognatia, de retardo mental e de retinoblastoma bilateral e sua análise genética mostrava deleção completa da banda 13q14. No estudo de STATHACOPOULOS et al (1987) o paciente apresentava alterações oculares e sistêmicas compatíveis com a Síndrome de Axenfeld-Rieger, além de displasia do nervo óptico e de micrognatia, e o cromossomo 13 apresentava uma deleção intersticial entre as bandas q12-q22.

Em 1996, PHILLIPS et al identificaram um segundo *locus* para a Síndrome de Axenfeld-Rieger (RIEG2) no cromossomo 13q14 estudando uma família de 27 membros distribuídos em quatro gerações. Nesta família, 11 indivíduos apresentavam características oculares e sistêmicas da síndrome sem ligação ao *locus* 4q25. Algumas manifestações clínicas como hidrocefalia, alterações renais e surdez neurosensorial estavam presentes nestes indivíduos afetados e, apesar de não serem considerados características da síndrome, foram atribuídas à sua variabilidade fenotípica. Contudo, é possível que o *locus* 13q14 esteja associado a uma entidade clínica distinta que compreenda, além das alterações próprias de Axenfeld-Rieger, a presença de surdez neurosensorial (CUNNINGHAM Jr et al, 1998).

Estudos de análise de ligação sugerem a presença de um *locus* adicional no cromossomo 16q24 (FERGUSON e HICKS, 1987; WERNER et al, 1997), tendo sido o gene *FOXC2* (“*Forkhead Box C2*” – MIM 602402) considerado candidato devido à sua homologia com o *FOXC1*. FANG et al (2000), contudo, observaram que o gene *FOXC2* estava mais associado a síndromes com linfedema do que ao fenótipo de Axenfeld-Rieger. Em 2002, o gene *MAF*, localizado no *locus* 16q24, foi estudado como possível candidato a causador de alterações da Síndrome de Axenfeld-Rieger ligada a este *locus* (JAMIESON et al, 2002). O *MAF* é um fator de transcrição que se expressa em estruturas oculares derivadas do ectoderma superficial e cujas translocações e mutações no seu domínio de ligação associam-se ao desenvolvimento de catarata, opacidade de córnea, microcórnea, coloboma de íris e disgenesia do segmento anterior (JAMIESON et al, 2002). Por se expressar no cristalino, alterações na sua função poderiam levar a defeitos na indução do endotélio corneano e na formação da câmara anterior (RENEKER et al, 2000; BEEBE e COATS, 2000), com manifestações clínicas oculares semelhantes àsquelas encontradas na Síndrome de Axenfeld-Rieger. Além da interferência na diferenciação do segmento anterior induzido pelo cristalino, sua interação com o gene *PAX6* poderia supostamente relacioná-lo ao aparecimento de alterações típicas de Axenfeld-Rieger (SHARON-FRILING et al, 1998; PLANQUE et al, 2001; SAKAI et al, 2001). Contudo, as alterações no gene *MAF* observadas por JAMIESON et al (2002) ocorreram em pacientes portadores principalmente de catarata congênita, sendo que nenhum deles apresentava alterações sugestivas de Axenfeld-Rieger.

O gene *PAX6*, localizado no cromossomo 11p13, encontra-se relacionado a alterações oculares como aniridia (GLASER et al, 1992; HANSON et al, 1993; GRØNSKOV et al, 1999) e anomalia de Peters (HANSON et al, 1994), mas RIISE et al (2001) descreveram a ocorrência de uma deleção de um dos homólogos do braço curto do cromossomo 11 em um caso isolado de Síndrome de Axenfeld-Rieger com manifestações oculares e sistêmicas. Tais achados reforçam a teoria de que a manifestação fenotípica da Síndrome de Axenfeld-Rieger deve-se a uma complexa interação entre genes e a uma ampla heterogeneidade genotípica.

No Brasil, um estudo de BORGES et al (2002) avaliou os genes *PITX2* e *FOXC1* em cinco famílias com síndrome de Axenfeld-Rieger e alterações sistêmicas. Os autores identificaram mutações apenas no gene *PITX2* em três famílias e em duas delas não foram observadas alterações estruturais em nenhum dos dois genes, corroborando a heterogeneidade genética própria da doença.

Desse modo, o contínuo rastreamento de mutações nos genes *PITX2* e *FOXC1* e a investigação de outros genes possivelmente associados às diversas manifestações fenotípicas da Síndrome de Axenfeld-Rieger podem ajudar a melhor caracterizá-la do ponto de vista molecular e aumentar o conhecimento geral sobre seu comportamento clínico.

1.7 - Objetivos

Os objetivos deste estudo foram:

- Determinar a frequência de mutações nos genes *PITX2*, *FOXC1* e *GJA1* em famílias brasileiras com indivíduos portadores da Síndrome de Axenfeld-Rieger associada a glaucoma;
- Determinar o tipo de mutações nos genes *PITX2*, *FOXC1* e *GJA1* nas famílias estudadas;
- Correlacionar as alterações genéticas encontradas ao fenótipo dos pacientes portadores da síndrome;
- Avaliar o padrão de transmissão e de segregação nas famílias dos pacientes estudados de acordo com a presença de mutações.

2 - PACIENTES E MÉTODOS

2.1 - Pacientes

Foram avaliados, de forma consecutiva, pacientes portadores da Síndrome de Axenfeld-Rieger associada a glaucoma, assim como seus familiares. Todos os indivíduos foram atendidos no Setor de Glaucoma da Disciplina de Oftalmologia do Hospital das Clínicas da Unicamp, sendo clinicamente avaliados no período de março de 2001 a dezembro de 2002.

Os pacientes portadores da síndrome associada a glaucoma, a partir dos quais a família foi clínica e geneticamente estudada, receberam a denominação de “casos-índice”.

2.1.1 - Critérios de inclusão

O grupo de estudo foi formado por pacientes portadores da Síndrome de Axenfeld-Rieger associada a glaucoma e por seus familiares.

Para os casos-índice, foram adotados os seguintes critérios de inclusão:

- a) Presença de qualquer um dos seguintes sinais oftalmológicos pertencentes à síndrome: embriotóxon posterior, adesões iridocorneanas periféricas, hipoplasia do estroma iriano e alterações pupilares tais como polícoria ou corectopia;
- b) Presença de glaucoma, caracterizado pela medida da pressão ocular maior que 21 mmHg em pelo menos três ocasiões diferentes e consecutivas e pela presença de ângulo da câmara anterior aberto, com observação da malha trabecular à gonioscopia¹.

Para serem incluídos no estudo, os casos-índice não precisavam, necessariamente, apresentar as alterações sistêmicas mais frequentes da síndrome, tais como: hipoplasia dos ossos maxilares, alterações dentárias (microdontia, hipodontia ou oligodontia) e redundância da pele peri-umbilical.

A inclusão dos familiares dos casos-índice não exigiu a presença de alterações oftalmológicas ou sistêmicas da síndrome.

¹ Define-se glaucoma por uma neuropatia óptica progressiva com conseqüente perda de campo visual (SHIELDS et al, 1996) e cuja pressão intra-ocular é o seu principal fator de risco (QUIGLEY, 1993).

2.1.2 - Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo:

- a) Indivíduos com outras formas de glaucoma associado ao desenvolvimento, tais como aniridia e Anomalia de Peters;
- b) Indivíduos com glaucoma congênito primário.

2.1.3 - Grupo controle

Foi utilizado um grupo controle de 50 indivíduos semelhantes em raça e idade ao grupo de estudo, a fim de se detectar a frequência das mutações pesquisadas na população geral. O grupo controle foi proveniente de amostras sanguíneas obtidas no Hemocentro da Unicamp que fazem parte de um banco de DNA correspondente à população geral.

2.2 - Métodos

2.2.1 - Dados epidemiológicos

A presente pesquisa foi um estudo transversal descritivo, baseado no rastreamento de mutações genéticas na Síndrome de Axenfeld-Rieger. O estudo foi, contudo, dividido em duas etapas, sendo a primeira delas baseada numa avaliação clínico-epidemiológica e a segunda, nos experimentos laboratoriais propriamente ditos.

Os casos-índice e seus familiares tiveram dados coletados referentes à idade, à raça, ao sexo, ao tempo de diagnóstico de glaucoma e/ou de malformações oftalmológicas e sistêmicas, à história familiar e a antecedentes de tratamento clínico e cirúrgico. Estas informações foram obtidas por meio de entrevistas durante a consulta inicial e foi criado um banco de dados próprio para este grupo de estudo [Apêndice 1].

Foi avaliada a necessidade de tratamento clínico ou cirúrgico no momento da consulta inicial e, de acordo com a conduta instituída, o paciente foi encaminhado para acompanhamento no Setor de Glaucoma do Hospital das Clínicas da Unicamp.

2.2.2 - Exame oftalmológico

A avaliação oftalmológica dos casos-índice e dos seus familiares ocorreu no momento da consulta inicial no Setor de Glaucoma do Hospital das Clínicas da Unicamp. Todos os pacientes e familiares foram examinados pelo oftalmologista WPC. O exame consistiu de:

- a) Acuidade visual corrigida medida pela tabela de Snellen à distância de 6 metros com iluminação constante;
- b) Biomicroscopia com lâmpada de fenda para avaliação do segmento anterior ocular;
- c) Gonioscopia com lâmpada de fenda realizada através de lente gonioscópica de contato do tipo Goldmann;
- d) Medida da pressão intra-ocular em ambos os olhos com tônometro de aplanção de Goldmann;
- e) Avaliação do disco óptico sob midríase, em lâmpada de fenda, com lente esférica de 66 dioptrias.
- f) Avaliação do campo visual realizado por perímetro computadorizado de Humphrey, estratégia *full threshold* 24-2. O exame foi feito quando a acuidade visual era suficiente e quando o paciente apresentava conhecimento cognitivo que permitisse a sua realização.

2.2.3 - Exame sistêmico

A avaliação clínica do grupo de estudo em busca de malformações sistêmicas ocorreu na consulta inicial no ambulatório de Glaucoma do Hospital das Clínicas da Unicamp. O exame físico foi baseado na inspeção (ectoscopia) dos pacientes e constou de:

- a) Avaliação das estruturas craniofaciais para detectar alterações dos ossos da face e malformações dentárias;
- b) Avaliação da cicatriz umbilical para detectar redundância de pele peri-umbilical;
- c) Avaliação de alterações anatômicas específicas caso fossem relatadas durante a entrevista inicial.

2.2.4 - Biologia molecular

As etapas experimentais que envolveram estudos de biologia molecular foram realizadas no Laboratório de Genética em Oftalmologia, localizado nas dependências do ambulatório de oftalmologia do Hospital das Clínicas, e no Laboratório de Hemoglobinopatias e Genoma, localizado nas dependências do Hemocentro da Unicamp.

2.2.4.1 - Extração do DNA

O DNA foi coletado a partir de 5 ml de sangue periférico obtido por punção da veia antecubital. O sangue foi acondicionado em frasco estéril contendo EDTA 10% como anticoagulante.

A extração do DNA foi realizada utilizando-se o “*GFX Blood DNA Purification Kit*” (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA). Duzentos microlitros da amostra de sangue foram misturados à solução de lise numa proporção de 1:3, procedendo-se à incubação à temperatura ambiente por 5 minutos e subsequente centrifugação a 13000 rpm

por 20 segundos. Após a remoção do sobrenadante, foram adicionados 500µl da solução de extração, tendo sido a mistura incubada à temperatura ambiente por 5 minutos e então centrifugada a 8000 rpm por 1 minuto. A seguir, o sobrenadante foi desprezado e foram novamente adicionados 500µl da solução de extração à amostra remanescente, prosseguindo-se com uma centrifugação a 8000 rpm por 1 minuto. Após novo descarte do sobrenadante, foram adicionados 500µl de solução de lavagem à amostra, a qual foi centrifugada a 13000 rpm por 3 minutos. O DNA extraído foi solubilizado em 150µl de água destilada estéril.

2.2.4.2 - Reação em cadeia de polimerase (PCR)

Para a amplificação dos genes *PITX2*, *FOXC1* e *GJAI*, os seguintes reagentes foram utilizados: 20 pmoles de cada iniciador, tampão da enzima 1X (tampão 10X = Tris-HCl 20 mM [pH 8,4], KCl 50 mM, gelatina 0,01%), MgCl₂ 1,5mM, 200µM da mistura de nucleotídeos (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), 1 unidade de Taq DNA polimerase (Invitrogen – Carlsbad, EUA) e 0,5µg de DNA genômico, completando-se o volume para 50 µl com H₂O deionizada estéril. Para todas as regiões do gene *PITX2* foi utilizada formamida a uma concentração final de 5% (v/v) e para todas as regiões do *FOXC1* e do *GJAI* foi utilizado dimetilsulfóxido (DMSO) a uma concentração final de 10%.

As seqüências dos pares de iniciadores sintetizados para os genes *PITX2*, *FOXC1* e *GJAI*, assim como o tamanho dos fragmentos amplificados encontram-se nas Tabelas IV, V e VI. As condições da PCR para cada gene encontram-se descritas a seguir:

a) Gene *PITX2*

Os exons 2 e 3 do gene *PITX2*, assim como os limites íntron/exon, foram amplificados em apenas uma reação e o exon 4 subdividido em duas regiões. Todas as reações foram submetidas a uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, procedendo-se a uma extensão final a 72°C por 7 minutos.

b) Gene *FOXC1*

O único exon do gene *FOXC1* foi subdividido em quatro fragmentos. Todas as reações foram submetidas a uma desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida por 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos, procedendo-se a uma extensão final a 72°C por 7 minutos.

c) Gene *GJAI*

O único exon codificador do gene *GJAI* foi subdividido em dois fragmentos. Todas as reações foram submetidas a uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, procedendo-se a uma extensão final a 72°C por 7 minutos.

As reações dos três genes foram realizadas em aparelho ciclador de temperatura modelo 9600 (Applied BioSystems, Foster City, CA, EUA). Três microlitros dos produtos das reações foram separados por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo e comparados ao marcador de peso e massa molecular “*Low DNA Mass Ladder*” (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), sob iluminação ultravioleta. A captação de imagens foi realizada pelo *software* Kodak Digital Science 1D 2.0 (Eastman Kodak Company, New York, NY, EUA). A temperatura e o tempo de anelamento para as diferentes regiões encontram-se nas Tabelas IV, V e VI.

Os produtos da PCR foram purificados por meio da adição de 10U de exonuclease I (Fermentas Inc., Hanover, MD, EUA) e 2U de fosfatase alcalina de camarão (Fermentas Inc., Hanover, MD, EUA). A reação foi mantida a 37°C por 15 minutos e em seguida a 80°C por 15 minutos para a inativação das enzimas.

Tabela IV - Sequências dos iniciadores, tamanhos dos fragmentos amplificados e temperaturas de anelamento utilizados para o rastreamento de mutações nos exons do gene *PITX2*.

Exon / Região	Sequência	Tamanho do fragmento	Temperatura e tempo de anelamento
2	S - 5'-GGGGCAGTAGCCAAGGACT-3'	289 pb	60°C por 1 min
	AS - 5'-CAGCTAAGCGGGAATGTCTG-3'		
3	S - 5'-GGCATGCTGACGGGAAAAG-3'	300 pb	60°C por 1 min
	AS - 5'-CTGTACCTCCACAACATCCTC-3'		
4 / 1	S - 5'-CACTGTGGCATCTGTTTGCT-3'	324 pb	60°C por 1 min
	AS - 5'-GGACGACATGCTCATGGAC-3'		
4 / 2	S - 5'-TATGAACGTCAACCCCCTGT-3'	400 pb	60°C por 1 min
	AS - 5'-CCATCCGGCAAGGTCCTA-3'		

S = sense; AS = anti-sense; pb = pares de bases; min = minuto

Tabela V - Sequências dos iniciadores, tamanhos dos fragmentos amplificados e temperaturas de anelamento utilizados para o rastreamento de mutações no exon único do gene *FOXC1*.

Exon / Região	Sequência	Tamanho do fragmento	Temperatura e tempo de anelamento
1 / 1	S - 5'-CCCGGACTCGGACTCGGC-3'	429 pb	58°C por 30 seg
	AS - 5'-AAGCGGTCCATGATGAACTGG-3'		
1 / 2	S - 5'-CCCAAGGACATGGTGAAGC-3'	710 pb	58°C por 30 seg
	AS - 5'-CTGAAGCCCTGGCTATGGT-3'		
1 / 3	S - 5'-ATCAAGACCGAGAACGGTACG-3'	635 pb	58°C por 30 seg
	AS - 5'-GTGACCGGAGGCAGAGAGTA-3'		
1 / 4	S - 5'-TACCACTGCAACCTGCAAGC-3'	517 pb	58°C por 30 seg
	AS - 5'-GGGTTTCGATTTAGTTCCGGCT-3'		

S = sense; AS = anti-sense; pb = pares de bases; seg = segundos

Tabela VI - Sequências dos iniciadores, tamanhos dos fragmentos amplificados e temperaturas de anelamento utilizados para o rastreamento de mutações no exon 2 do gene *GJA1*.

Exon / Região*	Sequência	Tamanho do fragmento	Temperatura e tempo de anelamento
2 / 1	S - 5'-GATCTTTTCTTCGTTGGC-3' AS - 5'-CTCTTCCCTTAACCCG-3'	925 pb	60°C por 1 min
2 / 2	S - 5'-TTCCTCTCTCGCCCCAC-3' AS - 5'-GGCCTAGAAAGCTTACCTT-3'	1079 pb	60°C por 1 min

S = sense; AS = anti-sense; pb = pares de bases; min = minuto

* Toda a região codificadora está localizada no exon 2

2.2.4.3 - Sequenciamento automático

Os produtos da PCR foram sequenciados automaticamente utilizando-se o “*Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit*” versão 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Para esta etapa foram utilizados de 5 a 20 ng do produto amplificado para uma reação de 10µl (concentração dependente do tamanho do fragmento a ser amplificado), distribuídos da seguinte forma: 1,6 pmol de um dos oligonucleotídeos iniciadores de cada gene (“*sense*” ou “*antisense*”), 1µl de “*Big Dye Terminator Ready Reaction*” (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), 3 µl do “*5X Sequencing Buffer*” (Applied BioSystems, Foster City, CA, EUA) e o restante do volume completado com água deionizada estéril.

