



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---



Facultad de Medicina

División de Posgrado

Instituto de Oftalmología "Fundación Conde de Valenciana"

**Estudio clínico genético de una familia mexicana  
con glaucoma congénito autosómico dominante**

TESIS

Para obtener la  
Especialidad en Oftalmología

Presenta

**Dra. Diana Alvarez Melloni**

Director de Tesis: Dr. Juan Carlos Zenteno

Asesor de Tesis: Dr. Gerardo Valdés Casas

Facultad de Medicina



México D.F. 2009



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

---

Dr. Enrique Luis Graue Wiechers  
Profesor Titular del Curso  
Instituto de Oftalmología “Fundación Conde de Valenciana” I.A.P.

---

Dra. Claudia Murillo Correa  
Jefa de Enseñanza  
Instituto de Oftalmología “Fundación Conde de Valenciana” I.A.P.

---

Dra. Juan Carlos Zenteno  
Director de Tesis  
Instituto de Oftalmología “Fundación Conde de Valenciana” I.A.P.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios... por darme la vida y poner en mi camino tantas oportunidades y momentos que me han hecho la mujer que soy.

A Carlos.... por ser el amor de mi vida, por apoyarme en todo lo que hago y pienso, por tener siempre la mano cerca cuando caigo y los brazos abiertos para darme consuelo, por complementarme, hacerme tan feliz y por hacer realidad mi sueño.

A mis papás Pablo y Bettina... por todo el amor que me han dado, por cuidarme y ver siempre por mi bien, por su apoyo y confianza en cada uno de los proyectos que he emprendido, por ser un gran ejemplo a seguir.

A mi hermano Pablo... por su cariño, sonrisas y consejos que me han ayudado a lo largo de mi vida, por ser apoyo incondicional, por enseñarme que vale la pena hacer sacrificios y dejar todo atrás por cumplir un sueño.

A mis suegros Carlos y Azucena, y a mi cuñado Andrés... por adoptarme como hija y hermana, por su cariño, comprensión y por hacerme ver que en la felicidad se construye día a día con amor.

A la Dra. Claudia Murillo... por creer y confiar en mí, por todas las veces que ha logrado sacar lo mejor de mí, por ser un gran apoyo y consuelo.

Al Dr. Juan Carlos Zenteno... por su tiempo y paciencia para lidiar con alguien que poco sabe de genes, por siempre recibirme con una sonrisa para revisar este trabajo.

Al Dr. Gerardo Valdés... por motivarme a hacer las cosas lo mejor posible, por orientarme en la clínica y por su tiempo para la realización de esta tesis.

Al Dr. Oscar Chacón... por el tiempo invertido para descifrar los genes, por no perder la fe cuando las cosas parecían no salir.

Al Hospital Conde de Valenciana... por ser un segundo hogar, donde me he encontrado con personas maravillosas, por darme las herramientas para alcanzar todas las metas propuestas.

A mis amigos... por soportar mi eterno cansancio y la ausencia en tantos momentos, por estar siempre ahí para mí.

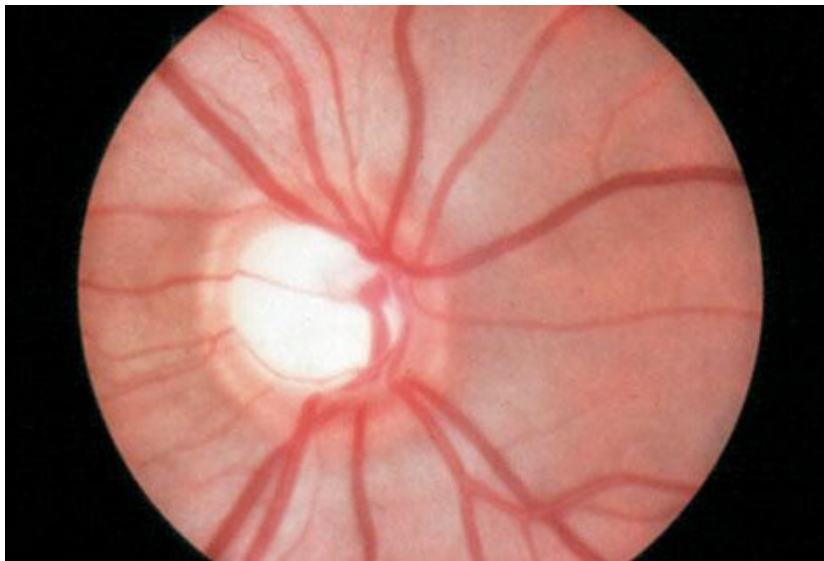
A todos los pacientes... que han permitido ser fuente de conocimiento, que han prestado sus ojos para formarme como oftalmólogo.

## INDICE

1. Introducción .....	5
1.1 Definición y terminología .....	5
1.2 Epidemiología .....	6
1.3 Cuadro clínico .....	7
1.3.1 Presión Intraocular .....	7
1.3.2 Diámetro Corneal .....	9
1.3.3 Longitud Axial .....	10
1.4 Genética .....	11
1.4.1 CYP1B1 .....	11
1.4.2 MYOC .....	13
1.4.3 OPTN .....	15
1.4.4. PITX2 .....	16
1.4.5 FOXC1 .....	17
2. Justificación .....	17
3. Objetivos .....	18
3.1 Objetivo General .....	18
3.2 Objetivo Específico .....	18
4. Diseño .....	18
5. Métodos .....	19
6. Resultados .....	25
6.1 Árbol genealógico .....	25
6.2 Casos clínicos de la familia caso .....	25
6.3 Análisis Genético .....	31
7. Discusión y Conclusiones .....	33
8. Referencias .....	36
9. Anexo .....	40

## 1. INTRODUCCION

El término glaucoma se refiere a una neuropatía óptica asociada a pérdida del campo visual, en la que el aumento de la presión intraocular es uno de los principales factores de riesgo. En la población pediátrica el glaucoma es una de las causas más importantes de ceguera y discapacidad visual; es responsable del 5% de las cegueras en los niños.<sup>1</sup>



**Figura 1.** Imagen característica de un nervio glaucomatoso. Obtenida de Gómez Leal A, Muñoz P. The Atlas of Ophthalmology, USA 2002

### 1.1 Definición y Terminología

La nomenclatura del glaucoma en la población pediátrica, está poco definida. El “glaucoma del desarrollo” es el término empleado para agrupar a todos los tipos de glaucoma que son resultado de un desarrollo anormal del sistema de salida del humor acuoso; se clasifica como *primario* cuando existe una disgenesia idiopática de la cámara anterior, y como *secundario* cuando el flujo

de humor acuoso se reduce ya sea por una enfermedad ocular adquirida o congénita, o bien por un desorden sistémico.

El “glaucoma congénito” es un término empleado cuando se sospechan anomalías del desarrollo. El “glaucoma primario congénito” se utiliza para definir los casos de glaucoma congénito que están presentes desde el nacimiento.

Si el glaucoma primario congénito se reconoce entre el mes de edad y los 2 años de edad se designa como “glaucoma primario infantil”; y si el diagnóstico se hace a partir de los 2 años de edad se define como “glaucoma primario infantil de aparición tardía”.<sup>ii</sup> En el presente trabajo se utilizará el término “glaucoma primario congénito” (GPC) para referirnos a los tres grupos antes descritos, siendo que comparten características clínicas y genéticas.

## **1.2 Epidemiología**

El GPC tiene una incidencia variable entre diferentes poblaciones, pero en general se describe una incidencia global de 1 en cada 10,000 nacimientos.<sup>iii</sup>

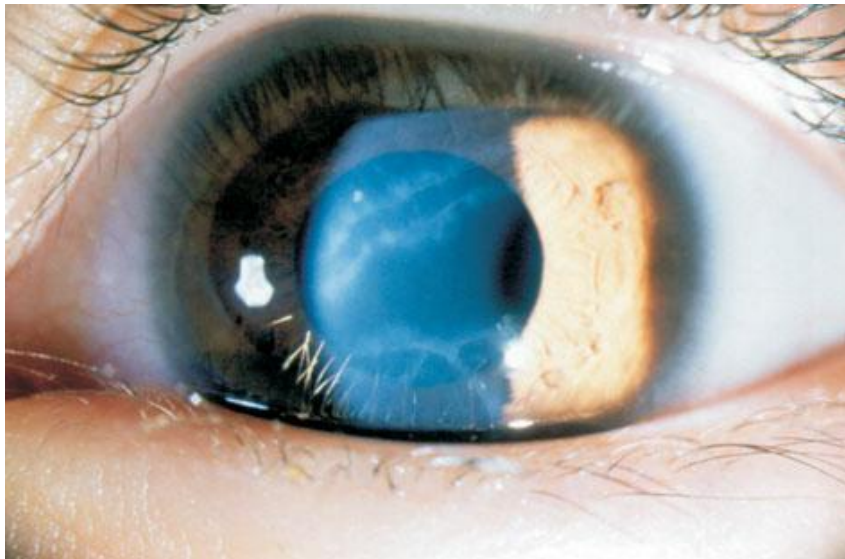
La mayor incidencia ocurre entre poblaciones con altas tasas de consanguinidad (como 1 en cada 2,500 nacimientos en Arabia Saudita<sup>iv</sup>). El

GPC es el tipo de glaucoma pediátrico primario más frecuente,<sup>i</sup> ocupando hasta un 55% del total de glaucomas entre la población pediátrica.<sup>v</sup> El GPC se describe como una entidad más frecuente entre los hombres, bilateral en el 70-80% de los casos; en casos familiares la distribución entre los sexos es similar.<sup>i,ii</sup>



### 1.3 Cuadro Clínico

La presentación clínica del GPC es más frecuente entre los 4 meses y los 2 años de edad hasta en un 56% de los casos; 62% de los casos de GPC son bilaterales y existe historia familiar de glaucoma infantil en sólo 11% de los pacientes.<sup>i</sup> Clínicamente el glaucoma congénito se manifiesta con lagrimeo, fotofobia, blefaroespasmo, edema corneal, estrías de Habb (con orientación horizontal y concéntricas al limbo) y buftalmos.<sup>vi</sup> Las manifestaciones suelen ser consecuencia del aumento de la presión intraocular (PIO) según la edad.