Realizaram-se 25 ciclos a 96°C por 10 segundos, a 50°C por 5 segundos e a 60°C por 4 minutos em aparelho termociclador (Applied BioSystems, Foster City, CA, EUA), prosseguindo-se com a purificação das reações para a retirada dos nucleotídeos não incorporados.

Aos 10µl de cada reação de seqüenciamento adicionaram-se 50µl de isopropanol 65%, procedendo-se a um repouso por 20 minutos em ambiente escuro e centrifugação à temperatura ambiente por 25 minutos a 14000 rpm. O sobrenadante foi desprezado, prosseguindo-se com a adição de 250µl de etanol 60% e centrifugação à temperatura ambiente por 10 minutos a 14000 rpm. O sobrenadante foi novamente descartado e o “*pellet*” remanescente aquecido a 70°C até a evaporação do etanol residual.

Em seguida, as reações foram ressuspensas em 15 µl de formamida, desnaturadas e submetidas à eletroforese no analisador automático de DNA “ABI PRISM 310” (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As seqüências foram submetidas a buscas por similaridade utilizando-se o “algoritmo de busca” disponível no endereço <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>.

2.2.4.4 - Digestão com enzima de restrição para avaliação do grupo controle

Para a investigação da mutação encontrada no gene *GJAI* foi utilizada, no grupo controle, enzima de restrição específica para esta alteração a fim de avaliar a sua frequência na população geral.

Em relação à mutação Ala253Val (GCG→GTG) no gene *GJAI*, utilizou-se a enzima *HhaI* (Q-Bio gene, Irvine, CA, EUA). Adicionaram-se 2µl do tampão da enzima (Tris-HCl 10mM [pH 7,5], KCl 100mM, EDTA 0,1mM, DTT 1mM, BSA 0,2mg/ml e glicerol 50%) e 20U da enzima a 10µl do produto da PCR, completando-se o volume final para 20µl com água deionizada estéril. A reação foi mantida por 2 horas a 37°C e em seguida por 20 minutos a 65°C para inativação da enzima, procedendo-se à eletroforese do volume total da reação em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio. Os tamanhos esperados dos fragmentos eram de 914pb e 165pb na ausência da mutação, 1079pb na presença da mutação em homozigose e 1079pb, 914pb e 165pb na presença da mutação em heterozigose.

2.2.5 - Correlação genótipo/fenótipo

A correlação entre as manifestações clínicas do grupo em estudo e as alterações encontradas no rastreamento de mutações foi realizada por meio dos exames oftalmológico e físico. Os parâmetros clínicos marcadores da gravidade da doença basearam-se na acuidade visual, necessidade de procedimento cirúrgico para controle do glaucoma, nível de pressão ocular e número de medicações utilizadas para controle da mesma.

2.2.6 - Análise dos heredogramas

Foram confeccionados heredogramas das famílias estudadas com o auxílio do programa *Cyrillic* versão 2.00 para avaliar o padrão de transmissão e a segregação concomitante, esta última definida pela presença de mutações em pacientes portadores da Síndrome de Axenfeld-Rieger e pela ausência das mesmas em pacientes não afetados.

2.2.7 - Análise estatística

Para as variáveis quantitativas foi utilizado o teste T de Student não pareado. Para as variáveis qualitativas foram utilizados os testes de χ^2 ou Fischer. Foram considerados significativos valores de P inferiores a 0,05. A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa EpiInfo versão 3.2.2.

2.2.8 - Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa do Ministério da Saúde [ANEXO]. Todos os pacientes incluídos no estudo foram informados sobre os objetivos e a metodologia da pesquisa, podendo ou não aceitar participar da mesma, sem constrangimento ou modificação de sua assistência médica. Previamente à coleta de sangue, todos os pacientes incluídos no estudo leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido [Apêndice 2].

3 - RESULTADOS

3.1 - Dados Epidemiológicos

Oito famílias não relacionadas entre si (92 indivíduos), em que pelo menos um dos seus integrantes era portador da Síndrome de Axenfeld-Rieger e glaucoma de desenvolvimento, foram avaliadas. [Tabela VII]. Na população estudada não havia indivíduos da raça negra ou de origem asiática. Quanto à distribuição dos casos-índice por sexo, 5 eram do sexo masculino (62,5%) e 3 do sexo feminino (37,5%).

Tabela VII - Caracterização dos casos-índice das famílias estudadas

<i>Famílias (casos-índice)</i>	<i>Sexo</i>	<i>Idade (anos)</i>	<i>Tempo de glaucoma (anos)</i>	<i>Cirurgia filtrante prévia</i>	<i>Medicações hipotensores oculares em uso (n)</i>	<i>Manifestações extra-oculares</i>	<i>Familiares avaliados (n)</i>	<i>Familiares afetados</i>
1. DS	fem	9	2	sim	2	não	12	nenhum
2. ESO	fem	19	11	não	1	não	4	nenhum
3. FAVS	masc	8	7	não	2	sim	4	nenhum
4. IJP	masc	17	3	não	2	não	14	nenhum
5. MCV	masc	16	16	sim	2	sim	6	nenhum
6. OGS	masc	38	5	não	1	sim	12	5
7. VS	fem	25	5	sim	1	não	4	nenhum
8. WDC	masc	11	8	sim	2	não	36	nenhum

masc = sexo masculino; fem = sexo feminino; n = número

Dentre os 8 casos-índice acometidos pela síndrome, a média de idade foi de $17,8 \pm 9,8$ anos, variando de 8 a 38 anos. A média de idade à época do diagnóstico do glaucoma foi de $10,6 \pm 10,7$ anos (desde o nascimento até 38 anos), com tempo médio de glaucoma de $7,5 \pm 4,5$ anos (de 2 a 16 anos). Entre os 8 casos-índice, 4 deles (50%) já haviam sido submetidos a cirurgia filtrante em pelo menos um dos olhos.

3.2 - Exame Clínico

As manifestações clínicas da síndrome estavam restritas aos olhos em 5 casos-índice (62,5%) [Tabela VII]. Na família 6 (caso índice: OGS), os outros 5 indivíduos afetados apresentavam alterações oculares e sistêmicas [Tabela VIII].

Quanto à presença ou à ausência de manifestações sistêmicas da síndrome, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes em relação à média de idade, idade ao diagnóstico, tempo de glaucoma e realização de cirurgias filtrantes nos pacientes afetados [Tabela IX]. Quanto ao sexo, todos os casos-índice com alterações extra-oculares eram do sexo masculino, enquanto na ausência destas, 2 (40%) eram do sexo masculino e 3 (60%) do sexo feminino.

Tabela VIII - Características clínicas do total de pacientes do grupo de estudo (n = 13) portadores da Síndrome de Axenfeld-Rieger associada a glaucoma

<i>Família</i>	<i>Pacientes</i>	<i>AV</i> <i>(OD e OE)</i>	<i>PIO em</i> <i>mmHg</i> <i>(OD e OE)</i>	<i>Escavação</i> <i>do nervo</i> <i>óptico</i> <i>(v x h)</i> <i>(OD e OE)</i>	<i>Cirurgia</i> <i>filtrante</i> <i>prévia</i>	<i>Medicações</i> <i>hipotensoras</i> <i>oculares em</i> <i>uso (n)</i>	<i>Alterações</i> <i>oculares</i>	<i>Alterações extra-</i> <i>oculares</i>
1	DS	20/30 e 20/30	10 e 20	0,6 x 0,6 e 0,7 x 0,7	sim	2	embriotóxon posterior, adesões iridocorneanas	ausentes
2	ESO	20/20 e 20/60	20 e 18	0,4 x 0,4 e 0,4 x 0,4	não	1	embriotóxon posterior, adesões iridocorneanas, hipoplasia de íris	ausentes
3	FAVS	20/200 e 20/100	13 e 19	0,5 x 0,5 e 0,4 x 0,4	não	2	embriotóxon posterior, adesões iridocorneanas, hipoplasia de íris, policoria, corectopia, microcórneia	hipoplasia malar, microdontia, hipodontia, alargamento da base nasal, redundância da pele peri- umbilical
4	IJP	20/20 e 20/20	20 e 24	0,2 x 0,2 e 0,2 x 0,2	não	2	embriotóxon posterior, adesões iridocorneanas,	Ausentes
5	MCV	20/30 e SPL	19 e 34	0,6 x 0,6 e 1,0 x 1,0	sim	2	embriotóxon posterior, adesões iridocorneanas, hipoplasia de íris, corectopia, policoria, ectrópio de úvea	hipoplasia malar, hipodontia

6	OGS	20/25 e 20/30	13 e 12	0,8 x 0,6 e 0,8 x 0,7	não	1	embriotóxon posterior, adesões iridocorneanas, hipoplasia de íris, policoria, ectrópio de úvea, proptose, hipertelorismo	hipoplasia malar, alteração da forma dos dentes, órbitas rasas, baixa estatura
6a	RGS	20/20 e 20/20	24 e 21	0,4 x 0,4 e 0,4 x 0,4	não	1	embriotóxon posterior, adesões iridocorneanas, hipoplasia de íris, hipertelorismo	hipoplasia malar, órbitas rasas, baixa estatura
6b	MCGS	CD e SPL	17 e 21	0,9 x 0,9 e 1,0 x 1,0	sim	4	embriotóxon posterior, adesões iridocorneanas, hipoplasia de íris	alteração da forma e número dos dentes, baixa estatura
6c	MGS	20/200 e SPL	12 e 34	0,8 x 0,7 e 1,0 x 1,0	sim	2	embriotóxon posterior, adesões iridocorneanas, policoria, inserção alta da íris	hipoplasia malar, alteração da forma dos dentes, baixa estatura
6d	MGS*	SPL e SPL	ND	1,0 x 1,0 e 1,0 x 1,0	sim	nenhuma	embriotóxon posterior, adesões iridocorneanas, policoria e atrofia de íris	hipoplasia malar, alteração da forma dos dentes, baixa estatura
6e	LGS	CD e 20/200	ND	ND	sim	2	embriotóxon posterior, adesões iridocorneanas, hipoplasia de íris, corectopia	hipoplasia malar, alteração da forma dos dentes
7	VS	20/25 e SPL	12 e zero	0,2 x 0,2	sim	1	embriotóxon posterior, adesões iridocorneanas, atrofia bulbar do olho esquerdo	Ausentes
8	WDC	20/25 e CD	13 e 13	0,7 x 0,6 e 0,7 x 0,6	sim	2	embriotóxon posterior, adesões iridocorneanas, hipoplasia de íris, corectopia, megalocórnea, catarata	Ausentes

OD = olho direito; OE = olho esquerdo; AV = acuidade visual corrigida; PIO = pressão intra-ocular na consulta inicial; mmHg = milímetros de mercúrio; v x h = vertical por horizontal; n = número; SPL = sem percepção luminosa; CD = conta dedos; ND = não disponível; MGS* = irmã do paciente MGS. Os pacientes 6a-6e pertencem à família do caso-índice 6 (OGS).

Tabela IX - Média de idade, idade ao diagnóstico, tempo de glaucoma e realização de cirurgia filtrante prévia de acordo com a presença ou não de manifestações extra-oculares da síndrome nos casos- índice.

Variáveis	Manifestações extra-oculares		P
	presentes	ausentes	
Idade (anos)	20,6 + 15,5	16,2 + 6,4	0,57
Idade ao diagnóstico (anos)	11,3 + 18,7	10,2 + 5,0	0,89
Tempo de glaucoma (anos)	9,3 + 5,8	6,4 + 3,7	0,41
Cirurgia prévia realizada	25%	75%	0,53

3.3 - Rastreamento de Mutações

3.3.1 - Gene *PITX2*

Não foram encontradas mutações na região codificadora e de processamento do gene *PITX2* em nenhum dos pacientes portadores da Síndrome de Axenfeld-Rieger.

3.3.2 - Gene *FOXC1*

Foram encontradas três alterações estruturais no gene *FOXC1* entre indivíduos não relacionados entre si e portadores da síndrome de Axenfeld-Rieger. As alterações consistiram em uma inserção de três bases, uma deleção de duas bases e uma mutação de ponto do tipo sem sentido.

A inserção caracteriza-se pela presença de três bases (GGC) entre os nucleotídeos 1359-1360 no segundo domínio de ativação, causando a adição de um aminoácido glicina (1359-1360insGGC) [Figura 8].

O paciente que apresentava esta alteração (MCV, caso-índice 5) foi diagnosticado com síndrome de Axenfeld-Rieger associada a alterações sistêmicas e glaucoma nos primeiros meses de vida [Figura 9]. Este indivíduo foi submetido a procedimento cirúrgico para controle da pressão ocular em ambos os olhos, necessitando

ainda, do auxílio de medicação anti-glaucomatosa (2 colírios) e sua visão era de 20/30 e SPL nos olhos direito e esquerdo, respectivamente. Excetuando o caso-índice, todos os demais membros avaliados da família (n = 6) apresentavam fenótipos normais [Figura 10].

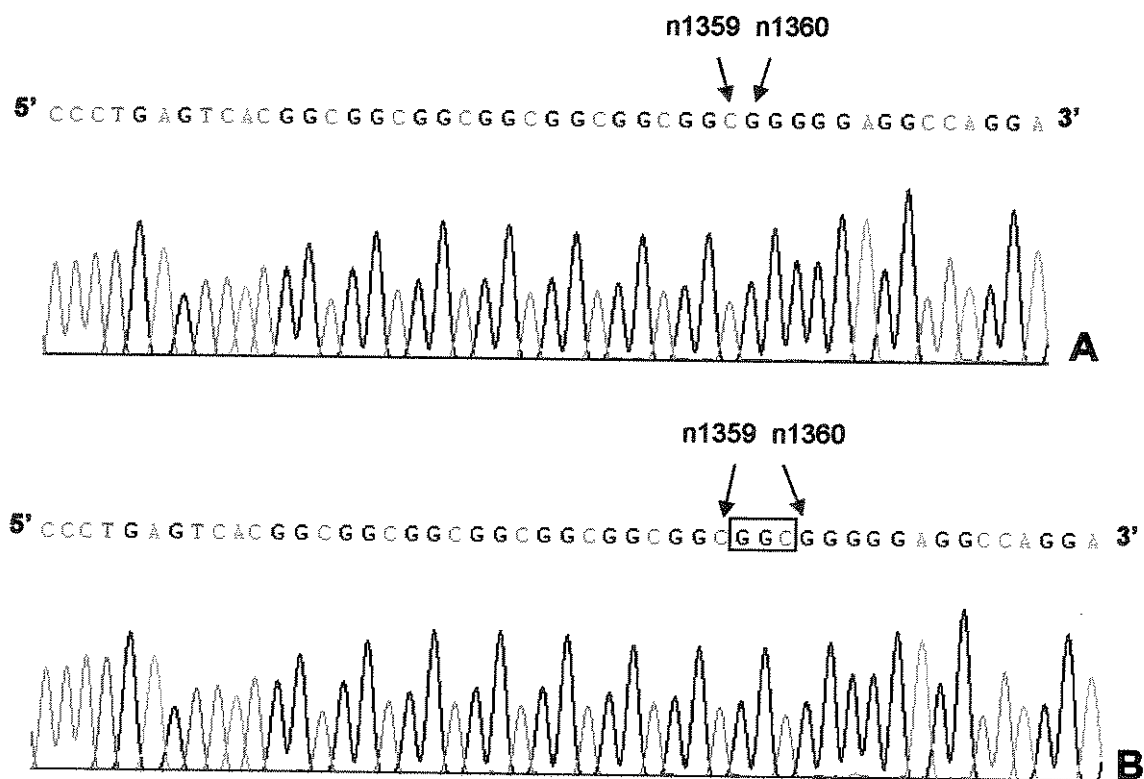


Figura 8 - Sequenciamento direto do produto da PCR correspondente à região 4 do gene *FOXC1*. 8A mostra controle normal, apresentando 7 repetições GGC. 8B mostra o paciente MCV (caso-índice da família 5) apresentando a inserção de 3 bases (GGC) entre os nucleotídeos 1359 e 1360 (1359-1360insGGC), conforme indicado pelas setas.

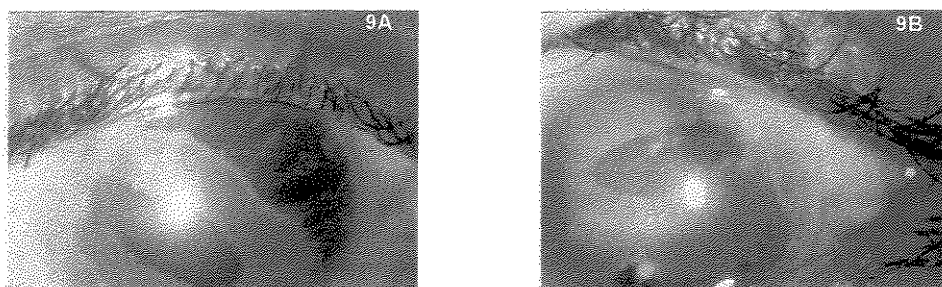


Figura 9 - Biomicroscopia do segmento anterior do paciente MCV (caso-índice 5) evidenciando embriotóxon posterior, atrofia de íris, corectopia e ectrópio de úvea. 9A representa o olho direito; 9B representa o olho esquerdo.

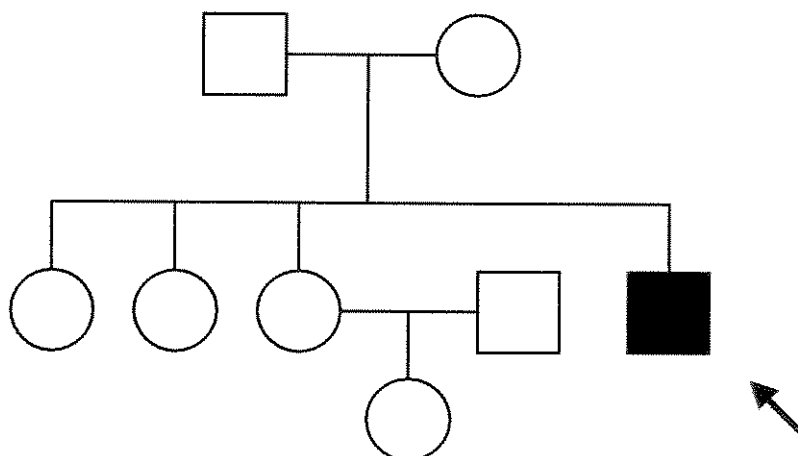


Figura 10 - Heredograma da família 5 mostrando o caso-índice (seta) como o único indivíduo acometido pela Síndrome de Axenfeld-Rieger.

No paciente WDC (caso-índice 8) foi identificada uma deleção de duas bases (CT), correspondentes aos nucleotídeos 718 e 719 (718-719delCT), localizada após o domínio *forkhead*, mais especificamente no aminoácido 240 do domínio de inibição do exon [Figura 11]. A deleção estava presente em heterozigose e apenas o caso-índice desta família era portador da síndrome e da alteração no gene *FOXC1*, o que caracteriza uma mutação *de novo* [Figura 12]. O indivíduo WDC desenvolveu glaucoma aos três anos de idade e, devido à refratariedade ao tratamento clínico, foi submetido a procedimento cirúrgico para redução da PIO em ambos os olhos.

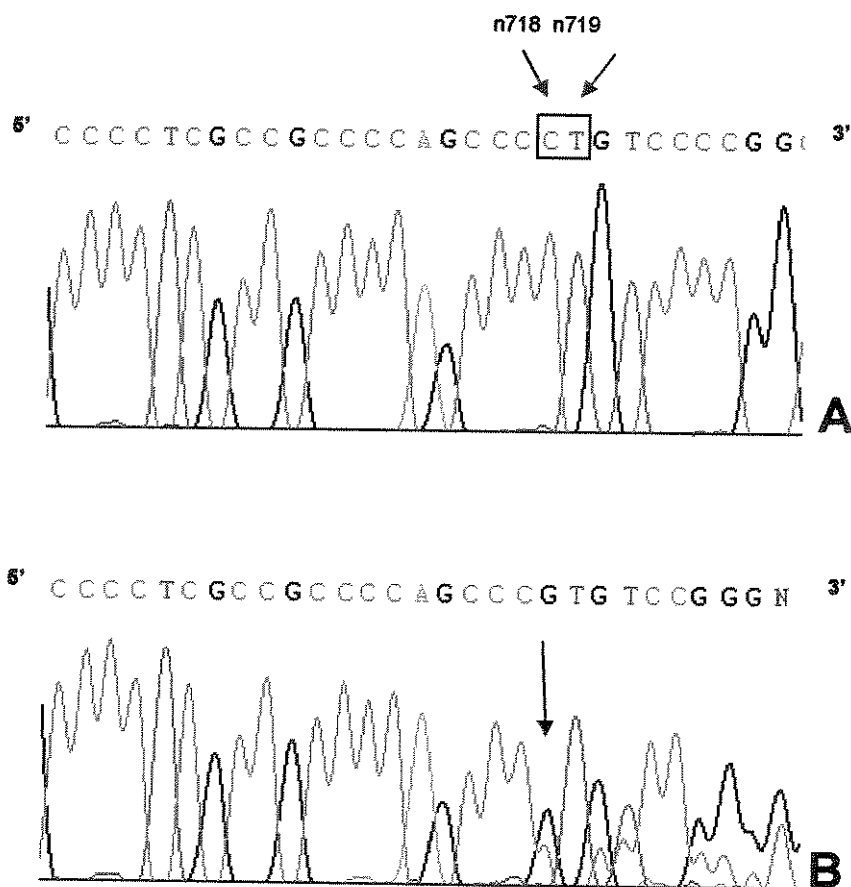


Figura 11 - Sequenciamento direto do produto da PCR correspondente à região 2 do gene *FOXCI*. 11A mostra controle normal. 11B mostra o paciente WDC (caso-índice 8), apresentando a deleção de 2 bases (CT) entre os nucleotídeos 718 e 719, conforme indicado pelas setas.

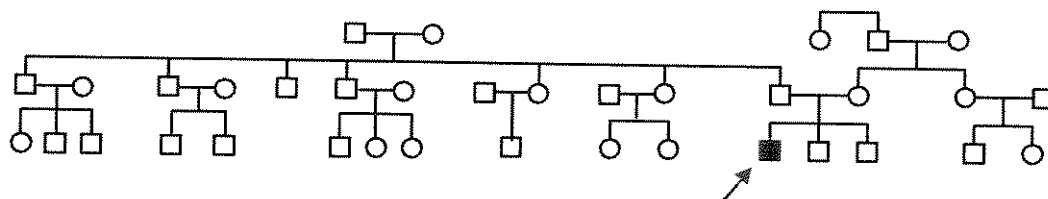


Figura 12 - Heredograma da família 8 mostrando o caso-índice (seta) como o único indivíduo portador da síndrome associada a glaucoma.

A mutação de ponto do tipo sem sentido foi identificada em seis indivíduos da família 6, incluindo o caso-índice. A mutação consiste na substituição do aminoácido Triptofano (TGG) para um códon de terminação (TGA) na posição 152 (Trp152STOP), localizada no domínio *forkhead* do gene *FOXC1* [Figura 13].

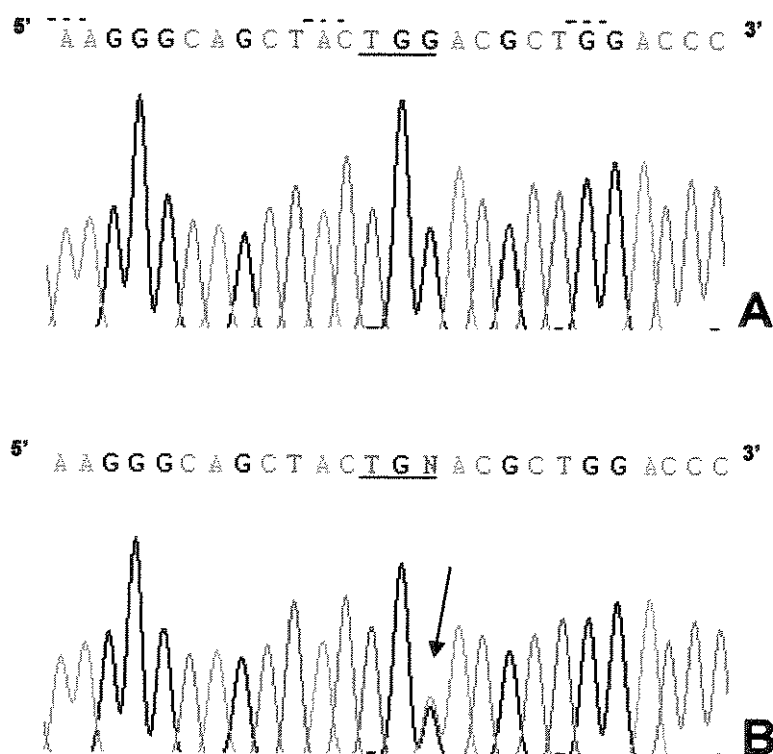


Figura 13 - Seqüenciamento direto do produto da PCR da região 2 do gene *FOXC1*. 13A mostra indivíduo do grupo controle. 13B mostra o paciente OGS (caso-índice 6), que apresenta a mutação TGG→TGA (indicada pela seta), resultando na substituição de um aminoácido triptofano por um códon de terminação (Trp152STOP).

A família 6 possui três gerações de indivíduos, dos quais 12 foram avaliados. Dos seis membros da família afetados, todos apresentavam a mutação Trp152STOP, com fenótipo caracterizado por manifestações extra-oculares da síndrome e glaucoma de desenvolvimento. De modo geral, estes indivíduos possuíam baixa estatura e alterações

faciais compatíveis com hipoplasia dos maxilares, além de alterações dentárias, mas não apresentavam alterações umbilicais [Figura 14]. Em todos eles as alterações oculares características da síndrome estavam presentes, tais como embriotóxon posterior, adesões iridocorneanas periféricas e hipoplasia do estroma iriano [Figura 15]. Com exceção dos indivíduos OGS e RGS, pertencentes à segunda geração, todos os demais pacientes afetados pela síndrome necessitaram de procedimento cirúrgico para redução da pressão ocular e apresentavam redução importante da acuidade visual [Tabela VIII] [Figura 16].

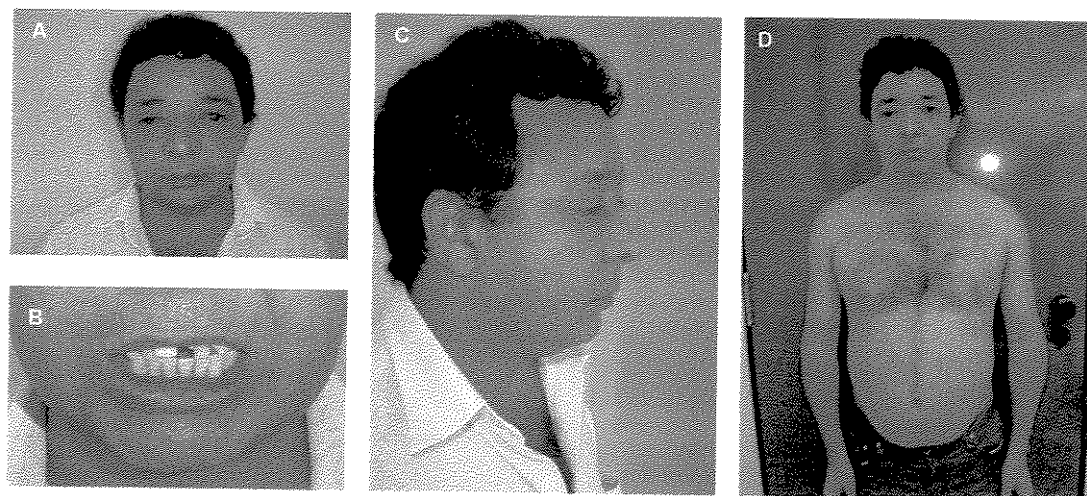


Figura 14 - Paciente OGS (caso-índice 6). 14A e 14C mostram as alterações ósseas caracterizadas por aplanamento da região média da face devido à hipoplasia de maxilares, hipertelorismo e órbitas rasas; 14B evidencia as malformações e fragilidade dentárias; 14D mostra ausência de alterações na pele peri-umbilical.



Figura 15 - 15A mostra alterações oculares do paciente OGS (família 6), caracterizadas por embriotoxon posterior, adesões iridocorneanas periféricas e áreas de atrofia iriana causando policoria; 15B e 15C mostram alterações oculares do paciente RGS (família 6), evidenciando atrofia de estroma iriano, ectrópio uveal, embriotoxon posterior e adesões iridocorneanas periféricas.



Figura 16 - Paciente LGS, indivíduo mais jovem da família 6, com glaucoma diagnosticado desde o nascimento. Observa-se aplanamento da região média da face devido à hipoplasia de maxilares, além de hipertelorismo e malformações dentárias, caracterizada pela ausência de incisivos laterais superiores.

3.3.3 - Gene *GJA1*

Em três indivíduos da família 6 foi encontrada uma mutação do tipo sentido trocado no gene *GJA1*, caracterizada pela substituição em heterozigose de citosina por timina na segunda base do códon 253 (GCG→GTG), levando à substituição do aminoácido Alanina por Valina (Ala253Val) [Figura 17].

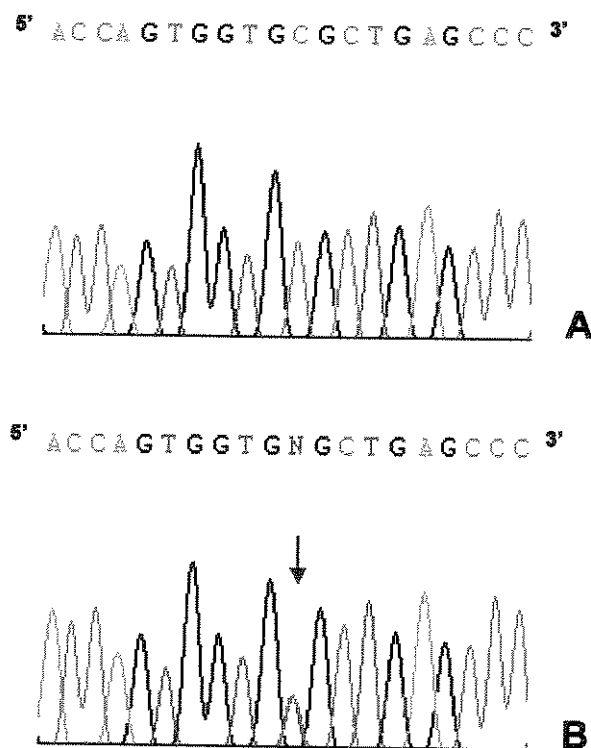


Figura 17 - Sequenciamento direto do produto da PCR evidenciando uma nova mutação em heterozigose no gene *GJA1*. 17A mostra indivíduo controle. 17B mostra indivíduo portador da mutação GCG→GTG (seta), resultando na alteração do aminoácido localizado no códon 253 (Ala253Val).

A mutação estava presente no caso-índice da família 6 e em mais dois indivíduos, sendo que um deles apresentava fenótipo normal, sem qualquer semelhança com as alterações clínicas encontradas na Síndrome de Axenfeld-Rieger [Figura 18]. Os dois indivíduos portadores da mutação e clinicamente acometidos pela síndrome associada

ao glaucoma de desenvolvimento apresentavam pressão ocular controlada com o uso de um colírio e preservação da acuidade visual. Além disso, nestes pacientes, a instalação do glaucoma ocorreu mais tardiamente que nos outros membros da família.

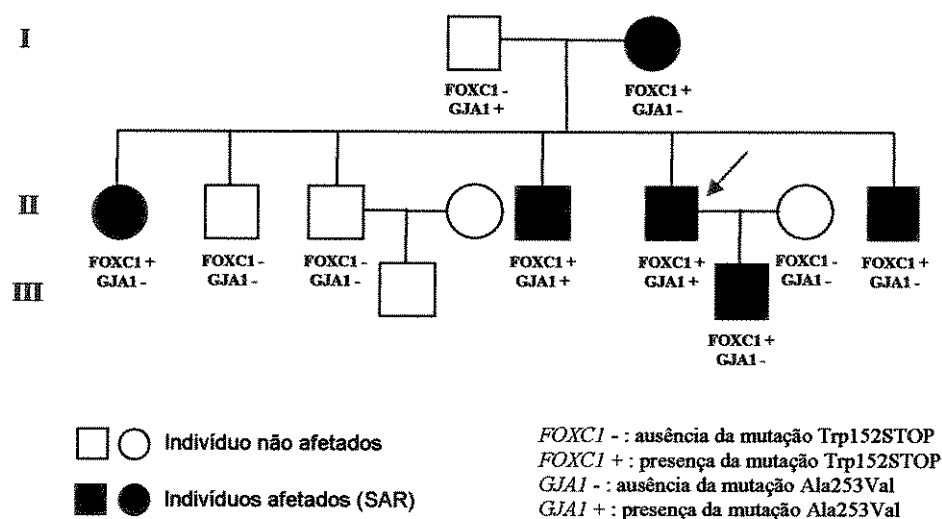


Figura 18 - Heredograma da família 6 evidenciando seis indivíduos acometidos pela síndrome associada à glaucoma. O caso-índice (seta) e seu irmão (quadrados azuis) apresentam mutações nos genes *FOXCI* e *GJA1* e clinicamente apresentam fenótipos menos graves que os demais pacientes acometidos por mutações apenas no gene *FOXCI*. Observa-se uma transmissão autossômica dominante da síndrome com segregação concomitante da mutação no gene *FOXCI*. SAR = Síndrome de Axenfeld-Rieger.

3.4 - Grupo Controle

A alteração estrutural observada no gene *GJAI* não foi identificada entre os 50 indivíduos pertencentes ao grupo controle [Figura 19].

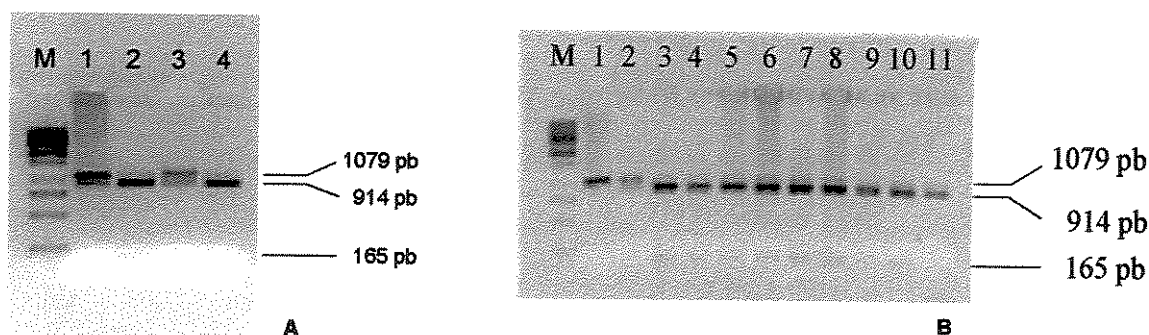


Figura 19 - 19A - Avaliação dos membros da família 6, segundo digestão do produto da PCR do gene *GJAI* (região 2) com a enzima *HhaI*. M = marcador de peso molecular "ladder 1Kb"; 1 e 3 = pacientes OGS (caso-índice) e RGS, portadores da mutação Ala253Val (fragmentos de 1079, 914 e 165 pb); 2 e 4 = esposa e filho do paciente OGS, respectivamente, ambos não portadores da mutação (fragmentos de 914 e 165 pb). 19B - Avaliação do grupo controle segundo digestão do produto da PCR do gene *GJAI* (região 2) com a enzima *HhaI*. M = marcador de peso molecular "ladder 1Kb"; 1 = produto da PCR não digerido (fragmento de 1079 pb); 2 = controle positivo para a mutação Ala253Val em heterozigose (fragmentos de 1079, 914 e 165 pb); 3 a 11 = indivíduos do grupo controle, não portadores da mutação (fragmentos de 914 e 165 pb).