**Figura 2.** Imagen de las Estrías de Haab. Se ven como líneas blanquecinas con orientación horizontal. Obtenida de Gómez Leal A, Muñoz P. The Atlas of Ophthalmology, USA 2002.

#### 1.3.1 Presión Intraocular

La toma de la presión intraocular en pacientes pediátricos varía con respecto a los adultos, ya que existen ciertas circunstancias que pueden afectarla y arrojar una falsa presión intraocular normal,<sup>vii</sup> como lo son estado de vigilia, sueño, agitación, uso de anestesia y tipo de la misma. Los rangos normales de presión intraocular en pacientes pediátricos varía mucho con la edad (Tabla 1):

**Tabla 1.** Valores normales de presión intraocular según la edad<sup>viii</sup>

<b>Edad (años)</b>	<b>Presión Intraocular Promedio (mmHg)</b>
Recién nacido	9.6
0-1	10.6
1-2	12.0
2-3	12.6
3-5	13.6
5-7	14.2
7-9	14.2
9-12	14.3
12-16	14.5

Goethals y cols. obtuvieron los valores medios de presión intraocular en niños, medidos con anestesia tópica desde el nacimiento hasta los 4 años de edad y con anestesia general desde los 4 meses hasta los 5 años de edad.<sup>ix</sup> Dominguez y cols. midieron la presión intraocular normal en 30 ojos normales, mediante tonometría de aplanación y bajo anestesia general, obteniendo así un rango de 5 a 14 mmHg con una media de  $9.56 \pm 2.66$  mmHg.

Adicionalmente encontraron que a mayor relajación del paciente pediátrico, menor es la presión intraocular.

Cuando se controlan las variables que pueden afectar la presión intraocular en los pacientes pediátricos, la presión intraocular normal en niños es definitivamente menor que en adultos. Desde el nacimiento y hasta los 5 años de edad, la presión intraocular se incrementa en 1 mmHg por año de edad.<sup>ix</sup>

### 1.3.2 Diámetro Corneal

En los recién nacidos sanos, la córnea tiene un diámetro horizontal dentro de un rango de 9.5 a 10.5 mm, el cual se incrementa de 0.5 a 1 mm en el primer año de vida (Tabla 2):

**Tabla 2.** Diámetro corneal en niños sanos y con glaucoma<sup>x</sup>

Edad	Diámetro corneal horizontal (en milímetros)	
	Normal	Probable glaucoma
Nacimiento a los 6 meses	9.5 – 11.5	> 12
1 a 2 años	10 – 12	> 12.5
Mayores de 2 años	< 12	> 13

La distensión del globo ocular en respuesta a un aumento de la presión intraocular, provoca un agrandamiento de la córnea, especialmente a nivel de la unión esclerocorneal. Un diámetro corneal aumentado para la edad, e incluso una diferencia entre ambos ojos son altamente sospechosos de glaucoma congénito.



**Figura 3.** Imagen de córnea con un diámetro mayor al normal. Obtenido de Gómez Leal A, Muñoz P. The Atlas of Ophthalmology, USA 2002.

### 1.3.3 Longitud Axial

En aquellos casos en los que la presión intraocular es limítrofe para la edad, es de gran utilidad la medición de la longitud axial. Esta se ha visto que aumenta, cuando el control de la presión intraocular no es adecuada.<sup>xi</sup> La longitud axial normal según la edad se describe a continuación (Tabla 3):

**Tabla 3.** Valores normales de longitud axial según la edad<sup>xii</sup>

Edad	Longitud Axial (mm)
Recién nacido	17.02
10-45 días	17.22
46-75 días	18.77
76-120 días	19.43
5-9 meses	20.09
10-18 meses	20.14

19-36 meses	22.01
4-5 años	22.78
6-7 años	22.56
8-10 años	23.12

Sampaolasi y cols. reportan longitudes axiales promedio en niños con glaucoma congénito y edad entre 2 a 24 meses, de  $22.75 \pm 1.05$  mm. Así como la longitud axial es útil en la integración del diagnóstico de glaucoma congénito, es útil también en el seguimiento del control de la presión intraocular.

#### **1.4 Genética**

Los casos familiares o hereditarios de glaucoma congénito presentan una herencia autosómica recesiva con expresividad variable,<sup>i,vi,xiii</sup> con un porcentaje de consanguinidad del 16-26.9%.<sup>i,xiv</sup> La herencia de la enfermedad en 2 generaciones sucesivas puede representar pseudodominancia.<sup>xv</sup>

Los genes asociados al glaucoma de tipo hereditario son:

##### **1.4.1 CYP1B1**

Se localiza en el cromosoma 2p21 y codifica un miembro de 543-aminoácidos de la superfamilia del citocromo P450. La proteína CYP1B1 es una monooxigenasa capaz de metabolizar sustancias endógenas y exógenas

incluyendo esteroides y retinoides.<sup>vi,11</sup> Es un gen altamente polimórfico<sup>xv</sup> que se expresa en varios tejidos corporales incluida la malla trabecular.<sup>xvi</sup>

Stoilov y cols. estudiaron familias brasileñas con GPC, encontrando que las mutaciones en CYP1B1 son responsables de producir la enfermedad en la mitad de los casos, aunque e reportan mutaciones de hasta el 100% en familias de Turquía, Arabia Saudita y Eslovaquia.<sup>xvii</sup> Se han reportado 18.2% de mutaciones en CYP1B1 en pacientes japoneses<sup>xiii</sup> y 64.7% en pacientes de Kuwait con un alto número de pacientes productos de matrimonios consanguíneos.<sup>xviii</sup> Hollander y cols reportan mutaciones en CYP1B1 en 85% de los casos familiares y en 25% de los casos esporádicos. Las mutaciones en este gen se han encontrado en 20-30% de los pacientes con entorno etnológico<sup>xix,xx</sup> y hasta en un 85% de las poblaciones cosanguíneas<sup>xxi,xxii</sup>. Las mutaciones observadas en CYP1B1 se pueden ver en casos de disgenesia del ángulo moderada y severa, lo cual correlaciona con la severidad de la enfermedad.<sup>xvi</sup> Otros loci relacionados con GPC incluyen GLC3B (1p36) y GLC3C (14q24),<sup>xvi,xix</sup> aunque se desconocen los genes específicos asociados a estas regiones.

La identificación de CYP1B1 como un gen afectado en el GPC es el primer ejemplo de mutaciones en los miembros de la superfamilia del citocromo P450.<sup>xvii</sup> Actúa como enzima que metaboliza drogas, controla los niveles estacionarios de pequeñas moléculas oxigenadas que funcionan como ligando en las vías de transducción de señales. Es probable que CYP1B1 juegue un papel en el metabolismo de una molécula desconocida e involucrada en el desarrollo ocular. Se ha reportado que un metabolito dependiente del citocromo

P450 que inhibe ATPasa  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  en la córnea está implicado en regular la transparencia corneal y la secreción de humor acuoso.<sup>xxiii</sup>

Las formas mutantes de CYP1B1 pueden diferir en sus propiedades moleculares y enzimáticas como diferentes combinaciones de mutaciones de CYP1B1 que llevan a variabilidad clínica. Esto sugiere que la presencia de una mutación en particular puede no ser suficiente para determinar un resultado fenotípico. De hecho, el análisis funcional de dos formas mutantes de CYP1B1 muestra que difieren en actividad enzimática y estabilidad. De ahí que los individuos heterocigotos compuestos para dichas mutaciones muestren fenotipos bioquímicos complejos. Dicha observación puede tomar parte de la heterogeneidad fenotípica del GPC asociado a CYP1B1.<sup>xxiv</sup>

Estudios recientes sugieren que CYP1B1 puede actuar como un regulador de la expresión de MYOC, aunque no se han realizado estudios de interacción entre estas 2 proteínas. Individuos con mutaciones en ambos genes desarrollan glaucoma en edades más tempranas de la vida y se ha propuesto que el glaucoma congénito y juvenil son variantes alélicas.<sup>xxv</sup>

#### **1.4.2 MYOC**

Recientemente se ha asociado el gen MYOC como parte de la patogénesis de algunos casos de GPC en asociación con CYP1B1.<sup>xxix</sup> El gen de miocilina, también conocido como gen inducible de respuesta glucocorticoide en la malla trabecular (TIGR), se localiza en el cromosoma 1q23-24 y codifica para una glucoproteína de 504 aminoácidos, expresada en el trabéculo,<sup>xxv</sup> y en otras regiones oculares, incluido el nervio óptico.<sup>xxvi</sup> Las mutaciones en MYOC se

asocian con el glaucoma juvenil de ángulo abierto (GJAO) y glaucoma primario de ángulo abierto (GPAO), ambos con herencia autosómica dominante aunque se ha reportado también como autosómico recesivo.<sup>xxvii</sup> Se han reportado mutaciones en dicho gen en 2-4% de los pacientes con GPAA<sup>xxviii</sup> y en 33% de los pacientes con GJAO.<sup>xxix</sup> La mutación más frecuente es Q368X en estado heterocigoto y se encuentra en 1.6% de los pacientes con glaucoma primario de ángulo abierto.<sup>xxx</sup> MYOC tiene una homología significativa con la miosina en la región amino Terminal y contienen un residuo de leucina similar al observado en el dominio de miosina de proteínas citoesqueléticas.<sup>xxxi</sup> La gran mayoría de mutaciones se localizan en el tercer exón que codifica un dominio de 250 aminoácidos homólogo a la olfatomedina.<sup>xxix,xxxii</sup>

La función exacta de MYOC permanece desconocida, sin embargo se ha sugerido que la haploinsuficiencia no es un mecanismo crítico para el GPAA en pacientes con mutación en MYOC y que las mutaciones que ocasionan glaucoma en humanos confieren una nueva función.<sup>xxxiii</sup> Esta hipótesis se confirma por estudios que sugieren que GPAA se encuentra solo en pacientes heterocigotos con una copia sana y una copia mutante de MYOC.<sup>xxxiv</sup> Morrisette y cols, sugieren que las formas normales y mutantes de proteínas de MYOC forman hetero-multímeros funcionales. La acumulación de estos en el citoplasma o matriz extracelular puede impedir el flujo de salida normal del humor acuoso y ocasionar elevación de la PIO. Las neuropatías ópticas independientes de la elevación de la PIO pueden ocurrir como consecuencia de la acumulación de hetero-multímeros en las células ganglionares de la retina o en fibras del nervio óptico. Jacobson y cols. examinaron la expresión de MYOC normal y con mutación en pacientes con y sin glaucoma asociado a MYOC.