3.5 - Análise de Segregação e de Heredograma

As alterações estruturais no gene *FOXC1*, caracterizadas por inserção (1359-1360insGGC) e deleção (718-719delCT) estavam presentes em casos esporádicos da Síndrome de Axenfeld-Rieger [Figuras 10 e 12, respectivamente]. Em contrapartida, a

mutação do tipo sem sentido (Trp152STOP) presente na família 6 apresentou segregação concomitante às alterações fenotípicas. Nesta família, a síndrome apresentou um padrão de transmissão autossômico dominante [Figura 18].

A mutação no gene *GJAI* (Ala253Val), presente em heterozigose, não apresentou segregação concomitante, pois, além de estar presente no indivíduo da primeira geração que não apresenta a síndrome, encontra-se ausente em 50% dos pacientes clinicamente acometidos da segunda geração e no paciente acometido da terceira geração.

3.6 - Correlação Genótipo/Fenótipo

Os indivíduos da família 6 portadores das mutações nos genes *FOXC1* e *GJAI* simultaneamente (Trp152STOP e Ala253Val, respectivamente) apresentavam fenótipos menos graves que os demais membros afetados da mesma família com mutação restrita ao *FOXC1* [Tabela VIII]. Estes indivíduos, com a mutação Trp152STOP isolada, apresentavam fenótipo grave, com acuidade visual reduzida e mesmo cegueira devido ao glaucoma refratário ao tratamento. Estas características clínicas eram semelhantes às do indivíduo da família 5 portador da mutação 1359-1360insGGC no gene *FOXC1*, que também apresentava cegueira unilateral por glaucoma.

O indivíduo da família 8, portador da mutação 718-719delCT no gene *FOXC1*, apesar das alterações restritas à região ocular, apresentava fenótipo grave, representado por acuidade visual bastante reduzida em um dos olhos (visão de “conta dedos”) e glaucoma de difícil controle, tendo sido submetido a cirurgia filtrante e estando em uso adicional de medicação hipotensora no pós-operatório.

Apesar do pequeno número de indivíduos avaliados, o que prejudica uma análise estatística mais detalhada, os pacientes que apresentaram Síndrome de Axenfeld-Rieger associada ao glaucoma de desenvolvimento e mutações no gene *FOXC1* foram comparados àqueles sem alterações estruturais no gene *FOXC1*. Os pacientes com mutações no gene *FOXC1* apresentaram glaucoma de desenvolvimento mais precocemente, maior frequência de cegueira unilateral, maior descontrole da pressão ocular e maior

freqüência de cirurgia anti-glaucomatosa, evidenciando uma tendência de pior evolução clínica quando avaliados conjuntamente com os indivíduos sem mutações neste gene [Tabela X]. Para a realização desta avaliação, foram considerados os casos-índice das famílias estudadas, à exceção da família 6, cujo caso-índice apresentava mutação tanto no gene *FOXC1* quanto no *GJAI*. Neste caso específico, para efeito de análise, foi considerado seu irmão (MGS), portador exclusivamente da mutação no *FOXC1*.

Tabela X - Comparação clínica entre os indivíduos portadores de mutação no gene *FOXC1* e os indivíduos sem mutação neste gene.

Mutação no gene <i>FOXC1</i>	Presente (n = 3)	Ausente (n = 5)
Idade ao diagnóstico do glaucoma (média em anos)	2,6 ± 2,5	10 ± 7,2
Cegueira em um dos olhos (%)	2 (66,6%)	1 (20%)
PIO (média no pior olho em mmHg)*	27 ± 12,1	19 ± 4,3
Número de colírios (média)	2	1,6
Cirurgia prévia realizada	100%	40%

n = número; PIO = pressão intra-ocular; mmHg = milímetros de mercúrio.

* A despeito do tratamento instituído (clínico ou cirúrgico).

4 - DISCUSSÃO

4.1 - Dados Epidemiológicos

O glaucoma é a segunda maior causa de cegueira irreversível no mundo, com uma prevalência estimada de 6,7 milhões de pessoas afetadas pela doença (QUIGLEY, 1996).

Uma das abordagens em genética é a identificação de genes associados a doenças que, na área específica da oftalmologia, poderia ajudar na predição do prognóstico e na instituição do melhor tratamento, na tentativa de prevenir a cegueira (SAMPLES e WIRTZ, 2003).

O conhecimento das bases genéticas das doenças oculares permite que se abram novas perspectivas na terapêutica, com o desenvolvimento de drogas com tecnologia de recombinação gênica que possam equilibrar a deficiência funcional causada por um gene defeituoso ou estimular, por meio de proteínas recombinantes, uma via alternativa na sequência de eventos enzimáticos envolvidos na fisiopatologia da doença em questão (SAMPLES e WIRTZ, 2003).

A identificação de genes e *loci* envolvidos nas diversas formas de glaucoma levaram, nos últimos anos, a uma melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos do glaucoma primário de ângulo aberto, do glaucoma primário juvenil e de algumas formas de glaucoma associado a malformações do desenvolvimento, entre elas a Síndrome de Axenfeld-Rieger (ALWARD, 2000).

A Síndrome de Axenfeld-Rieger é uma entidade clínica rara, com frequência estimada de 1 caso em cada 200.000 indivíduos (ALKEMADE, 1969). Apesar de algumas de suas características clínicas terem sido inicialmente observadas por VOSSIUS em 1883, foi a partir de 1920 que começou a ser considerada uma entidade distinta devido às observações sistemáticas de AXENFELD e, subsequentemente de RIEGER (ALWARD, 2000).

Seu diagnóstico baseia-se principalmente em uma variedade de manifestações oculares transmitidas de forma autossômica dominante e que incluem alterações no ângulo iridocorneano e no tecido iriano. Estas malformações têm alta penetrância, ou seja, estão

presentes numa significativa proporção de indivíduos dentro de uma família acometida, e acarretam um risco aproximado de 50% de glaucoma devido à deficiência de escoamento do humor aquoso pela imaturidade da malha trabecular (LINES et al, 2002).

SHIELDS (1983) avaliou 24 pacientes portadores da síndrome num amplo estudo, determinando características epidemiológicas e estabelecendo correlações clínico-patológicas que permanecem como a base das manifestações clínicas e dos possíveis mecanismos fisiopatológicos envolvidos. SHIELDS (1983) observou que a idade dos indivíduos acometidos era extremamente variável, abrangendo uma faixa etária de 6 semanas a 71 anos, com média de 26,2 anos. Da mesma forma, a idade no momento do diagnóstico variou desde o nascimento até os 71 anos. No nosso grupo de estudo, a média de idade foi de 17,8 anos e, de forma semelhante, a idade dos pacientes apresentou grande variação (de 8 a 38 anos), assim como a idade no momento do diagnóstico (do nascimento aos 38 anos). A média de idade dos nossos pacientes no momento do diagnóstico da síndrome e do glaucoma associado a ela foi de 10,6 anos. Esta média é discretamente mais baixa que a descrita na literatura, na qual o glaucoma torna-se manifesto na adolescência ou no início da idade adulta (SHIELDS et al, 1985).

O glaucoma associado às malformações de Axenfeld-Rieger está presente em aproximadamente metade dos pacientes, sendo geralmente de difícil controle e necessitando, não raro, de intervenção cirúrgica (SHIELDS et al, 1985). Dos oito pacientes portadores da síndrome com glaucoma, 50% deles foram submetidos a cirurgia filtrante (trabeculectomia) em pelo menos um dos olhos. Esta porcentagem é semelhante àquela encontrada por SHIELDS (1983), em que 45,8% dos seus pacientes foram submetidos à trabeculectomia.

Não foi possível realizar uma avaliação estatística das alterações de campo visual pelo fato de que vários pacientes não conseguiram realizá-lo, quer seja pela baixa acuidade visual quer seja pela idade. Assim, não consideramos os resultados perimétricos como uma variável a ser avaliada em nosso estudo.

O diagnóstico da síndrome associada ao glaucoma é geralmente realizado através da observação das alterações oculares características, além da presença de pressão ocular elevada em pacientes jovens, baixa acuidade visual em pacientes adultos e pela

presença dos achados extra-oculares (SHIELDS et al, 1985). Contudo, alguns casos são diagnosticados através de exame de rotina ou pela presença de familiares afetados (SHIELDS et al, 1985).

Mesmo com transmissão autossômica dominante e penetrância variável (VAUX et al, 1992), das oito famílias avaliadas em nosso estudo apenas uma apresentava familiares afetados (12,5% dos casos-índice). Este dado contrasta com o estudo de SHIELDS (1983), em que a ocorrência de familiares afetados estava presente em quase 40% dos casos, mas evidencia que a ocorrência de casos esporádicos na população pode ser freqüente.

As manifestações extra-oculares da síndrome apresentam penetrância incompleta e expressão variável e caracterizam-se mais comumente por alterações dentárias, faciais e da região umbilical (SHIELDS, 1983).

Estas manifestações foram inicialmente observadas por MATHIS em 1936 e subsequente por RIEGER (ALWARD, 2000). As alterações dentárias compreendem mudanças na forma, tamanho e número dos dentes, sendo os mais freqüentemente acometidos os incisivos centrais e os primeiros molares (SHIELDS, 1983). As alterações faciais descritas por RIEGER envolviam os ossos maxilares que, devido à sua hipoplasia, resultavam no aplanamento da face associada ao retrocesso do lábio superior, principalmente se houvesse hipoplasia dental concomitante. Além da hipoplasia maxilar, são igualmente descritos hipertelorismo e base nasal alargada nos fenótipos da síndrome (CROSS et al, 1979). Outras alterações sistêmicas geralmente associadas incluem alterações na região umbilical, que se manifestam através de redundância da pele peri-umbilical ou pela presença de hérnias, e a presença de hipospádias no sexo masculino (SHIELDS et al, 1985).

As manifestações extra-oculares nem sempre acompanham a Síndrome de Axenfeld-Rieger, visto que SHIELDS (1983) encontrou alterações dentárias e faciais em apenas quatro pacientes e alterações umbilicais em outros quatro, de um total de 24 pacientes estudados. Na nossa população, observou-se a presença de manifestações extra-oculares em três de oito pacientes. Estes três pacientes apresentavam hipoplasia

maxilar e alterações dentárias e apenas um deles apresentava falência de involução da pele peri-umbilical. Além destes achados, baixa estatura, hipertelorismo e órbitas rasas estavam presentes em cinco pacientes da mesma família (família 6). A presença de alterações sistêmicas não influenciou na idade de diagnóstico da doença e nem na necessidade de cirurgia filtrante de forma estatisticamente significativa.

Quanto à etnia dos pacientes estudados, não havia pacientes negros ou de origem asiática no nosso grupo de estudo, impossibilitando a análise de distribuição racial. Quanto ao sexo, a pequena amostragem não permite afirmar predileção, mas foi encontrado um número maior de pacientes acometidos pertencentes ao sexo masculino.

4.2 - Mutações no Gene *PITX2*

A frequência de mutações no *PITX2* em pacientes portadores da Síndrome de Axenfeld-Rieger é variável. SEMINA et al (1996a) encontraram uma prevalência de 42,2%, mas prevalências mais baixas foram observadas em outros estudos. PERVEEN et al (2000) encontraram mutações em aproximadamente 11% dos seus casos, PRISTON et al (2001) em cerca de 14% de seus pacientes com síndrome incluindo alterações extra- oculares e em 8% de pacientes com malformações restritas ao segmento anterior ocular e LINES et al (2004) relataram a ocorrência de alterações em 9,4% de pacientes portadores de malformações oculares que compreendiam os fenótipos de Axenfeld-Rieger. No Brasil, o único estudo disponível mostrou uma frequência aproximada de 39% (BORGES et al, 2002). Esta variedade de resultados reflete a grande heterogeneidade genética da síndrome (PERVEEN et al, 2000).

O *PITX2* é um gene do tipo *homeobox*, ou seja, possui um domínio de ligação ao DNA (homeodomínio) de 60 aminoácidos, e pertence à família bicoidal de fatores de transcrição, caracterizada pela presença de um resíduo de lisina na posição 50 da terceira hélice do seu homeodomínio que confere especificidade de ligação a um dinucleotídeo CC do DNA (SEMINA et al, 1996a). Esta especificidade é característica a todos os membros da família bicoidal (HANES et al, 1994).

Os genes *homeobox* exercem papel fundamental no controle genético do desenvolvimento (ESPINOZA et al, 2002) e o gene *PITX2*, por sua vez, está envolvido na diferenciação do mesênquima ocular, da lâmina dentária e do cordão umbilical (SEMINA et al, 1996a). Suas mutações podem causar Síndrome de Axenfeld-Rieger através de mecanismos de ganho de função (positivo ou negativo) sobre o alelo normal (SEMINA et al, 1996a; FLOMEN et al, 1998; SAADI et al, 2001) ou por haploinsuficiência, devido à deleção de um dos cromossomos homólogos (LINES et al, 2004) ou a translocações insercionais balanceadas herdadas de indivíduos saudáveis (FLOMEN et al, 1997; SCHINZEL et al, 1997). Apesar da haploinsuficiência do gene *PITX2* ser o mecanismo geral sugerido como causador da síndrome (LINES et al, 2004), a presença de atividade residual do alelo mutante (KOZLOWSKI e WALTER, 2000), de mudanças na localização nuclear do gene (AMENDT et al, 1998) e de rearranjos cromossômicos distantes cerca de 90 kb do gene (LINES et al, 2002) também contribuem para a variabilidade fenotípica.

O gene *PITX2* foi inicialmente clonado e caracterizado por SEMINA et al (1996a), sendo originalmente denominado *RIEG*. O estudo pioneiro de SEMINA et al (1996a) envolveu 10 famílias, das quais sete possuíam indivíduos portadores de mutações no *PITX2*, resultando numa prevalência de mutações de 42,2%. Apesar de uma prevalência elevada, vários indivíduos com fenótipos de Axenfeld-Rieger não apresentaram mutações, sendo sugerida uma possível heterogeneidade genética da moléstia.

Após a identificação do *PITX2*, outros estudos foram realizados com pacientes portadores de entidades consideradas distintas, mas que compartilhavam fenótipos semelhantes, como a Síndrome de Iridogoniodisgenesia (KULAK et al, 1998) e a Hipoplasia de Íris Autossômica Dominante (ALWARD et al, 1998).

KULAK et al (1998) estudaram uma família com 39 indivíduos, dos quais 11 eram portadores de Síndrome de Iridogoniodisgenesia, caracterizada clinicamente por hipoplasia de íris, glaucoma juvenil, hipoplasia maxilar, alterações dentárias e falência de involução da pele peri-umbilical. Neste estudo foi encontrada uma mutação no gene *PITX2* do tipo sentido trocado no quarto aminoácido da hélice 2 do homeodomínio, levando à substituição de arginina por histidina com possível desestabilização da ligação da proteína

ao DNA. Este achado contribuiu para a suposição, pela primeira vez, de que a Síndrome de Iridogoniodisgenesia e a Síndrome de Axenfeld-Rieger pudessem ser doenças alélicas por resultarem de mutação no mesmo gene.

De forma semelhante, ALWARD et al (1998) estudando uma família com 12 indivíduos, dos quais sete com Hipoplasia de Íris Autossômica Dominante, observaram a presença de mutação no homeodomínio do gene *PITX2*, caracterizada pela substituição de arginina por triptofano no códon 46. A Hipoplasia de Íris Autossômica Dominante, na época considerada também entidade clínica distinta da Síndrome de Axenfeld-Rieger, caracteriza-se por hipoplasia do estroma iriano associada, por vezes, a alterações sistêmicas que incluem hipoplasia maxilar, alterações dentárias e da pele peri-umbilical. Este estudo contribuiu para reforçar a hipótese de que estas malformações do segmento ocular anterior pudessem ser, na realidade, também doenças alélicas.

Em 2000, PERVEEN et al estudando 76 indivíduos portadores de malformações no segmento anterior do olho que incluíam aniridia (ausência bilateral de íris), Anomalia de Peters (opacificação da córnea associada a adesões córneo-cristalinianas) e Síndrome de Axenfeld-Rieger, encontraram mutações no *PITX2* em 8 pacientes (11%). Nestes pacientes com mutações, dois casos eram esporádicos e oito apresentavam familiares afetados. Das 12 mutações encontradas, duas eram do tipo sentido trocado e se situavam no homeodomínio, seis foram identificadas na região de processamento (introns 2 e 3) e quatro mutações eram do tipo sem sentido situadas no exon 4 que resultaram em terminações prematuras da porção C-terminal. Estas mutações com terminações prematuras sugeriram que o mecanismo envolvido na manifestação clínica da síndrome podia ser decorrente de uma insuficiência de haplótipo. Os achados de PERVEEN et al foram ligeiramente discordantes daqueles de SEMINA et al (1996a), KULAK et al (1998) e ALWARD et al (1998) no que diz respeito à localização das mutações, pois estes autores demonstraram que a maioria das mutações situava-se no homeodomínio. Ainda no estudo de PERVEEN et al (2000), 58% dos pacientes com Síndrome de Axenfeld-Rieger não apresentaram mutações, sendo este fato atribuído à heterogeneidade genética própria da doença.

PRISTON et al (2001), avaliando 38 indivíduos com malformações do segmento anterior do olho, encontraram três mutações no *PITX2*, com uma prevalência de 8%. Dentre as malformações oculares incluíam-se pacientes portadores da Síndrome de Axenfeld-Rieger com manifestações apenas oculares (9 casos), pacientes com manifestações oculares e sistêmicas (21 casos) e pacientes portadores de Hipoplasia de Íris (5 casos) e Anomalia de Peters (3 casos). Nos pacientes portadores de manifestações sistêmicas da síndrome, a frequência de mutações encontrada foi de aproximadamente 14%. As três mutações encontradas estavam presentes no homeodomínio do *PITX2* de pacientes portadores de manifestações oculares e sistêmicas da Síndrome de Axenfeld-Rieger. Neste estudo foi observada a presença de uma mutação no códon 45 (homeodomínio) com substituição de uma valina por leucina (mutação V45L) que aumentava a atividade de ligação ao DNA, tornando-se tão prejudicial ao desenvolvimento normal do olho quanto a ocorrência de mutações que diminuem a atividade ligacional do gene. Além desta mutação, observou-se, pela primeira vez, uma duplicação de 21 pares de bases na porção N-terminal do homeodomínio, levando à formação de uma proteína *solurshin* defeituosa com conformação alterada que inibe a ligação ao DNA. PRISTON et al (2001) observaram que a baixa prevalência de mutações no *PITX2* era condizente com a heterogeneidade genética da síndrome.

Mais recentemente, LINES et al (2004) encontraram uma prevalência de mutações no gene *PITX2* de 9,4% estudando 64 pacientes portadores de malformações do segmento anterior ocular que compreendiam os fenótipos de Axenfeld-Rieger. A observação desta baixa prevalência contrasta com os achados de SEMINA et al (1996a), mas está em concordância com as frequências encontradas de mutações no *PITX2* em outros estudos (PERVEEN et al, 2000; PRISTON et al, 2001).

A limitada prevalência de mutações no gene *PITX2* sugere que haja um subgrupo de pacientes com Síndrome de Axenfeld-Rieger onde as mutações não são normalmente detectáveis apenas pelas análises de sequenciamento usuais e nos quais a presença de hemizigose do gene *PITX2* produz um fenótipo semelhante ao das mutações, contribuindo para a hipótese de que a haploinsuficiência é o mecanismo fisiopatológico geral envolvido na ocorrência da síndrome (LINES et al, 2004).

Apesar das inúmeras mutações no *PITX2* já descritas na literatura [Tabela II], não foram encontradas mutações neste gene no nosso grupo de estudo. Das oito famílias examinadas, três delas apresentavam o caso-índice com alterações oculares e sistêmicas, fenótipo mais associado a mutações no gene *PITX2* quando comparado à presença de alterações oftalmológicas isoladas (SEMINA et al, 1996a; NISHIMURA et al, 1998; PRISTON et al, 2001). Avaliando-se o padrão de transmissão, apenas uma família da nossa amostra (família 6) possuía um padrão autossômico dominante, sendo os demais casos esporádicos. Interessante notar que o caso-índice desta família apresentava, como característica associada às malformações dentárias, um aumento na fragilidade dos dentes [Figura 10B], fato considerado relativamente comum por ESPINOZA et al (2002) e mais freqüentemente associado a mutações no gene *PITX2*, pela sua impossibilidade de ativar genes envolvidos na formação dentária (AMENDT et al, 1998).

Os nossos resultados são diferentes daqueles obtidos por BORGES et al (2002) que, após avaliarem cinco famílias brasileiras com padrão de transmissão autossômico dominante, encontraram duas mutações diferentes no gene *PITX2* e sugeriram que alterações moleculares neste gene seriam responsáveis por uma significativa proporção de casos de Síndrome de Axenfeld-Rieger no Brasil. Tanto o estudo de BORGES et al (2002) como o nosso sugerem que a heterogeneidade genética da síndrome possa ser um fator importante na ausência de mutações no gene *PITX2* nestes pacientes, principalmente quando outros estudos (MIRZAYANS et al, 2000; SUZUKI et al, 2001; HONKANEN et al, 2003) demonstram a associação de manifestações sistêmicas da síndrome com mutações no gene *FOXC1*. Porém, além da heterogeneidade genética, os nossos achados tornam possível hipotetizar que, a despeito da presença de manifestações oculares e sistêmicas, a proporção de mutações no gene *PITX2* possa ser menor quando se trata de casos esporádicos. Além disso, a ocorrência de hemizigose, como proposto por LINES et al (2004), pode justificar a baixa freqüência de alterações estruturais no gene *PITX2* nesta população. Para uma análise mais apropriada seria necessário avaliar este grupo de indivíduos através da metodologia de FISH ("*Fluorescent In Situ Hybridization*") para afastar a deleção de um alelo do gene *PITX2*.

4.3 - Mutações no Gene *FOXC1*

A presença de mutações no gene *FOXC1* em pacientes com a Síndrome de Axenfeld-Rieger foi inicialmente descrita pelos trabalhos independentes de NISHIMURA et al (1998) e de MEARS et al (1998) envolvendo pacientes portadores de alterações restritas à região ocular.

Até o ano de 2000, acreditava-se que a Síndrome de Axenfeld-Rieger com malformações oculares e sistêmicas estava ligada apenas a mutações no gene *PITX2* ou no locus RIEG2 (13q14), mas MIRZAYANS et al (2000), estudando uma família com nove membros afetados pela síndrome que apresentavam manifestações sistêmicas e cuja análise de ligação excluía o gene *PITX2* e o locus RIEG2, identificaram uma mutação sem sentido (Gln23STOP) antes do domínio *forkhead* e sugeriram que a haploinsuficiência envolvendo o *FOXC1* poderia levar a fenótipos envolvendo alterações sistêmicas.

KOMATIREDDY et al (2003) estudaram 10 famílias com manifestações apenas oculares da síndrome e identificaram duas novas mutações do tipo sem sentido que resultavam em haploinsuficiência (Gln2STOP e Gln123STOP). Foi observado que este mecanismo não necessariamente resultava em manifestações clínicas extra-oculares, como havia sido previamente proposto por MIRZAYANS et al (2000), mas ocasionava uma ampla variabilidade fenotípica.

Quanto à expressividade da síndrome, SUZUKI et al (2001) estudaram uma família japonesa de três gerações com oito pacientes portadores de manifestações oculares e sistêmicas e identificaram uma mutação de sentido trocado localizada próxima à primeira hélice do domínio *forkhead*. Foi então sugerido que as mutações de sentido trocado situadas nesta região poderiam resultar em um fenótipo compreendendo alterações extra-oculares, diferentemente daquelas localizadas na região da segunda e terceira hélices, como as identificadas nos estudos de NISHIMURA et al (1998) e de MEARS et al (1998), que compreenderiam fenótipos com alterações apenas oculares.

De modo geral, contudo, as mutações no gene *FOXC1* não permitem prever a presença ou não de manifestações sistêmicas na síndrome (SALEEM et al, 2003; MURPHY et al, 2004), diferentemente do gene *PITX2*, em que é possível estabelecer uma correlação genótipo/fenótipo bem definida baseada na função residual do gene (KOZLOWSKI e WALTER, 2000; PRISTON et al, 2001).

NISHIMURA et al (2001) sugeriram que pacientes com Síndrome de Axenfeld-Rieger ligada à região 6p25 e sem evidência de mutação no gene *FOXC1* poderiam ser portadores de alterações estruturais em um novo *locus* (IRID1b) que compreende os genes *FOXF2* e *FOXQ1*. A hipótese de que mutações nestes dois genes pudessem estar envolvidas na síndrome não foi confirmada, mas a identificação de duplicações e deleções intersticiais envolvendo a região 6p25 sugerem que um nível maior ou menor de atividade funcional do gene *FOXC1*, ou mesmo de outros genes adjacentes, possam estar envolvidos na manifestação clínica da síndrome (NISHIMURA et al, 2001; LEHMANN et al, 2002).

Em nosso estudo foram encontradas três alterações estruturais no gene *FOXC1*, sendo uma inserção, uma deleção e uma mutação do tipo sem sentido, nenhuma das quais previamente descritas na literatura.

A inserção de três bases (GGC) na posição 1359-1360 do gene localiza-se no segundo domínio de ativação transcricional (aminoácido 453), situado após o domínio *forkhead*, entre os aminoácidos 446 e 553, e levou à adição de um aminoácido glicina ao produto codificado. Apenas um indivíduo (caso-índice da família 5 - MCV) apresentou esta mutação, não tendo sido possível a avaliação molecular dos pais (fenotipicamente normais). Tal fato abre a possibilidade de o paciente MCV ter herdado um alelo alterado de cada um dos pais ou de ter ocorrido a deleção do alelo normal, uma vez que o seqüenciamento desta região [Figura 4] mostra apenas a seqüência com a inserção das três bases. Outras inserções de bases foram previamente descritas por NISHIMURA et al (2001) em pacientes portadores da síndrome com alterações restritas à região ocular, nos quais as inserções localizavam-se no primeiro domínio de ativação transcricional e no domínio de inibição. A inserção GGC encontrada no nosso estudo localiza-se no segundo domínio de ativação e causou manifestações oculares e sistêmicas além de alterações funcionais graves que levaram o paciente à cegueira em um dos olhos. Conforme postulado por NISHIMURA et al (2001), talvez a gravidade das manifestações clínicas esteja mais relacionada à dosagem gênica, isto é, à sua atividade funcional para mais ou para menos, do que ao tipo e localização da mutação no gene.

A deleção encontrada no nosso estudo (718-719delCT) localiza-se no domínio de inibição e foi encontrada em um único indivíduo (caso-índice da família 8 - WDC), portador de manifestações apenas oculares e com glaucoma de difícil controle, responsável por uma redução acentuada da visão em um dos olhos. Várias outras deleções já foram descritas, estando presentes em pacientes com fenótipos diversos, mas nenhuma delas situava-se no domínio de inibição [Tabela III]. Esta alteração não estava presente nos pais do paciente WDC, caracterizando uma mutação *de novo*. Tal achado sugere que a ausência de familiares com Síndrome de Axenfeld-Rieger não afasta a possibilidade de alterações estruturais no gene *FOXC1* associada à mesma.

A mutação do tipo sem sentido encontrada no nosso grupo de estudo estava presente em seis indivíduos da família 6, sendo caracterizada por uma terminação da sequência de nucleotídeos no códon 152 (Trp152STOP). Esta mutação está localizada no domínio *forkhead* do gene *FOXC1* entre as asas 1 e 2. O aminoácido triptofano nesta posição é extremamente conservado em diversas espécies, incluindo: *Danio rerio*, *Drosophila melanogaster*, *Apis mellifera*, *Fugu rubripes*, *Anopheles gambiae*, *Ratus norvegicus*, *Tetraodon nigroviridis* e *Mus musculus*. Finalizando, esta alteração leva a um truncamento da proteína a partir desta posição, o que pode caracterizar uma haploinsuficiência. Até o presente momento, tal mutação no gene *FOXC1* (Trp152STOP) não foi descrita em nenhum outro estudo e, além disso, comparadas às três outras mutações do tipo sem sentido já relatadas (MYRZAYANS et al, 2001; KOMATIREDDY et al, 2003), esta é a segunda mutação associada a manifestações extra-oculares da síndrome. Em nosso estudo, todos os indivíduos portadores da mutação Trp152STOP apresentavam a síndrome com manifestações oculares e sistêmicas. A mutação segregou concomitantemente com a doença, observando-se um padrão de transmissão autossômico dominante com alta penetrância, visto que todos os indivíduos afetados (12 indivíduos avaliados, seis afetados) apresentavam a mutação, quatro dos quais com fenótipos agressivos caracterizados por glaucoma refratário a tratamento clínico e cirúrgico e acuidade visual muito reduzida, inclusive com cegueira bilateral em um deles [Tabela VIII]. As alterações extra-oculares não causavam limitações às atividades normais dos pacientes, já que acometiam apenas as estruturas ósseas e dentárias, sem repercussões na saúde geral.

A idade de aparecimento do glaucoma é variável, mas geralmente ocorre durante a adolescência. Este início um pouco mais tardio correlaciona-se à quantidade de tecido normal presente no ângulo iridocorneano, o que possibilita a manutenção de níveis pressóricos próximos da normalidade (SMITH et al, 2000). Porém, a presença de mutações no *FOXC1* deixaria as estruturas oculares mais predispostas aos efeitos ambientais e de envelhecimento, assim como poderia causar alterações metabólicas na composição da matriz extra-celular da malha trabecular, dificultando o processo de escoamento da câmara anterior (SMITH et al, 2000). Dos pacientes afetados pelas alterações no gene *FOXC1*, seis manifestaram o glaucoma desde a infância (casos-índice das famílias 5 e 8 e quatro indivíduos da família 6), enquanto dois descobriram ser portadores já na idade adulta, sem repercussões na acuidade visual (caso-índice da família 6 [OGS] e seu irmão [RGS]).

A frequência de mutações no *FOXC1* em pacientes com Síndrome de Axenfeld-Rieger não é bem conhecida, mas MEARS et al (1998), nos Estados Unidos, encontraram uma prevalência de 20% e KOMATIREDDY et al (2003), na Índia, encontraram uma prevalência aproximada de 30% estudando pacientes com Síndrome de Axenfeld-Rieger em que as alterações estavam restritas à região ocular. No Brasil, de cinco famílias previamente estudadas do ponto de vista molecular, num total de 23 indivíduos afetados, não foi encontrada nenhuma mutação neste gene (BORGES et al, 2002), corroborando a hipótese de que, na ocorrência de manifestações extra-oculares, a frequência de mutação no gene *FOXC1* é menor (MIRZAYANS et al, 2000; HONKANEN et al, 2003). Na presença de manifestação extra-ocular da síndrome, a presença de mutação no *FOXC1* pode ser responsável por fenótipos que incluem anomalias cardíacas (TSAI e GRAJEWSKI, 1994; SWIDERSKI et al, 1999), mas não há uma correlação bem definida entre a variabilidade do fenótipo e o grau de deficiência funcional do gene (SALEEM et al, 2003; MURPHY et al, 2004) [Tabela III]. Portanto, as mutações do *FOXC1* podem resultar num amplo espectro de manifestações clínicas da síndrome que podem ser decorrentes da interferência que as mutações exercem sobre a interação de grupos celulares diferentes durante a embriogênese (MIRZAYANS et al, 2000; HONKANEN et al, 2003) sem, contudo, estabelecer um padrão associativo entre o tipo de mutação e as alterações clínicas (HONKANEN et al, 2003).

No nosso estudo, das oito famílias estudadas, foram encontradas mutações no *FOXC1* em três casos-índice, perfazendo uma frequência de 37,5%. No total do grupo de estudo, oito indivíduos apresentaram mutações no gene *FOXC1*, dos quais seis eram pertencentes à família 6. Apenas um indivíduo (caso-índice da família 8 - WDC) era portador da síndrome com manifestações restritas à região ocular. Pelo fato das mutações encontradas no gene *FOXC1* estarem presentes em regiões funcionalmente importantes, não foi realizado rastreamento de mutações neste gene em grupo controle. Entretanto, seria interessante realizá-lo, principalmente para avaliar a alteração estrutural identificada no indivíduo MCV (caso índice 5).

4.4 - Mutações no Gene *GJA1*

A passagem de íons e de pequenas moléculas entre as células ocorre através de junções do tipo fenda (*gap junctions*), as quais são encontradas em todos os organismos multicelulares desde o período de desenvolvimento embrionário (BECKER et al, 1995).

As junções do tipo fenda são formadas por uma família de proteínas chamadas conexinas, que além de permitirem a comunicação intercelular, têm a capacidade intrínseca de regular a expressão de genes envolvidos no crescimento e diferenciação celular (LECANDA et al, 1998).

No olho, a comunicação direta entre as junções do tipo fenda é responsável pelo transporte de metabólitos essenciais ao cristalino (BECKER et al, 1995), estrutura que expressa principalmente as conexinas 46 e 50 e exerce função primordial no desenvolvimento do estroma e endotélio corneanos (estruturas derivadas da crista neural) além de contribuir, em menor importância, para a formação do epitélio da córnea (BEEBE e COATS, 2000).

O cristalino é capaz de produzir o Fator de Crescimento Tecidual fração alfa ("*Tissue Growth Factor*" - TGF α) e o Fator de Crescimento Endotelial ("*Endotelial Growth Factor*" - EGF), capazes de regular tanto a formação do endotélio corneano como da câmara anterior do olho (BEEBE e COATS, 2000; RENEKER et al,

2000). A expressão acima dos níveis normais de TGF α pelo cristalino pode causar uma alteração no desenvolvimento normal das células mesenquimais que migram para o olho durante a morfogênese (DECSI et al, 1994; RENEKER et al, 1995). A expressão de TGF α em altas concentrações pelo cristalino induz as células do mesênquima periocular a migrarem para a região intraocular ao redor do cristalino, podendo ocasionar microftalmia e displasia retiniana (RENEKER et al, 1995). Da mesma forma, concentrações de EGF acima do normal também são responsáveis por alterações na diferenciação celular das estruturas oculares anteriores. A expressão aumentada destes dois fatores causa uma diferenciação defeituosa do endotélio corneano e malformação da câmara anterior. A ausência do endotélio corneano associa-se, provavelmente, a defeitos secundários nas estruturas oculares anteriores, incluindo adesões iridocorneanas, edema estromal de córnea e diferenciação anormal do epitélio corneano (RENEKER et al, 2000).

Por outro lado, a molécula de adesão celular chamada N-caderina expressa-se por sinais enviados pelo epitélio do cristalino durante a formação do endotélio corneano (BEEBE e COATS, 2000). A N-caderina promove firme adesão intercelular e possivelmente contribui para a estruturação da camada endotelial da córnea. A contínua expressão de N-caderina no endotélio da córnea contribui para que uma barreira de permeabilidade seletiva seja formada nesta região, regulando a hidratação do estroma, e permite que o endotélio se mantenha não-aderente, impedindo que a íris e o cristalino entrem em contato com a matriz extracelular do estroma corneano (RENEKER et al, 2000).

Talvez por inibirem diretamente a diferenciação endotelial quando em concentrações acima do normal, TGF α e EGF possuam a capacidade de inibir também a expressão da N-caderina no endotélio corneano. Além disso, é passível de especulação que tanto o TGF α quanto o EGF possam estimular o mesênquima periocular, onde os genes *Mf1* (análogo murino do *FOXC1* humano) e *Pitx2* (análogo murino do *PITX2* humano) estão expressos, antes da diferenciação do endotélio corneano e assim causar uma disfunção na expressão destes genes, o que causaria malformações no segmento anterior do olho (RENEKER et al, 2000).