Encontraron muy poca o nula expresión de MYOC en células que tuvieran formas mutantes de MYOC.<sup>xxxv</sup> Los autores sugieren que la asociación de formas mutantes con formas sanas de miocilina previene o reduce la secreción de la proteína.

Estudios recientes han mostrado la asociación de miocilina con la arquitectura microfibrilar en placas derivadas de la vaina, en la que se han documentado cambios patológicos en pacientes con GPAA.<sup>xxxvi</sup> La elevación de la PIO puede entonces inducir la expresión de MYOC en el segmento anterior.<sup>xxxvii</sup> Se ha demostrado que la infusión de MYOC recombinante en la cámara anterior de ojos humanos en cultivo incrementan la resistencia al flujo así como la PIO.<sup>xxxviii</sup> De aquí se asume que una expresión alterada de MYOC puede también predisponer al glaucoma al influenciar el flujo de salida uveoescleral. Al tomar todo en conjunto, estos estudios sugieren que la forma mutante de MYOC altera la secreción del MYOC normal o de otras proteínas necesarias para mantener la integridad de la malla trabecular y su matriz extracelular.<sup>xxxix</sup>

### **1.4.3 OPTN**

La optineurina (OPTN) es un gen identificado, junto con MYOC, asociado a glaucoma primario de ángulo abierto de presentación en la vida adulta.<sup>xiii</sup> Este gen se localiza en el cromosoma 10p14-15 y codifica para una proteína de 577 aminoácidos, que no exhibe homología con otra proteína conocida. OPTN interactúa con proteínas como Huntingtina,<sup>xxxix</sup> factor de transcripción IIIA<sup>xi</sup> y RAB8.<sup>xii</sup> Rezaie y cols estudiaron 54 familias con glaucoma de presentación en la edad adulta con transmisión autosómica dominante con al menos un

miembro con glaucoma de tensión normal (GTN); sugirieron que las mutaciones en OPTN pueden ser responsables del 16.7% de las formas hereditarias de GTN. OPTN se expresa en corazón, cerebro, placenta, hígado, músculo esquelético, riñón y páncreas. Rezaie y cols. también demostraron expresión en malla trabecular, epitelio ciliar no pigmentado, retina, cerebro, corteza adrenal, hígado, linfocitos y fibroblastos; comprobaron que se producen menos niveles de optineurina en fibroblastos cultivados de un paciente con mutación en dicho gen, que en fibroblastos de un control sano. Esto sugiere que una haploinsuficiencia puede ser la causa de glaucoma. OPTN puede modificar el equilibrio hacia la inducción de apoptosis. Debido a que el TNF- $\alpha$  puede incrementar la severidad de daño del nervio óptico en pacientes con glaucoma,<sup>xlii,xliii</sup> se especula que OPTN opera a través de la vía del TNF- $\alpha$ , ejerciendo un papel neuroprotector en el ojo y nervio óptico, aunque produce neuropatía óptica y pérdida del campo visual cuando se encuentra defectuoso.<sup>xliv</sup>

#### **1.4.4 PITX2**

Otro de los genes involucrados en el glaucoma es PITX2. Este gen se localiza en el cromosoma 4q25-27.<sup>xxxi</sup> La proteína de PITX2 se expresa en el ojo en desarrollo, dientes, ombligo y glándula pituitaria. Se asocia con glaucoma por formar parte del espectro de manifestaciones que provoca, como la hipoplasia iridiana, el síndrome de Axenfeld-Rieger o la anomalía de Peters.<sup>xxv</sup> Todas estas anomalías son consideradas dentro del espectro de disgenesia del segmento anterior. No se han encontrado mutaciones en pacientes que

presenten glaucoma sin que se asocie a alguno de los síndromes mencionados.<sup>xxv</sup>

### 1.4.5 FOXC1

El gen FOXC1 se localiza en el cromosoma 6p25 y codifica para un factor de transcripción. En un paciente con glaucoma congénito primario que tenía una traslocación balanceada entre 6p25 y 13q22, Nishimura y cols clonaron los puntos de ruptura cromosómica e identificaron 2 genes candidatos: uno de los cuales era FOXC1; en otro paciente con glaucoma primario congénito con monosomía parcial 6p, se encontró ausente al gen FOXC1.<sup>xlv</sup> Varias enfermedades dominantes que involucran anomalías en el segmento anterior del ojo se han mapeado al cromosoma 6p25 como son el síndrome de Axenfeld-Rieger tipo 1 y la iridogoniodisgenesis tipo 1. Nishimura y cols demostraron mutaciones de FOXC1 en pacientes con anomalía de Rieger, anomalía de Axenfeld e hipoplasia iridiana,<sup>xlv</sup> lo cual demuestra que las mutaciones en FOXC1 producen un espectro de fenotipos de glaucoma. En estudios posteriores de Nishimura y cols, se sugiere que tanto la haploinsuficiencia como el incremento en la dosis del gen, pueden provocar anomalías del segmento anterior ocular.<sup>xlvi</sup>

1. Papadopoulos M, Cable N, Rain J, Klein PT, BEI Eye Study Investigators. The British Isles and Ocular Glaucoma (BIG) Eye Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48(9):4100-6.

2. Liu H, C. Walker D. Primary Congenital Glaucoma 2004 Update. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 2004; 41(5):271-286.

3. Miller S. Genetic aspects of glaucoma. *Transactions Ophthalmological Society of the United Kingdom* 1996; 101:425-434.

4. Chakrabarti SC, Tadmour M, Cohen A. Foveal ectrophy versus teleoecy in congenital glaucoma. *Br J Ophthalmol* 1989; 73:99-111.

5. Fager R, Aronow J, Evans A, Levin A. The epidemiology of pediatric glaucoma: the Toronto experience. *JAMAOP* 1985; 3: 330-335.

6. Habedank D, Sarrafian M, Strubel C, Woodliff J, Frueh FJ. Genotype and phenotype correlations in congenital glaucoma. *Trans Am Ophthalmol Soc* 2000; 104:183-195.

7. Habedank D, Cohen R. Intraocular pressure measurement in the newborn. *Am J Ophthalmol* 1974; 78:501-504.

8. Pappas S, De Zeeuw D. Foveal pit or cyst. Normal foveal pressure in children. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 1980;29:70.

9. Chakrabarti M, Misra S. Intraocular pressure fluctuations up to 10 years of age. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 1983;20:45-51.

10. Kikkawa M, Matsuda S, Mori J. Corneal diameter and axial length in congenital glaucoma. *Can J Ophthalmol* 1985;20:395.

11. Sempadurai R, Gnanou R. Ocular astigmatism in the diagnosis of congenital glaucoma. *Acta Ophthalmol* 1982; 100:524-527.

12. Gnanou R, Pappas S. Corneal diameter in the diagnosis of congenital glaucoma. *Czechoslovakia, Uvnesska Uf. Prilohy* 1982; p. 201.

13. Watanabe N, Sudo H. Progress in the genetics of glaucoma. *Dev Ophthalmol* 2002; 35:8-19.

14. El-Ashry MF, Abd El-Aziz MM, Elmetwally SS. A clinical and molecular genetic study of Egyptian and Saudi Arabian patients with primary congenital glaucoma (PCG). *J Glaucoma* 2007; Jan; 16(1):104-111.

15. Habedank DA, Sarrafian M, Strubel C, Woodliff J, Frueh FJ, Averbach JA. Genotype and phenotype correlations in congenital glaucoma: ODFB1 mutations, goniodysgenesis, and clinical characteristics. *Am J Ophthalmol* 2008; Dec; 146(5):929-934. Epub 2008 Sep 1.

16. Sarrafian M, Strubel C, Schachar LA. Correlation and biochemistry of primary congenital glaucoma. *Ophthalmol Clin North Am* 2002; Dec; 10(5):503-514. vii Review.

17. Strubel C, Averbach JA, Sarrafian M. Identification of three nonsense mutations in the ODFB1 (CYP11B1) gene in patients with primary congenital glaucoma (DuPont) in families linked to the GLC3A locus on chromosome 2q17. *Hum Mol Genet* 1997; 6:641-647.

18. Alshafiq S, Barakat A, Elshahy A, Abdou S, Al-Awad S. Molecular and clinical evaluation of primary congenital glaucoma in Kuwait. *Am J Ophthalmol* 2005; Mar; 140(3):510-6.

19. Kikuchi M, Kamekura T, Iwashita Y, Ohtsuka N, Kuroki K, Sasaki S, Ushiki K. Cytosine P402S1 gene mutations in Japanese patients with primary congenital glaucoma. *Am J Ophthalmol* 2001; Mar; 131(3):348-350.



## **2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO**

La justificación del estudio radica en que el glaucoma primario congénito es una enfermedad autosómica recesiva y en la mayoría de los casos reportados el gen implicado es CYP1B1. En la familia estudiada, el glaucoma congénito se transmite de manera autosómica dominante, lo que indica que un gen diferente puede ocasionar esta forma de glaucoma congénito primario.

## **3. OBJETIVOS DEL ESTUDIO**

### **2.1 Objetivo General**

Determinar la causa genética del glaucoma congénito de transmisión autosómica dominante, que se observa en el presente caso familiar.

### **3.2 Objetivo Específico**

Analizar de manera secuencial los siguientes genes en el presente caso familiar de glaucoma congénito autosómico dominante:

- a) CYP1B1
- b) MYOC
- c) OPTN
- d) PITX2
- e) FOXC1

#### **4. DISEÑO DEL ESTUDIO**

Se trata de un estudio descriptivo y transversal.

#### **5. MÉTODOS**

Se analizó clínica y genéticamente a una familia mexicana originaria del Estado de México con datos clínicos de glaucoma congénito primario. La evaluación clínica consistió en un interrogatorio completo (que incluyó edad, sexo, evolución del padecimiento y tratamientos recibidos), toma de agudeza visual, biomicroscopía, gonioscopía, tonometría y exploración de fondo de ojo. En los casos pediátricos, la exploración oftalmológica fue en sala de quirófano y bajo anestesia.

Para la realización del análisis genético, fue necesario seguir la siguiente secuencia de eventos que culminaran en el análisis de los genes relacionados con el glaucoma hereditario. Se tomó como muestra inicial al sujeto de la primera generación, por ser quien presentaba el fenotipo más severo de toda la familia.

##### **A) Extracción de DNA a partir de sangre periférica**

Previo otorgamiento de su consentimiento (ver Carta de Información y Consentimiento anexa), a cada sujeto se le extrajo una muestra de 3 ml de sangre por punción venosa y se procedió a aislar el DNA genómico a partir de leucocitos. Se utilizó el sistema automatizado de extracción de ácidos nucleicos

Quickgene (Fujifilm) y el kit de extracción de DNA de sangre total Quickgene (Fujifilm), siguiendo las recomendaciones del fabricante. El volumen de elución final fue de 300 microlitros en buffer de elución. La muestra de DNA se almacenó a una temperatura de -20°C hasta su utilización.

## **B) Amplificación por PCR de los genes CYP1B1, OPTN, MYOC, PITX2 y FOXC1**

A partir del DNA de uno de los sujetos afectados, se realizó la amplificación por PCR de la secuencia codificante completa y las uniones exón/intrón de los genes *CYP1B1*, *OPTN*, *MYOC*, *PITX2* Y *FOXC1*. Se utilizaron pares de oligonucleótidos específicos para amplificación de cada exón adquiridos en una casa comercial (Accesolab, México) y derivados de la secuencia de los tres genes a estudiar (bases de datos GenBank y Ensembl).

La secuencia de oligonucleótidos se presenta a continuación. La cadena “S” representa la cadena con sentido, y la “AS” la cadena antisentido (Tabla 4):

**Tabla 4.** Secuencia de Oligonucleótidos para su amplificación por PCR

<b>Gen</b>	<b>Exón</b>	<b>Cadena</b>	<b>Secuencia de nucleótidos</b>
CYP1B1	2A	S	CGCTCCTGTCTCTGCACCCC
		AS	CGTCGCCGTAGCGCCGCGCC
	2B	S	GGCTCACCTCTCCGTTGCTC
		AS	GCTGCCGCGCACCAGCAGCG
	2C	S	GCCACGTGCTGAGCGAGGCG
		AS	TCAAGAACTTGTCCAGGATG
	2D	AS	AATTCTAGCAGCTCAACCGC

	3	S	TCAACTTGCTTTTCTCTCTCC
		AS	AATTTTCAGCTTGCCTCTTGC
OPTN	3-4	S	TTGGAGTAAGTATTAGCAATCGCC
		AS	TTGATCTAGGAGTCTAGACAC
	4B	S	ATGTGGTCAAGTGGACTAGAGG
	5	S	TAAGGGCATGAGCCCATGGTG
		AS	TGTTTCATCTTTCCAGGGGAGGCT
	6	S	TGGAAGCTTCTTTGGGTTGCA
		AS	AGTTACTTCCTCAGGTCACAA
	7	S	AATGGGTGAACTGTATGGTAT
	8-9	S	ATGCTAATATAGTGAATGTGT
		AS	TAGTCATAACATAGTTAAA
	8B	AS	TTCAGTGGCTGGACTACTCT
	10-11	S	AAGCCAACCTGCGACGTAAAGA
		AS	CCAGATTTAGTGAAGGATTC
	10B	AS	CCAATCTGTATAAAAAGGCG
	12	S	CGGCCAGAGCTGATAATTA
		AS	AATGCGAGAATACAGTCAGG
MYOC	1-2	S	AAGGCCACCCATCCAGGCACC
		AS	GCCTGGAGCGCCTGTTAGCAGC
	3	S	TAAATGTCATCCTCAACATAG
		AS	CCTATACTGATTCTCCTGAACA
	4	S	CGCATGATCATTGTCTGTGTT
		AS	TGGCTCTCCCTTCAGCCTGCT



	13-14	S	TTGAAGGATACAGCACTACC	
		AS	TGGTGCCTTGATTTGGAATC	
	13B	S	TTTGGACAGGCACCTCTTCT	
	14B	S	ACTTCTGTGGACTGTCTGCT	
	15	S	AACTCGCCATCTGTTCTTCA	
		AS	CAAAAGCACAACTCTTGGAGG	
PITX2	2	S	CCTAACAGCTAGTGTAACGT	
		AS	ATTCCTTCCTGCCCAGGCTG	
	3	S	CTTTCGGCCGCGGTCCGGGA	
		AS	AGGCGGAGTGTCTAAGTTCAA	
	4	S	GTCCAGTTGGCGTCCGCGTT	
		AS	CCAGGCGGCGCTGCCTTC	
	5	S	TCCGATGGAAGTTTTAGTAA	
		AS	CGACCTTCTAGCATAATTCC	
	FOXC1	1	S	GCCGGGCCC GGACTCGGACT
			AS	TTCTCGGTCTTGATGTCCTG
2		S	TGCACCTCAAGGAGCCGCCC	
		AS	TCGTCCACGGCCGAGCCGCC	
3		S	TACAGCTCCCCCTGCAGCCA	
		AS	CGCTGGTGTGGTGAATATTC	

Cada reacción de amplificación tuvo un volumen final de de 15 µl e incluyó 7.5 microlitros del kit Hotstart (que contiene buffer de PCR, DNA polimerasa, dNTPs MgCl<sub>2</sub>), 50-100 ngs de DNA genómico, 0.3 microlitros de cada

oligonucleótido a una concentración de 100 micromolar (sentido y antisentido) y agua bidestilada. En algunas reacciones de PCR, se utilizó dimetilsulfoxido (DMSO) a una concentración final de 10%. Se utilizó un programa de temperaturas que incluyó 1 ciclo de 15 min a 95°C para la desnaturalización inicial, 35 ciclos con 1 min de desnaturalización a 95°C, 1 min de alineamiento a temperaturas específicas para cada par de oligonucleótidos y 1 min a 72°C para la extensión. Por último, se realizó 1 ciclo a 72°C por 10 min para la extensión final. Los productos obtenidos de la amplificación se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.2% con tinción de bromuro de etidio para identificar las bandas específicas con el producto amplificado y utilizando como referencia un marcador estándar de peso molecular de 100 pb. Se identificaron las bandas de interés y se recortaron del gel para la purificación del producto de DNA amplificado utilizando ya sea el método de purificación por columna Qiaex II (Qiagen). La concentración del DNA amplificado obtenido de la purificación se determinó por medio de la comparación de la intensidad de las bandas obtenidas con respecto a un marcador de masa estándar (Low DNA Mass Ladder, Invitrogen) en un gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio.

### **C) Secuenciación Automatizada de los Productos de PCR**

Se realizaron nuevas reacciones de PCR para la secuenciación nucleotídica de los fragmentos amplificados de los genes *CYP1B1*, *OPTN*, *MYOC*, *PITX2* Y *FOXC1*. Cada reacción de 10 µl contenía 0.5b µl de kit BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) que contiene los cuatro

dideoxinucleótidos trifosfatados (ddNTPs) marcados por fluorescencia, deoxionucleótidos trifosfatados (dNTPs) no marcados, Tris-HCl (Ph 9.0),  $MgCl_2$  y la enzima ampliTaQ polimerasa; se agregó además 0.5  $\mu$ l de los oligonucleótidos correspondientes para cada fragmento génico a una concentración de 100  $\mu$ M, 10-20 ngs del DNA de cada producto de PCR como templado y agua bidestilada para un volumen final de 10  $\mu$ l. Para esta PCR se utilizó un programa de 25 ciclos que incluyó 30 segundos a 95°C para la desnaturalización, 15 seg a 50°C para el alineamiento y 4 min a 60°C para la extensión.

Los productos de esta segunda PCR se purificaron por medio de columnas Centri-Sep (Applied Biosystems) para eliminar el exceso de ddNTPs fluorescentes. Cada muestra se resuspendió en 20  $\mu$ l de formamida y posteriormente se desnaturalizó a 95°C por 5 min. Los productos se analizaron en un secuenciador automático ABI Prism 310 y las secuencias de DNA obtenidas del sujeto afectado se compararon con las secuencias silvestres de *CYP1B1*, *OPTN*, *MYOC*, *PITX2* Y *FOXC1* publicadas en la base de datos del Ensembl para identificar posibles mutaciones. Se confirmó la presencia de variantes génicas secuenciando también la cadena complementaria de DNA.

#### **D) Clonación y Secuenciación Específica de Alelo del Gen FOXC1**

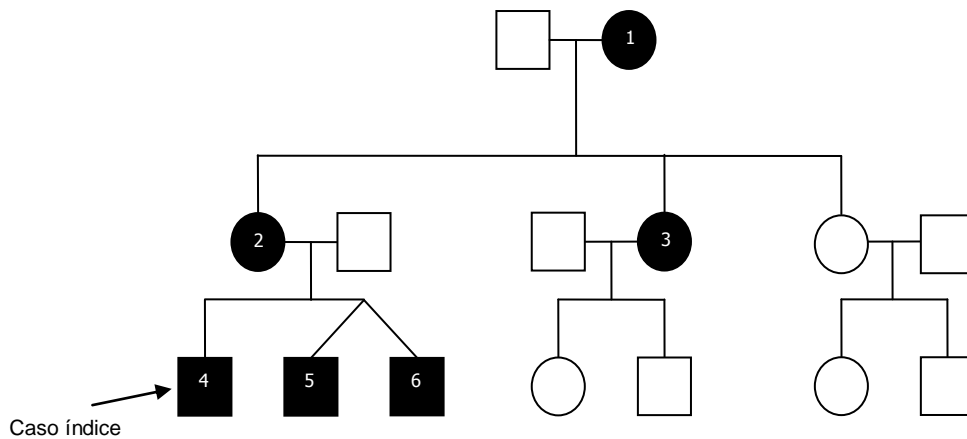
Para la caracterización precisa de dos inserciones del triplete GGC (nucleótido 375 y nucleótido 447) en el gen FOXC1 se realizó la técnica de clonación y secuenciación específica de alelo. Brevemente, se amplificaron nuevos productos de PCR de un fragmento de FOXC1 y se ligaron por el método TA

en el vector de clonación TA-pGEM (Promega). El vector circularizado con el producto de PCR se subclonó en células de *E.coli* competentes (DH5-alfa) que fueron sembradas en medio BHI. Se incubó por 24 hrs y se seleccionaron las colonias blancas. El DNA plasmídico fue purificado mediante el kit Wizard SV Miniprep (Promega) y se secuenció con el protocolo descrito arriba. El fragmento de FOXC1 que incluye los tripletes GGC mencionados, se secuenció en los 5 sujetos afectados y en 3 sanos.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Árbol genealógico