Em suma, o cristalino, fonte importante de expressão de conexinas, é capaz de induzir a formação das células endoteliais da córnea pela ação equilibrada de TGF α , EGF e N-caderina, determinando a diferenciação de células derivadas da crista neural na formação do segmento anterior do olho (BEEBE e COATS, 2000). Defeitos na diferenciação resultantes do desequilíbrio entre estes fatores resultam em alterações, dentre outras, do ângulo iridocorneano, com manifestações semelhantes àsquelas observadas na Síndrome de Axenfeld-Rieger.

A primeira alteração descrita na conexina 43 relacionava-se a defeitos cardíacos (REAUME et al, 1995), tendo sido observado que células da crista neural migravam para a região de desenvolvimento e diferenciação do músculo cardíaco juntamente com junções do tipo fenda formadas por conexina 43 (MASCHHOFF e BALDWIN, 2000).

O gene codificador da conexina 43 humana, *GJAI*, foi identificado por PAZNEKAS et al (2003) como responsável pela Displasia Oculodentodigital (DODD), síndrome de transmissão autossômica dominante com alta penetrância e variabilidade fenotípica. Esta síndrome caracteriza-se por uma grande diversidade de manifestações clínicas, envolvendo alterações oculares (atrofia de íris, iridosquise, catarata, glaucoma, atrofia de nervo óptico, hipervascularização do disco óptico, microftalmia, microcórnea, estrabismo, nistagmo, ambliopia, diminuição da fissura palpebral e persistência de membrana pupilar), alterações dentárias (microdontia, hipoplasia do esmalte, hipodontia), alterações ósseas (sindactilia dos dedos das mãos e pés e aplasia ou hipoplasia das falanges médias e de ossos tubulares, hipo ou hipertelorismo, afilamento nasal, fenda palatina, hiperostose craniana e mandibular e microcefalia) e alterações neurológicas (disartria, bexiga neurogênica, paresia espástica, ataxia, surdez sensorial e convulsão).

Mutações no gene *GJAI* podem ter consequências funcionais variadas. Em geral, a deleção de apenas uma cópia do gene não é suficiente para causar alterações morfofuncionais, mas quando ambas as cópias sofrem deleção, pode haver falência na formação do conexon ou a formação de um conexon mutante disfuncional, no qual as propriedades de condução, fosforilação e permeabilidade iônica podem estar afetadas, resultando tanto em perda como em ganho de função (PAZNEKAS et al, 2003).

As manifestações oculares na vigência de mutações no *GJA1* compreendem principalmente alterações nas estruturas do segmento anterior, como córnea e cristalino, alterações de estroma iriano, atrofia do nervo óptico e glaucoma, que podem fazer parte da Displasia Oculodentodigital (PAZNEKAS et al, 2003). Algumas destas alterações assemelham-se àquelas da Síndrome de Axenfeld-Rieger, principalmente as localizadas no estroma iriano e as que comprometem os dentes e ossos faciais, a partir do que é possível inferir que defeitos na formação do cristalino e da córnea também podem causar alterações características da Síndrome de Axenfeld-Rieger (LINES et al, 2002).

Em nosso grupo de estudo foi encontrada uma mutação do tipo sentido trocado (Ala253Val) em três indivíduos da família 6, sendo que um deles não apresentava a síndrome e os outros dois a apresentavam de forma menos agressiva quando comparados aos demais familiares portadores da doença, mesmo com a presença concomitante da mutação no gene *FOXC1* (Trp152STOP). Esta mutação Ala253Val não foi observada no grupo controle. A mutação encontrada no gene *GJA1* localiza-se no citoplasma, próximo à porção C-terminal que, caracteristicamente, apresenta uma grande variabilidade tanto entre as conexinas da mesma espécie quanto entre conexinas de espécies diferentes. A porção C-terminal exerce função na fosforilação de quinases e na adesão intercelular através de complexos formados com junções compactas (TOYOFUKU et al, 1998; GIEPMANS e MOOLENAR, 1998). Alterações nesta região poderiam interferir com a função exercida pela porção C-terminal da conexina 43.

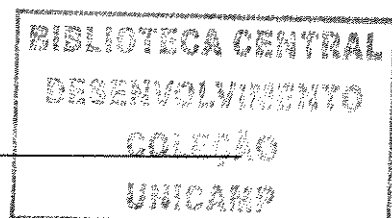
Nos dois pacientes portadores da mutação Ala253Val associada à síndrome, o glaucoma foi diagnosticado na idade adulta, com preservação da acuidade visual e controle adequado da pressão ocular com apenas uma medicação hipotensora, sugerindo um fenótipo menos grave. Apesar disso, estes indivíduos também apresentavam alterações extra-oculares como malformações dentárias e dos ossos faciais, além de baixa estatura. As características clínicas e os antecedentes familiares excluíram a possibilidade de se tratar de DODD.

A ausência de manifestações fenotípicas em um dos indivíduos portador da mutação Ala253Val pode-se dever a um mecanismo compensatório de função proporcionado pela diversidade de tipos celulares que expressam mais de um tipo de

conexina, o que causa uma redundância de ações com conseqüente atenuação do déficit funcional do gene *GJAI* (WILLECKE et al, 2002).

Este estudo identificou uma nova mutação no gene *GJAI* (Ala253Val), localizada numa região não-conservada e, pela primeira vez, sugere-se a possibilidade de associação deste gene à Síndrome de Axenfeld-Rieger. É possível que a presença desta mutação específica no *GJAI* tenha exercido uma função modificadora, atenuando o fenótipo resultante da mutação concomitante no gene *FOXC1* por meio de um mecanismo ainda desconhecido. Apesar de existirem evidências de que fatores de transcrição ativam a expressão de conexinas (BONDURANG et al, 2001) e de que as junções do tipo fenda formadas pela conexina 43 são capazes de modular a transcrição de alguns genes envolvidos na osteogênese (STAINS et al, 2003), estudos mais específicos são necessários para determinar se realmente existe uma associação entre os genes *FOXC1* e *GJAI* e se cabe a este último alguma função na etiopatogênese da Síndrome de Axenfeld-Rieger.

Permanece intrigante, contudo, o fato de que a maior parte dos nossos pacientes clinicamente afetados não apresentaram mutações em nenhum dos três genes pesquisados. Espera-se que o estudo contínuo das bases moleculares da Síndrome de Axenfeld-Rieger permita, no futuro, a descoberta de novos genes ou *loci* a ela associados ou que confirme em definitivo aqueles já descritos (gene *PAX6*, *locus* 13q14 [RIEG2] e *locus* 16q24), possibilitando uma melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos nesta doença.



5 - CONCLUSÕES

- a) Não foram encontradas alterações estruturais no gene *PITX2* em oito famílias brasileiras com Síndrome de Axenfeld-Rieger associada a glaucoma. As frequências de alterações estruturais na sequência dos genes *FOXC1* e *GJAI* foram de 37,5% e de 12,5%, respectivamente, sendo esta última em associação à síndrome;
- b) As mutações identificadas foram: 1359-1360insGGC, 718-719delCT e Trp152STOP no gene *FOXC1* e Ala253Val no gene *GJAI*, todas relatadas pela primeira vez;
- c) Pacientes com Síndrome de Axenfeld-Rieger portadores de alterações estruturais no gene *FOXC1* apresentaram glaucoma de desenvolvimento mais precocemente e maior necessidade de procedimento cirúrgico para controle da pressão ocular quando comparados a indivíduos sem mutações no gene *FOXC1*;
- d) A existência de mutação no gene *GJAI* em pacientes com Síndrome de Axenfeld-Rieger e glaucoma foi relatada pela primeira vez. A presença concomitante de alterações nos genes *GJAI* e *FOXC1* nos indivíduos desta família resultou num fenótipo menos grave da síndrome quando comparado àquele de indivíduos da mesma família com alteração exclusivamente no gene *FOXC1*, sugerindo uma possível função protetora desta mutação sobre o gene *FOXC1*;
- e) Entre as oito famílias com Síndrome de Axenfeld-Rieger, uma (12,5%) apresentou padrão de herança autossômico dominante. Nesta família, a mutação Trp152STOP no gene *FOXC1* apresentou segregação concomitante e penetrância completa com a síndrome.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKAZAWA, K.; YAMAME, S.; SHIOTA, H.; NAITO, E. A case of retinoblastoma associated with Rieger's anomaly and 13q deletion. **Jpn J Ophthalmol**, 25: 321-5, 1981.
- ALKEMADE, P. P. H. **Dysgenesis mesodermalis of the iris and cornea**. Assen, The Netherlands: Van Gorcum ad Comp NV, 1969.
- ALWARD, W. L. M.; SEMINA, E. V.; KALENAK, J. W.; HÉON, E.; SHETH, B. P., STONE, E. M. et al. Autosomal dominant iris hypoplasia is caused by a mutation in the Rieger syndrome (RIEG/PITX2) gene. **Am J Ophthalmol**, 125: 98-100, 1998.
- ALWARD, W. L. M. Axenfeld-Rieger syndrome in the age of molecular genetics. **Am J Ophthalmol**, 130: 107-15, 2000.
- AMENDT, B. A.; SUTHERLAND, L. B.; RUSSO, A. F. Multifunctional role of the Pitx2 homeodomain protein C-terminal tail. **Mol Cell Biol**, 19: 7001-10, 1999.
- AMENDT, B. A.; SUTHERLAND, L. B.; SEMINA, E. V.; RUSSO, A. F. The molecular basis of Rieger syndrome. Analysis of PITX2 homeodomain protein activities. **J Biol Chem**, 273: 20066-72, 1998.
- ANDERSON, D. R. The development of the trabecular meshwork and its abnormality in primary infantile glaucoma. **Trans Am Ophthalmol Soc**, 79: 458-85, 1981.
- ARAKAWA, H.; NAKAMURA, T.; ZHADANOV, A. B.; FIDANZA, V.; YANO, T.; BULLRICH, R. et al. Identification and characterization of the ARP1 gene, a target for the human acute leukemia ALL1 gene. **Proc Natl Acad Sci USA**, 95: 4573-8, 1998.
- AWAN, K. J. Peters-Rieger's syndrome. **J Pediatr Ophthalmol**, 14: 112-6, 1977.
- BECKER, D. L.; EVANS, W. H.; GREEN, C. R.; WARNER, A. Functional analysis of amino acid sequences in connexin 43 involved in intercellular communication through gap junctions. **J Cell Sci**, 108: 1455-67, 1995.
- BEEBE, D. C.; COATS, J. M. The lens organizes the anterior segment: specification of neural crest cell differentiation in the avian eye. **Dev Biol**, 220: 424-31, 2000.

- BERRY, F. B.; SALEEM, R. A.; WALTER, M. A. FOXC1 transcriptional regulation is mediated by N- and C-terminal activation domains and contains a phosphorylated transcriptional inhibitory domain. **J Biol Chem**, 277: 10292-7, 2002.
- BOEL, M.; TIMMERMANS, J.; EMMERY, L.; DRALANDS, G.; FRYNS, J.P.; Van den BERGHE, H. Primary mesodermal dysgenesis of the cornea (Peters' anomaly) in two brothers. **Hum Genet**, 51: 237-40, 1979.
- BONDURAND, N.; GIRARD, M.; PINGAULT, V.; LEMORT, N.; DUBOURG, O.; GOOSSENS, M. Human connexin 32, a gap junction protein altered in the X-linked form of Charcot-Marie-Tooth disease, is directly regulated by the transcription factor SOX10. **Hum Mol Genet**, 10: 2783-95, 2001.
- BORGES, A. S.; SUSANNA-JUNIOR, R.; CARANI, J. C. E.; BETINJANE, A. J.; ALWARD, W. L. M.; STONE, E. M. et al. Genetic analysis of PITX2 and FOXC1 in Rieger syndrome patients from Brazil. **J Glaucoma**, 11: 51-6, 2002.
- BROOKS, B. P.; MOROI, S. E.; DOWNS, C. A.; WILTSE, S.; OTHMAN, M. I.; SEMINA, E. V. et al. A novel mutation in the PITX2 gene in a family with Axenfeld-Rieger syndrome. **Ophthalmic Genet**, 25: 57-62, 2004.
- CHOSAK, A.; ROSENZWEIG, K. A. Oligodontia associated with defects of the eyes. **Oral Surg**, 21: 354-7, 1966.
- CIVITELLI, R.; BEYER, E. C.; WARLOW, P. M.; ROBERTSON, A. J.; GEIST, S. T.; STEINBERG, T. H. Connexin 43 mediates direct intercellular communication in human osteoblastic cell networks. **J Clin Invest**, 91: 1888-96, 1993.
- COOPER, G. M. A superfície celular. In: COOPER, G.M. **A célula**. Uma abordagem molecular. 2 ed. Porto Alegre: Artmed; 2001. p. 534-42.
- CROSS, H. E.; MAUMENEE, A. E. Progressive spontaneous dissolution of the iris. **Surv Ophthalmol**, 18: 186-99, 1973.
- CROSS, H. E.; JORGENSEN, R. J.; LEVIN, L. S.; KELLY, T. E. The Rieger syndrome: an autosomal dominant disorder with ocular, dental and systemic abnormalities. **Perspect Ophthalmol** 3: 3-16, 1979.

- CUNNINGHAM Jr, E. T.; ELIOTT, D.; MILLER, N. R.; MAUMENEE, I. H.; GREEN, W. R. Familial Axenfeld-Rieger anomaly, atrial septal defect and sensorineural hearing loss: a possible new genetic syndrome. **Arch Ophthalmol**, 116: 78-82, 1998.
- DARK, A. J.; KIRKHAM, T. H. Congenital corneal opacities in a patient with Rieger's anomaly and Down's syndrome. **Br J Ophthalmol**, 52:631-5, 1968.
- DATSON, N. A.; SEMINA, E.; van STAALDUINEN, A. A.; DAUWERSE, H. G.; MEERSHOEK, E. J.; HEUS, J. J. et al. Closing in on the Rieger syndrome gene on 4q25: mapping translocation breakpoints within a 50 kb region. **Am J Hum Genet**, 59: 1297-305, 1996.
- De HAUWERE, R. C.; LEROY, J. G.; ADRIAENSSENS, K.; Van HEULE, R. Iris dysplasia, orbital hypertelorism and psychomotor retardation: a dominant inherited developmental syndrome. **J Pediatrics**, 82: 679-81, 1973.
- DECSI, A.; PEIFFER, R. L.; QIU, T.; LEE, D. C.; FRIDAY, J. T.; BAUTCH, V. L. Lens expression of TGF alpha in transgenic mice produces two distinct eye pathologies in the absence of tumors. **Oncogene**, 9: 1965-75, 1994.
- DOWARD, W.; PERVEEN, R.; LLOYD, I. C.; RIDGWAY, A. E.; WILSON, L.; BLACK, G. C. A mutation in the RIEG1 gene associated with Peters' anomaly. **J Med Genet**, 36: 152-5, 1999.
- EDWARDS, W. C.; TORCZYNSKI, E. Neural crest cell behavior and facial anomalies. **Perspect Ophthalmol**, 5: 47-50, 1981.
- ELFGANG, C.; ECKERT, R.; LICHTENBERG-FRATE, H.; BUTTERWECK, A.; TRAUB, O.; KLEIN, R. A. et al. Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells. **J Cell Biol**, 129: 805-17, 1995.
- ESPINOZA, H. M.; COX, C. J.; SEMINA, E. V.; AMENDT, B. A. A molecular basis for differential developmental anomalies in Axenfeld-Rieger syndrome. **Hum Mol Genet**, 11: 743-53, 2002.

- FANG, J.; DAGENAIS, S. L.; ERICKSON, R. P.; ARLT, M. F.; GLYNN, M. W.; GORSKI, J. L. et al. Mutations in FOXC2 (MFH-1), a forkhead family transcription factor, are responsible for the hereditary lymphedema-distichiasis syndrome. **Am J Hum Genet**, 67: 1382-8, 2000.
- FEINGOLD, M.; SHIERE, F.; FOGELS, H. R.; DONALDSON, D. Rieger's syndrome. **Pediatrics**, 44: 564-9, 1969.
- FERGUSON Jr, J. G.; HICKS, E. L. Rieger's anomaly and glaucoma associated with partial trisomy 16q Case report. **Arch Ophthalmol**, 105: 323, 1987.
- FLOMEN, R. H.; GORMAN, P. A.; VATCHEVA, R.; GROET, J.; BARISIC, I.; LIGUTIC, I. et al. Rieger syndrome locus: a new reciprocal translocation t (4;12) (q25;q15) and a deletion del (4) (q25q27) both break between markers D4S945 and D4S193. **J Med Genet**, 34: 191-5, 1997.
- FLOMEN, R. H.; VATCHEVA, R.; GORMAN, P. A.; BAPTISTA, P. R.; GROET, J.; BARISIC, I. et al. Construction and analysis of a sequence-ready map in 4q25: Rieger syndrome can be caused by haploinsufficiency of RIEG, but also by chromosome breaks ~ 90 kb upstream of this gene. **Genomics**, 47: 409-13, 1998.
- GAGE, P. J.; CAMPER, S. A. Pituitary homeobox 2, a novel member of the bicoid-related family of homeobox genes, is a potential regulator of anterior structure formation. **Hum Mol Genet**, 6: 457-64, 1997.
- GEHRING, W. J.; QIAN, Y. Q.; BILLETER, M.; TOKUNAGA, K. F.; SCHIER, A. F.; PEREZ, D. R. et al. Homeodomain-DNA recognition. **Cell**, 78: 211-23, 1994.
- GIEPMANS, B. N. G.; MOOLENNAR, W. H. The gap junction protein connexin 43 interacts with the second PDZ domain of the zona occludens-1 protein. **Curr Biol**, 8: 931-4: 1998.
- GLADWIN, A.; DONNAI, D.; METCALFE, K.; SCHRANDER-STUMPEL, C.; BRUETON, L.; VERLOES, A. et al. Localization of a gene for Oculodentodigital syndrome to human chromosome 6q22-q24. **Hum Mol Genet**, 6: 123-7, 1997.