Después de la evaluación clínica de la familia afectada se obtuvo el siguiente árbol genealógico (Figura 5):



**Figura 5.** Árbol genealógico de la familia caso

### 6.2 Casos Clínicos de la Familia Caso

Los casos de los familiares afectados dentro de la familia caso, se describen a continuación:

#### Caso 1

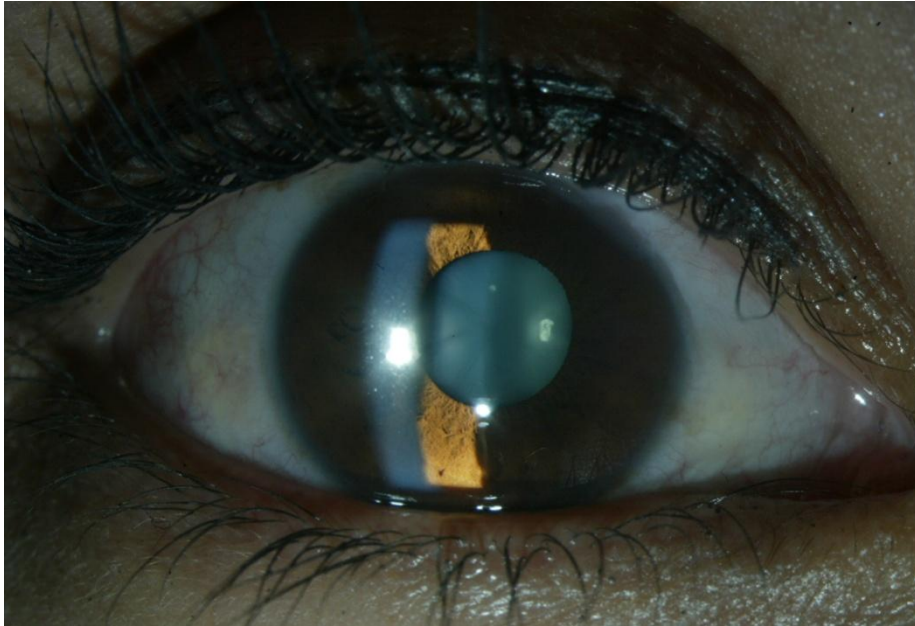
Paciente femenino de 69 años de edad con diagnóstico de glaucoma congénito. Carece de antecedentes de enfermedades crónico-degenerativas. Fue operada de trabeculectomía en ambos ojos hace 47 años. Poco tiempo

después perdió completamente la visión del ojo derecho. Al ojo izquierdo se le realizó crioterapia hace 16 años, cirugía por catarata con afaquia hace 10 años y finalmente se le colocó dispositivo de drenaje hace 8 años. Actualmente se encuentra ojo derecho sin percepción de luz, ojo izquierdo percibe movimiento de manos que mejora a 5/200 con una refracción de +14.50 SPH. La presión intraocular es de 10 mmHg en ojo derecho y 8 mmHg en ojo izquierdo. El ojo derecho se encuentra bula plana, cámara anterior estrecha, seclusión pupilar y cristalino con opacidad; no es posible la valoración clínica del fondo de ojo. El ojo izquierdo se encuentra con tubo de válvula en región temporal, pupila discórica, afaquia. La fundoscopia revela fondo coroideo, papila pálida con excavación del nervio óptico del 100%, con pérdida total del anillo neuroretiniano y emergencia nasalizada de vasos. Se mantiene con terapéutica a base de brimonidina cada 8 horas, dorzolamida con timolol cada 12 horas.

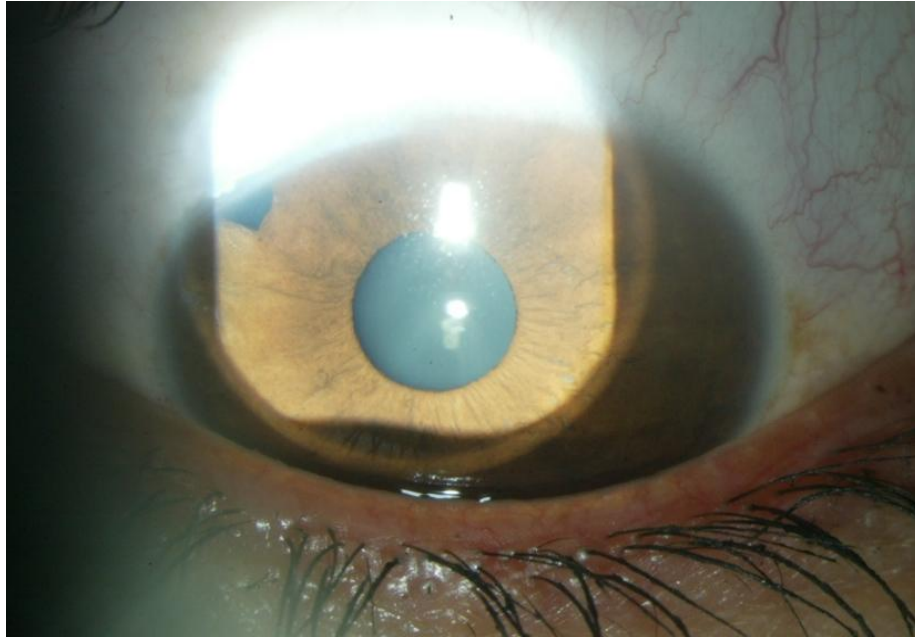
## **Caso 2**

Paciente femenino de 32 años de edad sin antecedentes personales patológicos de importancia. Dentro de sus antecedentes oftalmológicos se encuentra trabeculectomía en ambos ojos hace 16 años aproximadamente por glaucoma congénito. Actualmente su agudeza visual en ambos ojos es de 20/20. Tiene presión intraocular en ojo derecho de 13 mmHg y de 15 mmHg en ojo izquierdo. Paquimetrías de 583 micras en ojo derecho y 596 micras en ojo izquierdo. A la biomicroscopia se encuentran ambos ojos con ángulos abiertos, con todas las estructuras visibles (figura 5) e iridectomía permeable en la

región superior (figura 6). La fundoscopia del ojo derecho revela papila naranja, con excavación del 40% y anillo neuroretiniano conservado. La fundoscopia del ojo izquierdo muestra papila naranja, excavación del 75% verticalizada, anillo neuroretiniano con disminución nasal inferior. Actualmente se maneja con latanoprost cada 24 horas. Sus últimos campos visuales revelan depresión de puntos periféricos superiores en ojo derecho; y depresión temporal superior con depresión nasal inferior en ojo izquierdo; lo cual en comparación con sus campos visuales previos, no se demuestra progresión.



**Figura 5.** Foto clínica de la biomicroscopía del ojo derecho de la paciente del caso 2.



**Figura 6.** Foto clínica de la biomicroscopía del ojo derecho de la paciente del caso 2; nótese en la iridectomía superior.

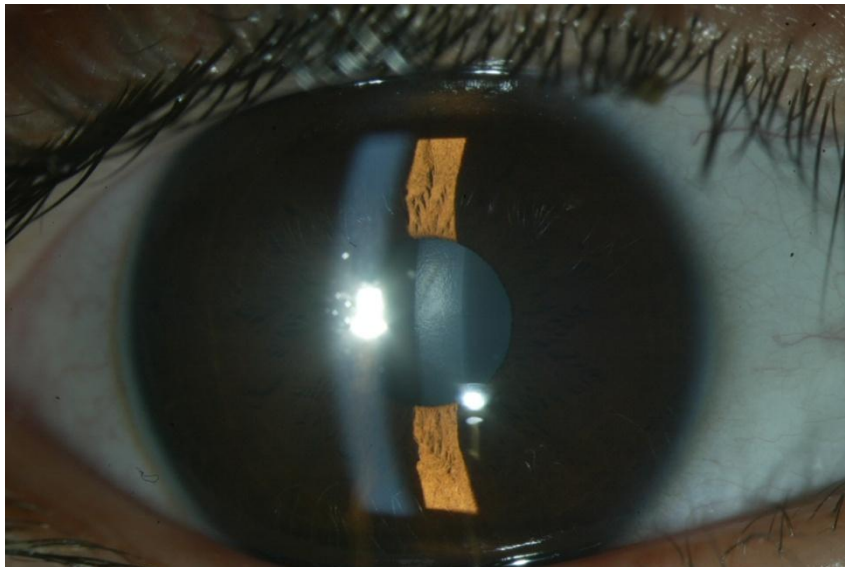
### **Caso 3**

Paciente femenino de 31 años de edad que acude a revisión con diagnóstico de glaucoma. Tiene como antecedentes oftalmológicos trabeculectomía de ambos ojos hace 22 años. Tiene una agudeza visual de 20/20 en ambos ojos, presión intraocular de 22 y 21 mmHg. En la biomicroscopía se observa en ojo derecho, bula plana y fibrosa en M II, cornea transparente, iridectomía en MII, cristalino transparente, ángulos abiertos con pigmento inferior; en el ojo izquierdo bula plana y fibrosa en M XI, cornea transparente, iridectomía en MXI, cristalino transparente, ángulos abiertos con pigmento inferior. La fundoscopia de ambos ojos es normal, papila naranja con excavación 0.35, anillo neuroretiniano conservado, no datos específicos de glaucoma. Se inicia tratamiento con dorzolamida y timolol en combinación fija cada 12 horas.



#### Caso 4

Paciente masculino de 3 años de edad que acude a revisión por el antecedente de madre, tía y abuela materna con diagnóstico de glaucoma congénito, producto de la G I, P I, peso al nacer de 3450, perímetro cefálico 51 cm, apgar no referido. A la biomicroscopía de ambos ojos córnea transparente con un diámetro de 13 mm para ambos ojos (solo se reporta el diámetro vertical) ángulos abiertos, cristalino transparente (figura 7); el fondo de ojo presenta papila naranja con excavación 0.7 con disminución concéntrica del anillo neuroretiniano. La presión intraocular fue de 24 y 22 mmHg en la cita de 1ª vez y 19 y 17 mmHg en la consulta subsecuente (un mes después) con tratamiento a base de dorzolamida al 2% cada 12 horas. La ecografía se encontró sin alteraciones con una longitud axial de 22.18 y 22.24 para ojo derecho e izquierdo respectivamente.