- GLASER, T.; WALTON, D. S.; MAAS, R. L. Genomic structure, evolutionary conservation and aniridia mutations in the human PAX6 gene. **Nat Genet**, 2: 232-9, 1992.
- GLASER, T.; JEPEAL, L.; EDWARDS, J. G.; YOUNG, S.R.; FAVOR, J.; MAAS, R. L. PAX6 gene dosage effect in a family with congenital cataracts, aniridia, anophthalmia and central nervous system defects. **Nat Genet**, 7: 463-71, 1994.
- GOULD, D. B.; MEARS, A. J.; PEARCE, W. G.; WALTER, M. A. Autosomal dominant Axenfeld-Rieger anomaly maps to 6p25. **Am J Hum Genet**, 61: 765-8, 1997.
- GRØNSKOV, K.; ROSENBERG, T.; SAND, A.; BRØNDUM-NIELSEN, K. Mutational analysis of PAX6: 16 novel mutations including 5 missense mutations with a mild aniridia phenotype. **Eur J Hum Genet**, 7: 274-86, 1999.
- GREHN, F.; MACHENSEN, G. Rieger's anomaly with signs of hydrophthalmia and spontaneous pressure regulation. **Klin Monatsbl Augenheilkd**, 181: 197-201, 1982.
- HANES, S. D.; BRENT, R. DNA specificity of the bicoid activator protein is determined by homeodomain recognition helix residue 9. **Cell**, 57: 1275-83, 1989.
- HANES, S. D.; RIDDIHOUGH, G.; ISH-HOROWICZ, D.; BRENT, R. Specific DNA recognition and intersite spacing are critical for action of the bicoid morphogen. **Mol Cell Biol**, 14: 3364-75, 1994.
- HANSON, I. M.; SEAWRIGHT, A.; HARDMAN, K.; HODGSON, S.; ZALETAYEV, D.; FEKETE, G. et al. PAX6 mutations in aniridia. **Hum Mol Genet**, 2: 915-920, 1993.
- HANSON, I. M.; FLETCHER, J.; JORDAN, T.; BROWN, A.; TAYLOR, D.; ADAMS, R. J. et al. Mutations at the PAX6 locus are found in heterogeneous anterior segment malformations including Peter's anomaly. **Nat Genet**, 6: 168-73, 1994.
- HANSSON, H. A.; JERNDAL, T. Scanning electron microscopy studies on the development of the iridocorneal angle in human eyes. **Invest Ophthalmol**, 10: 252-65, 1971.
- HAY, E. D. Development of the vertebrate cornea. **Internat Rev Cytol**, 63: 263-322, 1980.

- HEINEMANN, M.; BERG, R.; COTLIER, E. Rieger's syndrome with pericentric inversion of chromosome 6. **Br J Ophthalmol**, 63: 40-4, 1979.
- HENKIND, P.; FRIEDMAN, A. H. Iridogoniodysgenesis with cataract. **Am J Ophthalmol**, 72: 949-54, 1971.
- HERVÉ, J.; WARNET, J. F.; JEANEAU-BELLEGO, E.; PORTNOI, M. F.; TAILLEMITTE, J. L.; HERVÉ, R. Monossomie partielle du bras court d'un chromosome 10, associée a un syndrome de Rieger et a un déficit immunitaire partiel, type DiGeorge. **Ann Pediatr**, 31: 77-80, 1984.
- HOLMSTROM, G.E.; REARDON, W.P.; BARAITSER, M.; ELSTON, J.S.; TAYLOR, D.S. Heterogeneity in dominant anterior segment malformations. **Br J Ophthalmol**, 75: 591-7, 1991.
- HONKANEN, R. A.; NISHIMURA, D. Y.; SWIDERSKI, R. E.; BENNET, S. R.; HONG, S.; KWON, Y. H. et al. A family with Axenfeld-Rieger syndrome and Peters anomaly caused by a point mutation (Phe112Ser) in the FOXC1 gene. **Am J Ophthalmol**, 135:368-75, 2003.
- JAMIESON, R. V.; PERVEEN, R.; KERR, B.; CARETTE, M.; YARDLEY, J.; HEON, E. et al. Domain disruption and mutation of the bZIP transcription factor, MAF, associated with cataract, ocular anterior segment dysgenesis and coloboma. **Hum Mol Genet**, 11: 32-42, 2000.
- JERNDAL, T.; HANSSON, H. A.; BILL, A. **Goniodysgenesis**. A new perspective on glaucoma. Copenhagen: Scriptor, 1978.
- JOHNSTON, M. C.; BHAKDINARONK, A.; REID, Y. C. An expanded role of the neural crest in oral and pharyngeal development. In: BOSMA, J.F. **Fourth symposium on oral sensation and perception**. Washington: US Government Printing Office, 1973. p. 37-52.
- JORDAN, T.; EBENEZER, N.; MANNERS, R.; MCGILL, J.; BHATTACHARYA, S. Familial glaucoma iridogoniodysplasia maps to a 6p25 region implicated in primary congenital glaucoma and iridogoniodysgenesis anomaly. **Am J Hum Genet**, 61: 882-8, 1997.

- JORGENSEN, R. J.; LEVIN, L. S.; CROSS, H. E.; YODER, F.; KELLY, T. E. The Rieger syndrome. **Am J Med Genet**, 2: 307-18, 1978.
- KANSKI, J. J. **Clinical ophthalmology: a systematic approach**. 3 ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1998. p. 267-73.
- KAUFMAN, E.; KNOCHEL, W. Five years on the wings of fork head. **Mech Dev**, 57: 3-20, 1996.
- KELSELL, D. P.; DUNLOP, J.; HODGINS, M. B. Human diseases: clues to cracking the connexin code. **Trends Cell Biol**, 11: 2-6, 2001.
- KISSINGER, C. R.; LIU, B. S.; MARTIN-BLANCO, E.; KORNBERG, T. B.; PABO, C. O. Crystal structure of an engrailed homeodomain-DNA complex at 2.8 Å resolution: a framework for understanding homeodomain-DNA interactions. **Cell**, 63: 579-90, 1990.
- KLEINMAN, R. E.; KAZARIAN, E. L.; RAPTOPOULOS, V.; BRAVERMAN, L. E. Primary empty sella and Rieger's anomaly of the anterior chamber of the eye: a familial syndrome. **N Eng J Med**, 304: 90-3, 1981.
- KOMATIREDDY, S.; CHAKRABARTI, S.; MANDAL, A. K.; REDDY, A. B. M.; SAMPATH, S.; PANICKER, S. G. et al. Mutation spectrum of FOXC1 and clinical genetic heterogeneity of Axenfeld-Rieger anomaly in India. **Mol Vis**, 9: 43-8, 2003.
- KOZLOWSKI, K.; WALTER, M. A. Variation in residual PITX2 activity underlies the phenotypic spectrum of anterior segment developmental disorders. **Hum Mol Genet**, 9: 2131-9, 2000.
- KRUTOVSKIKH, V.; YAMASAKI, H. Connexin gene mutations in human genetic diseases. **Mut Res**, 462: 197-207, 2000.
- KULAK, S. C.; KOZLOWSKI, K.; SEMINA, E. V.; PEARCE, W. G.; WALTER, M. A. Mutation in the RIEG1 gene in patients with iridogoniodysgenesis syndrome. **Hum Mol Genet**, 7: 1113-7, 1998.
- LANGMAN, J. **Medical embryology**. 4 ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1981. p. 93.

- LARSSON, C.; HELLQVIST, M.; PIERROU, S.; WHITE, I.; ENERBACK, S.; CARLSSON, P. Chromosomal localization of six human forkhead genes, freac-1 (FKHL5), -3 (FKHL7), -4 (FKHL8), -5 (FKHL9), -6 (FKHL10) and -8 (FKHL12). **Genomics**, 30: 464-9, 1995.
- LECANDA, F.; TOWLER, D. A.; ZIAMBARAS, K.; CHENG, S. L.; KOVAL, M.; STAINBERG, T. H. et al. Gap junctional communication modulates gene expression in osteoblastic cells. **Mol Biol Cell**, 9: 2249-58, 1998.
- LECANDA, F.; WARLOW, P. M.; SHEIKH, S.; FURLAN, F.; STEINBERG, T. H.; CIVITELLI, R. Connexin 43 deficiency causes delayed ossification, craniofacial abnormalities, and osteoblast dysfunction. **J Cell Biol**, 151: 931-43, 2000.
- LEGIUS, E.; de DIE-SMULDERS, C. E.; VERBRAAK, F.; HABEX, H.; DECORTE, R.; MARYNEN, P. et al. Genetic heterogeneity in Rieger eye malformation. **J Med Genet**, 31: 340-1, 1994.
- LEHMANN, O. J.; EBENEZER, N. D.; JORDAN, T.; FOX, M.; OCAKA, L.; PAYNE, A. et al. Chromosomal duplication involving the forkhead transcription factor gene FOXC1 causes iris hypoplasia and glaucoma. **Am J Hum Genet**, 67: 1129-35, 2000.
- LEHMANN, O. J.; EBENEZER, N. D.; EKONG, R.; OCAKA, L.; MUNGALL, A.J.; FRASER, S. et al. Ocular developmental abnormalities and glaucoma associated with interstitial 6p25 duplications and deletions. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, 43: 1843-9, 2002.
- LIGUTIC, I.; BRECEVIC, L.; PETKOVIC, I.; KALOGJERA, T.; RAJIC, Z. Interstitial deletion 4q and Rieger syndrome. **Clin Genet**, 20: 323-7, 1981.
- LINES, M. A.; KOZLOWSKI, K.; WALTER, M. A. Molecular genetics of Axenfeld-Rieger malformations. **Hum Mol Genet**, 11: 1177-84, 2002.
- LINES, M. A.; KOZLOWSKI, K.; KULAK, S. C.; ALINGHAM, R. R.; HÉON, E.; RITCH, R. et al. Characterization and prevalence of PITX2 microdeletions and mutations in Axenfeld-Rieger malformations. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, 45: 829-33, 2004.

- LOGAN, M.; PAGAN-WESTPHAL, S. M.; SMITH, D. M.; PAGANESSI, L.; TABIN, C. J. The transcription factor Pitx2 mediates situs-specific morphogenesis in response to left-right asymmetric signals. **Cell**, 94: 307-17, 1998.
- LUBIN, J. R. Oculocutaneous albinism associated with corneal mesodermal dysgenesis. **Am J Ophthalmol**, 91: 347-50, 1981.
- LUNTZ, M. H. Congenital, infantile and juvenile glaucomas. **Ophthalmology**, 86: 793-802, 1979.
- MACDONALD, I. M.; TRAN, M.; MUSARELLA, M.A. Ocular genetics: current understanding. **Surv Ophthalmol**, 49: 159-96, 2004.
- MAKITA, Y.; MASUNO, M.; IMAIZUMI, K.; YAMASHITA, S.; OHBA, S.; ITO, D. et al. Rieger syndrome with de novo reciprocal translocation t(1;4)(q23.1-5). **Am J Med Genet**, 57: 19-21, 1995.
- MASCHHOFF, K. L.; BALDWIN, H. S. Molecular determinants of neural crest migration. **Am J Med Genet**, 97:280-8, 2000.
- MEARS, A. J.; JORDAN, T.; MIRZAYANS, F.; DUBOIS, S.; KUME, T.; PARLEE, M. et al. Mutations of the forkhead/winged-helix gene, FKHL7, in patients with Axenfeld-Rieger Anomaly. **Am J Hum Genet**, 63: 1316-28, 1998.
- MEARS, A. J.; MIRZAYANS, F.; GOULD, D. B.; PEARCE, W. G.; WALTER, M. A. Autosomal dominant iridogoniodysgenesis anomaly maps to 6p25. **Am J Hum Genet**, 59:1321-7, 1996.
- MIRZAYANS, F.; MEARS, A. J.; GUO, S. W.; PEARCE, W. G.; WALTER, M. A. Isolation of the chromosomal region containing the iridogoniodysgenesis anomaly locus by genomic mismatch scanning. **Am J Hum Genet**, 61: 111-19, 1997.
- MIRZAYANS, F.; GOULD, D. B.; HÉON, E.; BILLINGSLEY, G. D.; CHEUNG, J. C.; MEARS, A. J. et al. Axenfeld-Rieger syndrome resulting from mutation of the FKHL7 gene on chromosome 6p25. **Eur J Hum Genet**, 8: 71-4, 2000.

MORTEMOSQUE, B.; AMATI-BONNEAU, P.; COUTURE, F.; GRAFFAN, R.; DUBOIS, S.; COLIN, J. et al. Axenfeld-Rieger anomaly – a novel mutation in the Forkhead Box C1 (FOXC1) gene in a 4-generation family. **Arch Ophthalmol**, 122: 1527-33, 2004.

MORISSETTE, J.; FALARDEAU, P.; DUBOIS, S. A common gene for developmental and familial open-angle glaucomas confined on chromosome 6p25. **Am J Hum Genet, Suppl**, 61: A286, 1997.

MOTEGI, T.; NAKAMURA, K.; TERAOKAWA, T.; OOHIRA, A.; MINODA, K.; KISHI, K. et al. Deletion of a single chromosome band 4q26 in a malformed girl: exclusion of Rieger syndrome associated gene(s) from the 4q26 segment. **J Med Genet**, 25: 628-30, 1988.

MURPHY, T. C.; SALEEM, R. A.; FOOTZ, T.; RITCH, R.; MCGILLIVRAY, B.; WALTER, M. A. The wing 2 region of the FOXC1 forkhead domain is necessary for normal DNA-binding and transactivation functions. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, 45: 2531-8, 2004.

MURRAY, J. C.; BENNET, S. R.; KWITEK, A. E.; SMALL, K. W.; SCHINZEL, A.; ALWARD, W. L. M. et al. Linkage of Rieger syndrome to the region of the epidermal growth factor gene on chromosome 4. **Nat Genet**, 2: 46-9, 1992.

MURRAY, J. C.; EL-SHANTL, H.; LINDGREN, C.; LEYSENS, N.; PATIL, S.; ZABEL, B. et al. Combined mapping approaches to Rieger syndrome. **Am J Hum Genet**, 53: 141, 1993.

NISHIMURA, D. Y.; SWIDERSKI, R. E.; ALWARD, W. L. M.; SEARBY, C. C.; PATIL, S. R.; BENNET, S. R. et al. The forkhead transcription factor gene FKHL7 is responsible for glaucoma phenotypes which map to 6p25. **Nat Genet**, 19: 140-7, 1998.

NISHIMURA, D. Y.; SEARBY, C. C.; ALWARD, W. L. M.; WALTON, D.; CRAIG, J. E.; MACKEY, D. A. et al. A spectrum of FOXC1 mutations suggests gene dosage as a mechanism for developmental defects of the anterior chamber of the eye. **Am J Hum Genet**, 68: 364-72, 2001.

- PANICKER, S. G.; SAMPATH, S.; MANDAL, A. K.; REDDY, A. B. M.; AHMED, N.; HASNAIN, S. Novel mutation in FOXC1 wing region causing Axenfeld-Rieger anomaly. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, 43: 3613-6, 2002.
- PAZNEKAS, W. A.; BOYADJIEV, S. A.; SHAPIRO, R. E.; DANIELS, O.; WOLLNIK, B.; KEEGAN, C. E. et al. Connexin 43 (GJA1) mutations cause the pleiotropic phenotype of oculodentodigital dysplasia. **Am J Hum Genet**, 72: 408-18, 2003.
- PERVEEN, R.; LLOYD, I. C.; CLAYTON-SMITH, J.; CHURCHILL, A.; van HEYNINGEN, V.; HANSON, I. et al. Phenotypic variability and asymmetry of Rieger syndrome associated with PITX2 mutations. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, 41: 2456-60, 2000.
- PHILLIPS, J. C.; del BONO, E. A.; HAINES, J. L.; PRALEA, A. M.; COHEN, J. S.; GREFF, L. J. et al. A second locus for Rieger syndrome maps to chromosome 13q14. **Am J Hum Genet**, 59: 613-9, 1996.
- PHILLIPS, J. C. Four novel mutations in the PITX2 gene in patients with Axenfeld-Rieger Syndrome. **Ophthalmic Res**, 34: 324-6, 2002.
- PIERROU, S.; HELLQVIST, M.; SAMUELSSON, L.; ENERBACK, S.; CARLSSON, P. Cloning and characterization of seven human forkhead proteins: binding site specificity and DNA bending. **EMBO J**, 13: 5002-12, 1994.
- PLANQUE, N.; LECONTE, L.; COQUELLE, F. M.; BENKHELIFA, S.; MARTIN, P.; FELDER-SCHMITTBUHL, M. P. et al. Interaction of Maf transcription factors with Pax-6 results in synergistic activation of the glucagons promoter. **J Biol Chem**, 276: 35751-60, 2001.
- PRISTON, M.; KOZLOWSKI, K.; GILL, D.; LEWIN, K.; BUYS, Y.; LEVIN, A. V. et al. Functional analyses of two newly identified PITX2 mutants reveal a novel molecular mechanism for Axenfeld-Rieger syndrome. **Hum Mol Genet**, 10:1631-8, 2001.
- QUENTIEN, M. H.; PITOIA, F.; GUNZ, G.; GUILLET, M. P.; ENJALBERT, A.; PELLEGRINI, I. Regulation of prolactin, GH and Pit-1 gene expression in anterior pituitary b Pitx2: an approach using Pitx2 mutants. **Endocrinology**, 143: 2839-51, 2002.