**Figura 7.** Foto clínica del segmento anterior del ojo derecho del paciente del caso 6, donde se demuestra la ausencia de anomalías en el segmento anterior.

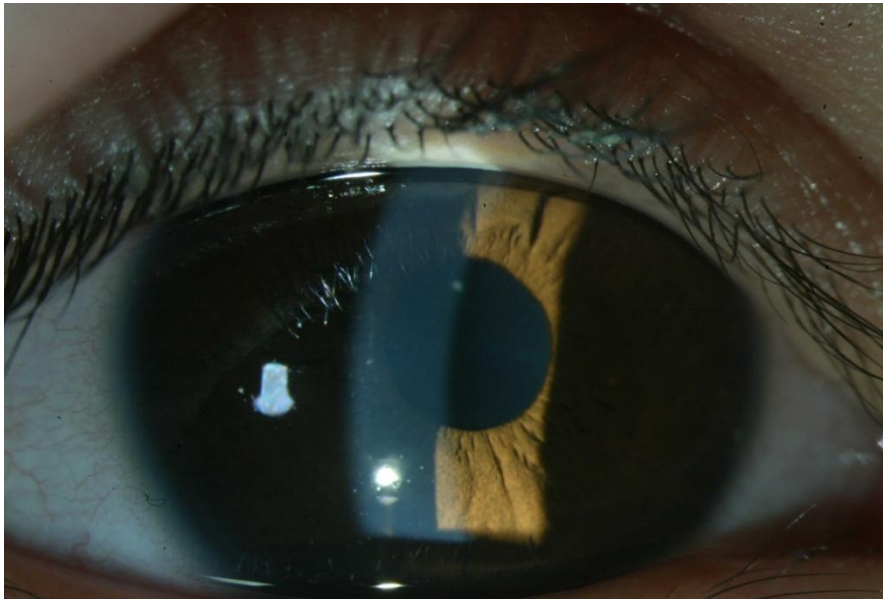
## **Caso 5**

Paciente masculino de 18 meses de edad que acude a revisión por el antecedente de madre, tía y abuela materna con diagnóstico de glaucoma congénito, producto de la G II, Cesárea I, Gemelo I, peso al nacer de 2450, perímetro cefálico 51 cm, apgar 9/9. A la biomicroscopia de ambos ojos se observa estrías de Haab en región inferior, cornea transparente con un diámetro horizontal de 13 mm y vertical de 12.5 mm en ojo derecho; 12 y 12 mm respectivamente para el ojo izquierdo, ángulos abiertos, cristalino transparente, el fondo de ojo es normal, papila naranja con excavación 0.3, sin datos de daño glaucomatoso. La presión intraocular fue de 20 mmHg en ambos ojos en la cita de 1ª vez y de 10 mmHg en la exploración bajo sedación que se realizó un mes después ya con tratamiento a base de dorzolamida al 2% cada 12 horas. La ecografía se encontró sin alteraciones con una longitud axial de 15.30 y 15.70 milímetros para ojo derecho e izquierdo respectivamente.

## **Caso 6**

Paciente masculino de 18 meses de edad que acude a revisión por el antecedente de madre, tía y abuela materna con diagnóstico de glaucoma congénito, producto de la G II, Cesárea I, gemelo II peso al nacer de 2350 gramos, perímetro cefálico 50 cm, apgar 7/9. A la biomicroscopia de ambos ojos se observan estrías de Haab en región inferior, cornea transparente con un diámetro horizontal de 13 mm y vertical de 12.5 mm en ojo derecho; 12 y 12.5 mm respectivamente para el ojo izquierdo, ángulos abiertos, cristalino transparente, el fondo de ojo sin alteraciones, papila naranja con excavación

0.3, sin datos de daño glaucomatoso. La presión intraocular fue de 22 mmHg en ambos ojos en la cita de 1ª vez y de 9 y 11 mmHg en la exploración bajo sedación que se realizó un mes después ya con tratamiento a base de dorzolamida al 2% cada 12 horas. La ecografía se encontró sin alteraciones con una longitud axial de 16.18 y 16.10 milímetros para ojo derecho e izquierdo respectivamente.



**Figura 8.** Foto clínica de la biomicroscopía del ojo derecho del paciente del caso 6; donde se ven las estrías de Haab muy tenues en la parte inferior.

### **6.3 Análisis Genético**

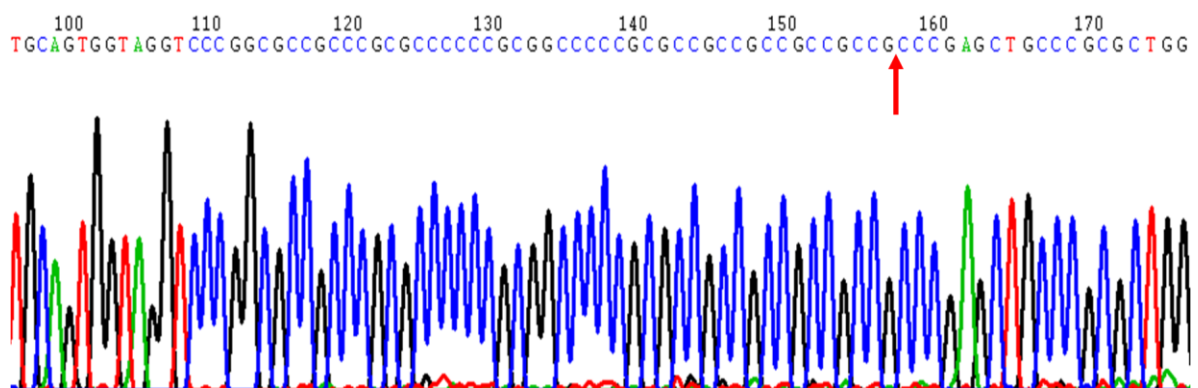
Después de secuenciar los exones y las uniones exón/intrón de los genes CYP1B1, MYOC, FOXC1, PITX2 y OPTN, no se identificaron mutaciones deletéreas asociadas a la enfermedad en ninguno de ellos. Se identificaron

diversos polimorfismos ya reportados en los genes CYP1B1 y OPTN (Tabla 5).

En el gen MYOC no se encontró polimorfismo alguno.

**Tabla 5.** Polimorfismos encontrados en los genes CYP1B1 y OPTN

Gen	Polimorfismo encontrado	Nucleótido	SNP	Referencias
CYP1B1	GAT → 449 → GAC Asp Asp	c1347	rs1056837	¡Error! Marcador no definido., ¡Error! Marcador no definido., i, ii, iii, iv, v, vi, vii..
OPTN	ACG → 41 → ACA Threo Threo	c123	rs11591687	¡Error! Marcador no definido., ¡Error! Marcador no definido., viii,ix, x, xi, xii, xiii, xiv, xv
	AAA → 322 → GAA Lys Glu	c964	rs523747	
	CAA → 546 → CAG Gln Gln	c1638	No reportada	
FOX C1	Inserción triplete GGC en posiciones 447 y 375 (figura 9 y 10) → se incorpora glicina.			xvi



**Figura 9.** Secuencia parcial del exón uno de FOXC1 de un control normal. La flecha señala el sitio donde se inserta el triplete.



paciente de la primera generación presenta un fenotipo de afección mucho más severo con importante pérdida de la visión, mientras que los pacientes de la tercera generación presentan un fenotipo menos avanzado (con pocas manifestaciones oftalmológicas). El fenotipo más severo en la primera generación puede ser secundario al mismo curso de la enfermedad, y probablemente a un manejo poco óptimo de la patología.

Para el análisis genético, se decidió la toma de la muestra de la paciente de la primera generación, porque como ya se ha mencionado, presenta el fenotipo más severo. Se tomaron en cuenta los genes asociados a glaucoma congénito previamente descritos en la literatura, aunque relacionados con un tipo de herencia autosómico recesivo. El gen CYP1B1 codifica para una proteína miembro del citocromo P450; en aquellos casos en los que se encuentra mutado, se asocia con glaucoma congénito, en diferentes poblaciones de Arabia Saudita, Turquía, Eslovaquia, Japón, Estados Unidos y Brazil. La mayoría de las mutaciones de CYP1B1 resultan en formas severas de glaucoma congénito.<sup>xvii</sup> El gen MYOC se ha involucrado como parte de la patogénesis de casos de GPC en asociación con CYP1B1;**Error! Marcador no definido.** las mutaciones en este gen se han relacionado con glaucoma juvenil de ángulo abierto y glaucoma primario de ángulo abierto de herencia autosómica dominante. El motivo de haber analizado este gen, fue para descartar que no estuviéramos ante un glaucoma juvenil con un fenotipo distinto e incluso de aparición más temprana. El gen OPTN se ha vinculado con glaucoma primario de ángulo abierto de presentación en la vida adulta y con glaucoma de tensión normal. Como también se ha asociado a una

herencia autosómica dominante, **¡Error! Marcador no definido.** se analizó para descartarlo como gen causal del glaucoma en la familia caso.

Siendo que el glaucoma congénito puede asociarse a un desarrollo anómalo del segmento anterior, fue necesario descartar mutaciones en los genes que podrían producirlo como son PITX2 y FOXC1.

Después de completar el análisis genético de los 5 genes, solamente se encontraron seis polimorfismos en los genes CYP1B1, OPTN y FOXC1; de los polimorfismos hallados, cinco ya han sido previamente reportados en la literatura. El polimorfismo encontrado en OPTN en el nucleótido c1638 (CAA → 546 → CAG) no ha sido reportado previamente, lo cual es una nueva aportación a la literatura de este gen. Es necesario estudios posteriores para conocer si este gen se encuentra relacionado con la familia caso.

En estudios recientes se ha identificado el gen LTBP2 asociado a glaucoma congénito de transmisión autosómica recesiva, en familias de Pakistan, Irak y de origen gitano.<sup>64,65</sup> Este gen se encuentra en el cromosoma 14q24.3, codifica una proteína de unión del factor de crecimiento beta, la cual es una proteína de matriz extracelular. Ali y cols, identificación esta proteína en el segmento anterior del ojo, en el cuerpo ciliar y en especial en los procesos ciliares. En el presente estudio no se realizó la secuenciación de dicho gen, ya que no existía el reporte en la literatura de su asociación con glaucoma congénito primario al momento de la realización del trabajo.

Ya que no se localizó mutación deletérea en los genes asociados a glaucoma hereditario (CYP1B1, MYOC, OPTN, PITX2, y FOXC1), se espera que la causa genética del glaucoma en esta familia se encuentre en otro gen no





## 8. REFERENCIAS

1. Papadopoulos M, Cable N, Rahi J, Khaw PT; BIG Eye Study Investigators. The British Infantile and Childhood Glaucoma (BIG) Eye Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48(9):4100-6.
2. Lin Ho C, Walton D. Primary Congenital Glaucoma: 2004 Update. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 2004; 41(5):271-288.
3. Miller S. Genetic aspects of glaucoma. *Transactions Ophthalmological Society of the United Kingdom* 1996; 86:425-434.
4. Debnath SC, Teichmann KD, Salamah K. Trabeculectomy versus trabeculotomy in congenital glaucoma. *Br J Ophthalmol* 1989; 73:608-611.
5. Taylor R, Ainsworth J, Evans A, Levin A. The epidemiology of pediatric glaucoma: the Toronto experience. *JAAPOS* 1999; 3: 308-315.
6. Hollander D, Sarfarazi M, Stoilov I, Wood I, Fredrick D, Alvarado J. Genotype and phenotype correlations in congenital glaucoma. *Trans Am Ophthalmol Soc* 2006; 104:183-195.
7. Radke N, Cohan B. Intraocular pressure measurement in the newborn. *Am J Ophthalmol* 1974; 78:501-504.
8. Pensiero S, Da Pozzo, Periss utti P y cols. Normal Intraocular pressure in children. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 1992;29-79.
9. Goethals M, Misssotten L. Intraocular pressure in children up to five years of age. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 1983; 20:49.51.
10. Kiskis A, Markowitz S, Morin J. Corneal diameter and axial length in congenital glaucoma. *Can J Ophthalmol* 1985; 20:96.
11. Sampaolesi R, Caruso R. Ocular echometry in the diagnosis of congenital glaucoma. *Arch Aphthalmol* 1982; 100:574-577.
12. Gringnolo A, Rivara A: Biometry of the human eye from the sixth month of pregnancy to the tenth year of life, in J Vanysek: *Diagnostica in Ophthalmologia*. Czechoslovakia, Universita JE Purkynje 1968, p. 251.
13. Weisschuh N, Scheifer U. Progress in the genetics of glaucoma. *Dev Ophthalmol.* 2003; 37:83-93.
14. El-Ashry MF, Abd El-Aziz MM, Bhattacharya SS. A clinical and molecular genetic study of Egyptian and Saudi Arabian patients with primary congenital glaucoma (PCG). *J Glaucoma.* 2007 Jan;16(1):104-11.
15. Hollander DA, Sarfarazi M, Stoilov I, Wood IS, Fredrick DR, Alvarado JA. Genotype and phenotype correlations in congenital glaucoma: CYP1B1 mutations, goniodysgenesis, and clinical characteristics. *Am J Ophthalmol.* 2006 Dec;142(6):993-1004. Epub 2006 Sep 1.
16. Sarfarazi M, Stoilov I, Schenkman JB. Genetics and biochemistry of primary congenital glaucoma. *Ophthalmol Clin North Am.* 2003 Dec;16(4):543-54, vi. Review.
17. Stoilov I, Akarsu AN, Sarfarazi M. Identification of three truncating mutations in cytochrome P4501B1 (CYP1B1) as the principal cause of primary congenital glaucoma (buphthalmos) in families linked to the GLC3A locus on chromosome 2p21. *Hum Mol Genet* 1997; 6:641-647.
18. Alfadhli S, Behbehani A, Elshafey A, Abdelmoaty S, Al-Awadi S. Molecular and clinical evaluation of primary congenital glaucoma in Kuwait. *Am J Ophthalmol.* 2006 Mar;141(3):512-6.
19. Kakiuchi-Matsumoto T, Isashiki Y, Ohba N, Kimura K, Sonoda S, Unoki K. Cytochrome P4501B1 gene mutations in Japanese patients with primary congenital glaucoma. *Am J Ophthalmol.* 2001 Mar;131(3):345-350.

20. Héon E, Martin N, Bilingsley G, Williams-Lyn D, Sutherland J, Levin A. Molecular characterization of congenital glaucoma in the Greater Toronto Area. *Invest Ophthalmol Vis Sci Suppl* 2002; 41:527.
21. Bejjani BA, Lewis RA, Tomey KF, Anderson KL, Dueker DK, Jabak M, Astle WF, Otterud B, Leppert M, Lupski JR. Mutations in CYP1B1, the gene for cytochrome P450B1, are the predominant cause of primary congenital glaucoma in Saudi Arabia. *Am J Hum Genet* 1998; 62:325-333.
22. Plášilová M, Stoilov I, Sarfarazi M, Kádasi L, Feráková E, Ferák V. Identification of a single ancestral CYP1B1 mutation in Slovak gypsies (Roms) affected with primary congenital glaucoma. *J Med Genet* 1999; 36:290-294.
23. Schwartzman ML, Balazy M, Masferrer J, Abraham NG, McGiff JC, Murphy RC. 12(R)-Hydroxyeicosatetraenoic acid: A cytochrome P450-dependent arachidonate metabolite that inhibits Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in the cornea. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:8125-8129.
24. Stoilov I, Costa V, Vasoncellos J, Melo M, Betinjane A, Carani J, Oltrogge E, Sarfarazi M. Molecular genetics of primary congenital glaucoma in Brazil. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002 Jun;43(6):1820-1827.
25. Vincent A, Billingsley G, Buys Y, Levin A, Priston M, Trope G, Williams-Lyn D, Heon E. Digenic inheritance of early-onset glaucoma: CYP1B1, a potential modifier gene. *Am J Hum Genet* 2002; 70:448-460.
26. Karali A, Russell P, Stefani FH, Tamm ER. Localization of myocilin/trabecular meshwork-inducible glucocorticoid response protein in the human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41:729-740.
27. Bayat B, Yazdani S, Alavi A, Chiani M, Chitsazian F, Khoramian T, Suri F, Narooie-Nejad M, Sanati M, Elahi E. Contributions of MYOC and CYP1B1 mutations in JOAG. *Molecular Vision* 2008; 14:508-517.
28. Stone EM, Fingert JH, Alward W. Identification of a gene that causes primary open-angle glaucoma. *Science* 1997; 275:668-670.
29. Shimizu S, Lichter PR, Johnson AT, Zhou Z, Higashi M, Gottfredsdottir M, Othman M, Moroi SE, Rozsa FW, Schertzer RM, Clarke MS, Schwartz AL, Downs CA, Vollrath D, Richards JE. Age-dependent prevalence of mutations at the *GLC1A* locus in primary open-angle glaucoma. *Am J Ophthalmol* 2000; 130:165-177.
30. Fingert JH, Héon E, Liebann JM, Yamamoto T, Craig JE, Rait J. Analysis of myocilin mutations in 1703 glaucoma patients from five different populations. *Hum Mol Genet* 1998; 8:899-905.
31. Kubota R, Noda S, Wang Y. A novel myosin-like protein (myocilin) expressed in the connecting cilium of the photoreceptor: Molecular cloning, tissue expression and chromosomal mapping. *Genomics* 1997; 41:360-369.
32. Adam MF, Belmouden A, Binisti P, Brezin AP, Valtot F, Bechetoille A, Dascotte JC, Copin B, Gomez L, Chaventre A, Bach JF, Garchon HJ. Recurrent mutations in a single exon encoding the evolutionarily conserved olfactomedin-homology domain of TIGR in familial open-angle glaucoma. *Hum Mol Genet* 1997; 6:2091-2097.
33. Wissinger B, Kohl S, Langerbeck U. Genetics in Ophthalmology. *Dev Ophthalmol* Basel, Karger, 2003, vol 37, pp 83-93.
34. Morissette J, Clepet C, Moison S, Dubois S, Winstall E, Vermeeren D, Nguyen TD, Polansky JR, Cote G, Anctil JL, Amyot M, Plante M, Falardeau, Raymond. Homozygotes carrying an autosomal dominant TIGR mutation do not manifest glaucoma. *Nat Genet* 1998; 19:319-321.
35. Jacobson N, Andrews M, Shepard AR, Nishimura D, Searby C, Fingert JH, Hageman G, Mullins R, Davidson BL, Kwon YH, Alward WL, Stone EM, Clark AF, Sheffield VC. Non-secretion of mutant proteins of the glaucoma gene myocilin in cultured trabecular meshwork cells and in aqueous humor. *Hum Mol Genet* 2001; 10:117-125.