- QUIGLEY, H. A. Open-angle glaucoma. **N Engl J Med**, 328: 1097-106, 1993.
- QUIGLEY, H. A. Number of people with glaucoma world-wide. **Br J Ophthalmol**, 80: 389-93, 1996.
- REAUME, A. G.; SOUSA, P. A.; KULKARNI, S.; LANGILLE, B. L.; ZHU, D.; DAVIES, T. C. et al. Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin 43. **Science**, 267: 1831-4, 1995.
- REESE A. B.; ELLSWORTH, R. M. The anterior chamber cleavage syndrome. **Arch Ophthalmol**, 75: 307-18, 1966.
- RENEKER, L. W.; SILVERSIDES, D. W.; PATEL, K.; OVERBEEK, P. A. TGF alpha can act as a chemoattractant to perioptic mesenchymal cells in developing mouse eyes. **Development**, 121: 1669-80, 1995.
- RENEKER, L. W.; SILVERSIDES, D. W.; XU, L.; OVERBEEK, P. A. Formation of corneal endothelium is essential for anterior segment development – a transgenic mouse model of anterior segment dysgenesis. **Development**, 127: 533-42, 2000.
- RIISE, R.; STORHAUG, K.; BRONDUM-NIELSEN, K. Rieger syndrome is associated with PAX6 deletion. **Acta Ophthalmol Scand**, 79: 201-03, 2001.
- RUBIN, J. B.; VERSELIS, V. K.; BENNET, M. V.; BARGIELLO, T. A. A domain substitution procedure and its use to analyse voltage dependence of homotypic gap junctions formed by connexins 26 and 32. **Proc Natl Acad Sci, USA**, 89: 3820-4, 1992.
- RYAN, A. K.; BLUMBERG, B.; RODRIGUEZ-ESTEBAN, C.; YONEI-TAMURA, S.; TAMURA, K.; TSUKUI, T. et al. Pitx2 determines left-right asymmetry of internal organs in vertebrates. **Nature**, 394: 545-51, 1998.
- SAADI, I.; SEMINA, E. V.; AMENDT, B. A.; HARRIS, D. J.; MURPHY, K. P.; MURRAY, J. C. et al. Identification of a dominant negative homeodomain mutation in Rieger syndrome. **J Biol Chem**, 276: 23034-41, 2001.

- SAADI, I.; KUBURAS, A.; ENGLE, J. J.; RUSSO, A. F. Dominant negative dimerization of a mutant homeodomain protein in Axenfeld-Rieger syndrome. **Mol Cell Biol**, 23: 1968-82, 2003.
- SADEGHI-NEJAD, A.; SENIOR, B. Autosomal dominant transmission of isolated growth hormone deficiency in iris-dental dysplasia (Rieger's syndrome). **J Pediatrics**, 85: 644-8, 1974.
- SAKAI, M.; SERRIA, M. S.; IKEDA, H.; YOSHIDA, K.; IMAKI, J.; NISHI, S. Regulation of c-maf gene expression by Pax6 in cultured cells. **Nucleic Acids Res**, 29: 1228-37, 2001.
- SALEEM, R. A.; BANERJEE-BASU, S.; BERRY, F. B.; BAXEVANIS, A. D.; WALTER, M. A. Analyses of the effects that disease-causing missense mutations have on the structure and function of the winged-helix protein FOXC1. **Am J Hum Genet**, 68: 627-41, 2001.
- SALEEM, R. A.; MURPHY, T. C.; LIEBMANN, J. M.; WALTER, M. A. Identification and analysis of a novel mutation in the FOXC1 forkhead domain. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, 44: 4608-12, 2003.
- SAMPLES, J. R.; WIRTZ, M. K. Introductory ophthalmic genetics. **Ophthalmol Clin N Am**, 16: 501-3, 2003.
- SAMPLES, J. R. Ophthalmic genetics: diagnosis and therapy. **Ophthalmol Clin N Am**, 16: xi, 2003.
- SCHINZEL, A.; BRECEVIC, L.; DUTLY F.; BAUMER, A.; BINKERT, F.; LARGO, R. H. Multiple congenital anomalies including the Rieger eye malformation in a boy with interstitial deletion of (4)(q25→27) secondary to a balanced insertion in his normal father: evidence for haplotype insufficiency causing the Rieger malformation. **J Med Genet**, 34: 1012-4, 1997.
- SCOTT, M. P.; TAMKUN, J. W.; HARTZELL, G. W. III. The structure and function of homeodomain. **Biochim Biophys Acta**, 989: 25-48, 1989.

- SEMINA, E. V.; MURRAY, J. C.; LEYSENS, N. J.; YOSHIURA, K.; ALTHERR, M. Progress in positional cloning of Rieger gene. **Am J Hum Genet**, 57: 1565, 1995.
- SEMINA, E. V.; REITER, R.; LEYSENS, N. J.; ALWARD, W. L. M.; SMALL, K. W.; DATSON, N. A. et al. Cloning and characterization of a novel bicoid-related transcription factor gene, RGS, involved in Rieger syndrome. **Nat Genet**, 14: 392-9, 1996a.
- SEMINA, E. V.; DATSON, N. A.; LEYSENS, N. J.; ZABEL, B.U.; CAREY, J. C.; BELL, G. I. et al. Exclusion of epidermal growth factor and high-resolution physical mapping across the Rieger syndrome locus. **Am J Hum Genet**, 59: 1288-96, 1996b.
- SHARON-FRILING, R.; RICHARDSON, J.; SPERBECK, S.; LEE, D.; RAUCHMAN, M.; MAAS, R. et al. Lens-specific gene recruitment of zeta-crystallin through Pax6, Nr1-Maf, and brain suppressor sites. **Mol Cell Biol**, 18: 2067-76, 1998.
- SHIELDS, M. B. Axenfeld-Rieger syndrome: a theory of mechanism and distinctions from the iridocorneal endothelial syndrome. **Tr Am Ophthalmol Soc**, 81: 736-84, 1983.
- SHIELDS, M. B.; BUCKLEY, E.; KLINTWORTH, G. K.; THRESHER, R. Axenfeld-Rieger syndrome. A spectrum of developmental disorders. **Surv Ophtalmol**, 29: 387-409, 1985.
- SHIELDS, M. B.; RITCH, R.; KRUPING, T. Classification of glaucomas. In: RITCH, R.; SHIELDS, M. B.; KRUPING, T. **The glaucomas**. 2 ed. Saint Louis: Mosby-Year Book, 1996. p. 717-725. v.2
- SIMMONS, D. M.; VOSS, J. W.; INGRAHAM, H. A.; HOLLOWAY, J. M.; BROIDE, R. S.; ROSENFELD, M. G. et al. Pituitary cell phenotypes involve cell-specific Pit-1 mRNA translation and synergistic interactions with other classes of transcription factors. **Genes Dev**, 4: 695-711, 1990.
- SMITH, R. S.; ZABALETA, A.; KUME, T.; SAVINOVA, O. V.; KIDSON, S. H.; MARTIN, J. E. et al. Haploinsufficiency of the transcription factors FOXC1 and FOXC2 results in aberrant ocular development. **Hum Mol Genet**, 9: 1021-32, 2000.

- SPENCER, W. H.; ALVARADO, J.; HAYES, T. L. Scanning electron microscopy of human ocular tissues: trabecular meshwork. **Invest Ophthalmol**, 7:651-62, 1968.
- STAINS, J. P.; LECANDA, F.; SCREEN, J.; TOWLER, D. A. CIVITELLI, R. Gap junctional communication modulates gene transcription by altering the recruitment of Sp1 and Sp3 to connexin-response elements in osteoblast promoters. **J Biol Chem**, 278: 24377-87, 2003.
- STATHACOPOULOS, R. A.; BATEMAN, J. B.; SPARKES, R. S.; HEPLER, R. S. The Rieger syndrome and a chromosome 13 deletion. **J Ped Ophthalmol Strabismus**, 24: 198-203, 1987.
- STONE, D. L.; KENYON, K. R.; GREEN, W. R.; RYAN, S. J. Congenital central corneal leukoma (Peters anomaly). **Am J Ophthalmol**, 81: 173-93, 1976.
- SUZUKI, T.; TAKAHASHI, K.; KUWAHARA, S.; WADA, Y.; ABE, T.; TAMAI, M. A novel (Pro79Thr) mutation in the FKHL7 gene in a Japanese family with Axenfeld-Rieger Syndrome. **Am J Ophthalmol**, 132: 572-5, 2001.
- SWIDERSKI, R. E.; REITER, R. S.; NISHIMURA, D. Y.; ALWARD, W. L. M.; KALENAK, J. W.; SEARBY, C. S. et al. Expression of the Mfl gene in developing mouse hearts: implication in the development of human congenital heart defects. **Dev Dyn**, 216: 16-27, 1999.
- TABBARA, K. F.; KHOURI, F. P.; der KALOUSTIAN, V. M. Rieger's syndrome with chromosomal anomaly (report of a case). **Can J Ophthalmol**, 8: 488-91, 1973.
- TAWARA, A.; INOMATA, H. Developmental immaturity of the trabecular meshwork in congenital glaucoma. **Am J Ophthalmol**, 92: 508-25, 1981.
- TON, C. C. T.; HIRVONEN, H.; MIWA, H.; WEIL, M.W.; MONAGHAN, P.; JORDAN, T. et al. Positional cloning and characterization of a paired box- and homeobox-containing gene from the aniridia region. **Cell**, 67: 1059-74, 1991.
- TOYOFUKU, T.; YABUKI, M.; OTSU, K.; KUZUYA, T.; HORI, M.; TADA, M. Direct association of the gap junction protein connexin 43 with ZO-1 in cardiac myocytes. **J Biol Chem**, 172: 12725-31, 1998.

- TRABOULSI, E. I.; PARKS, M. M. Glaucoma in oculo-dento-osseous dysplasia. **Am J Ophthalmol**, 109: 310-3, 1990.
- TREISMAN, J.; GONCZY, P.; VASHISHTHA, M.; HARRIS, E.; DESPLAN, C. A single aminoacid can determine the DNA binding specificity of homeodomain proteins. **Cell**, 59:553-62, 1989.
- TRIPATHI, B. J.; TRIPATHI, R. C.; WISDOM, J. E. Embryology of the anterior segment of the human eye. In: RITCH, R; SHIELDS, M. B.; KRUPIN, T. **The glaucomas**. 2 ed. St Louis: Mosby, 1996. p. 1.
- TROEBER, R; ROCHELS, R. Histologische befunde bei dysgenesis mesodermalis iridis et corneae Rieger. **Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol**, 213: 169-74, 1980.
- TSAI, J. C.; GRAJEWSKI, A. L. Cardiac valvular disease and Axenfeld-Rieger syndrome. **Am J Ophthalmol**, 118: 255-6, 1994.
- VANEY, D. I.; WEILER, R. Gap junctions in the eye: evidence for heteromeric, heterotypic and mixed-homotypic interactions. **Brain Res Rev**, 32: 115-20, 2000.
- VASCONCELLOS, J. P. C. **Avaliação da frequência e do tipo de mutações no gene TIGR/MYOC em uma população brasileira com glaucoma primário de ângulo aberto do tipo juvenil**. Campinas, 2001. (Tese – Doutorado – Universidade Estadual de Campinas).
- VASCONCELLOS, J. P.; MELO, M. B.; SCHIMITI, R.; COSTA, F. F.; COSTA, V. P. Penetrance and phenotype of the Cys433Arg myocilin mutation in a family pedigree with primary open angle glaucoma. **J Glaucoma**, 12: 104-7, 2003.
- VASCONCELLOS, J. P. C.; MELO, M. B.; SCHIMITI, R. B.; BRESSANIM, N. C.; COSTA, V. P. Nova mutação o gene GJA1 em uma família com Displasia Oculodentodigital. **Arq Bras Oftalmol**, 64 (Supl): 37, 2004.
- VAUX, C.; SHEFFIELD, L.; KEITH, C. G.; VOULLAIRE, L. Evidence that Rieger syndrome maps to 4q25 or 4q27. **J Med Genet**, 29: 256-8, 1992.

- VERSELIS, V. K.; GINTER, C. S.; BARGIELLO, T. A. Opposite voltage gating polarities of two closely related connexins. **Nature**, 368: 348-51, 1994.
- WARING, G. O. III; RODRIGUES, M. M.; LAIBSON, P. R. Anterior chamber cleavage syndrome: a stepladder classification. **Surv Ophthalmol**, 20: 3-27, 1975.
- WEIGEL, D.; JACKLE, H. The forkhead domain: a novel DNA binding motif on eukaryotic transcription factors? **Cell**, 63:455-6, 1990.
- WERNER, W.; KRAFT, S.; CALLEN, D. F; BARTSCH, O.; HINKEL, G. K. A small deletion of 16q23.1→16q24.2 [del(16)(q23.1q24.2).ish del(16)(q23.1q24.2) (D16S395+, D16S348-, P5432+)] in a boy with iris coloboma and minor anomalies. **Am J Med Genet**, 70: 371-6, 1997.
- WESLEY, R. K.; BAKER, J. D.; GOLNICK, A. L. Rieger's syndrome: (oligodontia and primary mesodermal dysgenesis of the iris): clinical features and report of an isolated case. **J Pediatr Ophthalmol Strab**, 15: 67-70, 1978.
- WHITE, T. W. Unique and redundant connexin contributions to lens development. **Science**, 295: 319-320, 2002.
- WILLECKE, K.; EIBERGER, J.; ECKARDT, D.; ROMUALDI, A.; GÜLDENAGEL, M.; DEUTSCH, U. et al. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. **Biol Chem**, 383: 725-37, 2002.
- WOLTER, J. R.; SANDALL, G. S.; FRALICK, F. B. Mesodermal dysgenesis of anterior eye with a partially separated posterior embryotoxon. **J Pediatr Ophthalmol**, 4: 41-6, 1967.
- WORST, J. G. F. **The pathogenesis of congenital glaucoma**. An embryological and goniosurgical study. Assen, The Netherlands: Royal Van Gorcun, 1966. p. 38-65.
- WUDUNN, D. Genetic basis of glaucoma. **Curr Opin Ophthalmol**, 13: 55-60, 2002.
- WULLE, K. G. Electron microscopy of the fetal development of the corneal endothelium and Descemet's membrane of the human eye. **Invest Ophthalmol**, 11: 897-904, 1972.

7 - ANEXO

Aprovação da pesquisa pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa.



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 791/2002

3895

Registro CONEP = 3895 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Registro CEP = 029/2002

Processo nº 25000.033558/2002-72

Projeto de Pesquisa: "Rastreamento de mutação genética em famílias brasileiras portadoras de anomalia ou Síndrome de Axenfeld Rieger".

Pesquisador Responsável: Dr Werner Passarinho Cella

Instituição: Hospital de Clínicas da UNICAMP-SP

Área Temática Especial : Genética humana.

Ao se proceder à análise das respostas ao parecer CONEP nº 613/2002 relativo ao projeto em questão, considerou-se que:

- a) foram atendidas as solicitações do referido parecer;
- b) o projeto preenche os requisitos fundamentais das Resoluções CNS 196/96 sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos;
- c) o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição supracitada.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação : Projeto aprovado

Brasília, 14 de junho de 2002

WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP-MS

8 - APÊNDICES

Ficha cadastral dos pacientes e familiares envolvidos no estudo.

Nome: _____ **Telefone:** _____

Sexo: () masculino () feminino **Idade:** _____ **HC:** _____

() Caso índice () Familiar: _____

Tempo de diagnóstico de glaucoma: _____ anos **Cirurgia prévia:** () sim () não

Alterações oculares

- () embriotóxon posterior
- () adesões iridocorneanas
- () hipoplasia iriana
- () corectopia
- () policoria

PIO OD: _____ **PIO OE:** _____ **Esc OD:** _____ **Esc OE:** _____

Glaucoma: () sim () não

Acuidade Visual (se portador de AR): OD: _____ OE: _____

Alterações sistêmicas

- () hipoplasia malar
- () hipoplasia mandibular
- () microdontia
- () hipodontia
- () involução da cicatriz umbilical
- () outras: _____

Diagnóstico

- () Síndrome com manifestações oculares
- () Síndrome com manifestações oculares e sistêmicas
- () Normal

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____, aceito colaborar com o estudo "Rastreamento de Mutações Genéticas em Famílias Brasileiras Portadoras da Síndrome de Axenfeld-Rieger", que está sendo realizado pelo Departamento de Oftalmologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

Fui informado que o objetivo deste estudo é pesquisar possíveis alterações genéticas em famílias brasileiras em que pelo menos uma das pessoas tenha a chamada anomalia ou síndrome de Axenfeld-Rieger, doença caracterizada principalmente por alterações no olho que podem aumentar a sua pressão e causar cegueira. A importância desta pesquisa se deve ao fato de que, na população brasileira, estas mutações genéticas ainda não foram bem estudadas.

Como participante voluntário da pesquisa, tenho conhecimento de que serei examinado pelo oftalmologista responsável pelo estudo, o Dr. Wener Cella. O exame oftalmológico tem o objetivo de observar se há alterações no olho que lembrem aquelas que vemos na anomalia de Axenfeld-Rieger. Além disso, minha pressão ocular será medida, o que pode causar um leve ardor ocular ou embaçamento transitório da visão. Estes procedimentos são normalmente realizados em qualquer exame oftalmológico, são seguros e não apresentam riscos à minha vista. Após o exame oftalmológico, sei que será colhido um pouco do meu sangue, aproximadamente 5 ml, o que pode causar um pouco de dor no local da picada da agulha. Este sangue será enviado para o laboratório de Genética em Oftalmologia da UNICAMP para ser analisado em busca de alterações genéticas.

Fui informado de que todos os resultados obtidos do meu exame são totalmente confidenciais e apenas eu e a equipe responsável pelo estudo terão acesso a estas informações. Como a pesquisa será desenvolvida por um período de tempo longo, tenho conhecimento de que não terei benefício imediato com este trabalho e que, além disso, posso desistir a qualquer hora sem prejudicar meu tratamento.

Durante a pesquisa, caso seja descoberto que apresento sinais da anomalia ou síndrome de Axenfeld-Rieger, serei orientado sobre o tratamento adequado e terei aconselhamento genético tanto sobre a minha doença quanto à possibilidade de transmiti-la a meus filhos. Este aconselhamento será feito pelo Dr. Wener Cella.

Fui informado de que, participando deste estudo, não terei despesas extras para consulta e tratamento, exceto aquelas que normalmente fazem parte de uma consulta de rotina no Departamento de Oftalmologia da UNICAMP.

Campinas, ____ de _____ de 200 ____

assinatura do paciente

assinatura do médico

Telefones de contato: Dr. Wener Cella: 19 - 3788 7936; Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp: 19 - 3788 8936