36. Ueda J, Wentz-Hunter K, Yue BY. Distribution of myocilin and extracellular matrix components in the juxtacanalicular tissue of human eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43:1068-1076.
37. Borrás T, Rowlette LLS, Tamm ER, Gottanka J, Epstein DL. Effects of elevated intraocular pressure on outflow facility and TIGR/MYOC expression in perfused human anterior segments. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43:33-40.
38. Fautsch MP, Bahler CK, Jewison DJ, Johnson DH. Recombinant TIGR/MYOC increases outflow resistance in the human anterior segment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41:4163-4168.
39. Faber PW, Barnes GT, Srinidhi J, Chen J, Gusella JF, MacDonald ME. Huntingtin interacts with a family of WW domain proteins. *Hum Mol Genet* 1998; 7:1463-1474.
40. Moreland RJ, Dresser ME, Rodgers JS, Roe BA, Conaway RC, Conaway JS, Hanas JS. Identification of a transcription factor III-A interacting protein. *Nucleic Acid Res* 2000; 28:1986-1993.
41. Hattula K, Peranen J. FIP-2, a coiled-coil protein, links Huntingtin to Rab8 and modulates cellular morphogenesis. *Curr Biol* 2000; 10:1603-1606.
42. Yuan L, Neufeld AH. Tumor necrosis factor- $\alpha$ : A potentially neurodestructive cytokine produced by glia in the human glaucomatous optic nerve head. *Glia* 2000; 32:42-50.
43. Tezel G, Wax MB. Increased production of tumor necrosis factor- $\alpha$  by glial cells exposed to simulated ischemia or elevated hydrostatic pressure induces apoptosis in cocultured retinal ganglion cells. *J Neurosci* 2000; 23:8693-8700.
44. Rezaie T, Child A, Hitchings R, Brice G, Miller L, Coca-Prados M, Heón E, Krupin T, Ritch R, Kreutzer D, Crick RP, Sarfarazi M. Adult-onset primary open-angle glaucoma caused by mutations in optineurin. *Science* 2002; 295:1077-1079.
45. Nishimura D, Swiderski R, Alward W, Searby C, Patil S, Bennet S, Kanis A, Gastier Jm Stone E, Sheffield V. The forkhead transcription factor gene FKHL7 is responsible for glaucoma phenotypes which map 6p25. *Nature Genet* 1998; 19:140-147.
46. Nishimura D, Searby C, Alward W, Walton D, Craig J, Mackey D, Kawase K, Kanis A, Patil S, Stone E, Sheffield V. 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* 2001; 68:364-372.
47. Hirata H, Hinoda Y, Okayama N, Suehiro Y, Kawamoto K, Kikuno N, Rabban J, Chen L, Dahiya R. CYP1A1, SULT1A1, and SULT1E1 polymorphisms are risk factors for endometrial cancer susceptibility. *Cancer* 2008; 112(9):1964-1973.
48. Van Emburgh B, Hu J, Levine E, Mosley L, Perrier N, Freimanis R, Allen G, Rubin P, Sherrill G, Shaw C, Carey L, Sawyer L, Miller M. Polymorphisms in CYP1B1, GSTM1, GSTT1 and GSTP1, and susceptibility to breast cancer. *Oncol Rep* 2008; 19(5):1311-1321.
49. Crous-Bou M, De Vivo I, Porta M, Pumarega J, Lopez T, Alguacil J, Morales E, Malats N, Rifa J, Hunter D, Real F. CYP1B1 polymorphisms and k-ras mutations in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Dig Dis Sci* 2008; 53(5):1417-1421.
50. Lubinski J, Korzen M, Gorski B, Cybulski C, Debniak T, Jakubowska A, Jaworska K, Wokolorczyk D, Medrek K, Matyjasik J, Huzarski T, Byrski T, Gronwald J, Masojc B, Lener M, Szymanska A, Szymanska-Pasternak J, Serrano-Fernandez P, Piegat A, Uciniski R, Domagala P, Domagala W, Chosia M, Klady J, Gorecka B, Narod S, Scott R. Genetic contribution to all cancers: the first demonstration using the model of breast cancers from Poland stratified by age at diagnosis and tumour pathology. *Breast Cancer Res Treat* 2008. En publicación.
51. Tang Y, Wo Y, Stewart J, Hawkins A, Griffin C, Sutter T, Greenlee W. Isolation and characterization of the human cytochrome P450 CYP1B1 gene *J Biol Chem* 1996; 271(45):28324-28330.
52. Sutter T, Tang Y, Hayes C, Wo Y, Jabs E, Li X, Yin H, Cody C, Greenlee, W. Complete cDNA sequence of a human dioxin-inducible mRNA identifies a new gene subfamily of

- cytochrome P450 that maps to chromosome 2. *J Biol Chem* 1994; 269(18):13092-13099.
53. Sutter T, Guzman K, Dold K, Greenlee W. Targets for dioxin: genes for plasminogen activator inhibitor-2 and interleukin-1 beta. *Science* 1991; 254(5030):415-418.
  54. Caixeta-Umbelino C, de Vasconcellos J, Costa V, Kasahara N, Della Paolera M, de Almeida G, Cohen R, Mandia C Jr, Rocha M, Richeti F, Longui C, de Melo M. Lack of association between optineurin gene variants T34T, E50K, M98K, 691\_692insAG and R545Q and primary open angle glaucoma in Brazilian patients. *Ophthalmic Genet* 2009; 30(1):13-18.
  55. Jia L, Tam P, Chiang S, Ding N, Chen L, Yam G, Pang C, Wang N. Multiple gene polymorphisms analysis revealed a different profile of genetic polymorphisms of primary open-angle glaucoma in northern Chinese. *Mol Vis* 2009; 15:89-98.
  56. Li X, Magenheimer B, Xia S, Johnson T, Wallace D, Calvet J, Li R. A tumor necrosis factor-alpha-mediated pathway promoting autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nat Med* 2008; 14(8): 863-868.
  57. Liu Y, Akafo S, Santiago-Turla C, Cohen C, Larocque-Abramson K, Qin X, Herndon L, Challa P, Schmidt S, Hauser M, Allingham R. Optineurin coding variants in Ghanaian patients with primary open-angle glaucoma. *Mol Vis* 2008; 14:2367-2372.
  58. Yen Y, Yang J, Chou M, Li S. Absence of optineurin (OPTN) gene mutations in Taiwanese patients with juvenile-onset open-angle glaucoma. *Mol Vis* 2008; 14:487-494.
  59. Fong K, de Couet H. Novel proteins interacting with the leucine-rich repeat domain of human flightless-I identified by the yeast two-hybrid system. *Genomics* 1999; 58(2):146-157.
  60. Sarfarazi M, Child A, Stoilova D, Brice G, Desai T, Trifan O, Poinoosawmy D, Crick R. Localization of the fourth locus (GLC1E) for adult-onset primary open-angle glaucoma to the 10p15-p14 region. *Am J Hum Genet* 1998; 62(3):641-652.
  61. Li Y, Kang J, Horwitz M. Interaction of an adenovirus E3 14.7-kilodalton protein with a novel tumor necrosis factor alpha-inducible cellular protein containing leucine zipper domains. *Mol Cell Biol* 1998; 18(3):1601-1610.
  62. Cella W, Cabral J, Barbosa M, Kneipp B, Ferreira F, Longui C, Paulino V. Structural assessment of PITX2, FOXC1, CYP1B1, and GJA1 Genes in Patients with Axenfeld-Rieger Syndrome with Developmental Glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis* 2006; 47:1803-1809.
  63. Tsuchiya Y, Nakajima M, Kyo S. Human CYP1B1 is regulated by estradiol via estrogen receptor. *Cancer Res* 2004; 64:3119-3125.
  64. Ali M, McKibbin M, Booth A, Parry D, Jain P, Riazuddin S, Hejtmanick J, Khan S, Firast S, Shires M, Gilmor D, Towns K, Murphy A, Azamanov D, Tournev I, Cherninkova S, Jafri H, Raashid Y, Toomes C, Craig J, Mackey DA, Kalaydjieva L, Riazuddin S, Inglehearn C. Null mutations in LTBP2 cause primary congenital glaucoma. *Am J Hum Genet* 2009; 84(5):664-71.
  65. Narooie-Nejad M, Paylakhi S, Shojaee S, Fazlali Z, Kanavi M, Nilforuchan N, Yazdani S, Babrzadeh F, Suri F, Ronaghi M, Elahi E, Paisán-Ruiz C. Loss of Function Mutations in the Gene Encoding Latent Transforming Growth Factor Beta Binding Protein 2, LTBP2, Cause Primary Congenital Glaucoma. *Hum Mol Genet* 2009, Ago 4.

## **ANEXO**

### **Texto Informativo para el Paciente**

Estimado paciente:

Queremos informarle que en el Instituto de Oftalmología, se esta llevando a cabo el estudio denominado: “Estudio clínico genético de una familia mexicana con glaucoma congénito autosómico dominante”.

El objetivo del estudio es determinar la causa genética del glaucoma cogénito de transmisión autosómica dominante en la familia a la que usted pertenece. Para ello se analizará de manera secuencial los genes conocidos hasta el día de hoy relacionados con el glaucoma congénito.

Para lograr tal objetivo es indispensable su participación permitiéndonos la exploración oftalmológica completa (en caso de los pacientes pediátricos, será bajo sedación), toma de fotografías clínicas y obtención de muestra sanguínea venosa mediante punción. Es importante aclarar que en ningún momento su salud estará comprometida.

Queremos aprovechar la oportunidad para invitarle a participar en este estudio, aclarándole que en caso de que no acepte participar, esta negativa no tendrá ninguna repercusión en la atención de usted en el Instituto. Si acepta participar debe saber que tiene el derecho de retirar su participación en el momento que lo desee, sin que al retirarse del estudio repercuta de manera negativa en la atención que está recibiendo usted.

La información que se obtenga del estudio será estrictamente confidencial y será utilizada solo para fines de investigación y enseñanza. Los resultados se le darán a conocer a usted en caso de que así lo desee.

Las preguntas que considere necesarias para aclarar todas sus dudas las puede externar con la Dra. Diana Alvarez Melloni al teléfono 04455-1048-6084 las 24 horas del día.

Muchas gracias por su atención.

### **Carta Consentimiento Informado**

YO \_\_\_\_\_

(nombre del paciente)

Declaro que he leído la información correspondiente, que se me han aclarado las dudas y que voluntariamente estoy de acuerdo en participar en el estudio denominado “Estudio clínico genético de una familia mexicana con glaucoma congénito autosómico dominante” cuyos objetivos, procedimientos, beneficios y riesgos se me han explicado previamente.

Es de mi conocimiento que los investigadores me han ofrecido aclarar cualquier duda o contestar cualquier pregunta que, al momento de firmar la presente, no hubiese expresado o que surja durante el desarrollo de la investigación.

Se me ha manifestado que puedo retirar mi consentimiento en cualquier momento sin que ello signifique que la atención médica que se me proporciona se vea afectada por este hecho.

Se me ha informado que mi participación en este estudio no repercutirá en el costo de la atención médica que se me brinda y que toda la información que se obtenga sobre mi persona será confidencial, excepto cuando yo lo autorice.

Firmo la presente frente al investigador que me informó y dos testigos, conservando una copia del consentimiento informado y del texto informativo para obtener mi autorización.

México D.F. a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ del 200\_\_.

\_\_\_\_\_

Firma del paciente o tutor

\_\_\_\_\_

Firma del testigo

\_\_\_\_\_

Firma del testigo