



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**BÚSQUEDA DE MUTACIONES EN EL GEN *ADAMTSL4* COMO CAUSA DE
ECTOPIA LENTIS AISLADA AUTOSÓMICA RECESIVA.**

TESIS DE POSGRADO

**PARA OBTENER EL DIPLOMA DE
ESPECIALIDAD EN GENÉTICA MÉDICA**

PRESENTA:

DR. LAUTARO PLAZA BENHUMEA

ASESORES DE TESIS: DR. SERGIO CUEVAS COVARRUBIAS

DRA. MARÍA DEL REFUGIO RIVERA VEGA



**Hospital General
de México**

**“A la Vanguardia en el
Cuidado de la Vida”**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**BÚSQUEDA DE MUTACIONES EN EL GEN *ADAMTSL4* COMO CAUSA DE
ECTOPIA LENTIS AISLADA AUTOSÓMICA RECESIVA.**

PRESENTA:

DR. LAUTARO PLAZA BENHUMEA

TUTORES:

DR. SERGIO ALBERTO CUEVAS COVARRUBIAS

DRA. MARÍA DEL REFUGIO RIVERA VEGA

COLABORADOR:

M en C. LUZ MARÍA GONZÁLEZ HUERTA

Laboratorio de Biología Molecular

Departamento de Genética Médica, Hospital General de México



**Hospital General
de México**

**"A la Vanguardia en el
Cuidado de la Vida"**



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

DR. SERGIO ALBERTO CUEVAS COVARRUBIAS

JEFE DEL SERVICIO DE GENÉTICA

HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO

DRA. MARÍA DEL REFUGIO RIVERA VEGA

MÉDICO ADSCRITO AL SERVICIO DE GENÉTICA

HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO

ASESORA DE TESIS



**Hospital General
de México**

**“A la Vanguardia en el
Cuidado de la Vida”**

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por apoyarme una vez más en este proyecto como en todos los que he emprendido.

Al Hospital General de México por formarme como especialista dentro de sus muros y ser parte de esta gran institución.

A cada una de las personas que me han ayudado, enseñado, apoyado y que han estado ahí conmigo para que pudiera lograr lo que he querido.

Gracias a todos una vez más.....

ÍNDICE

I.- SIGLAS Y ABREVIATURAS	7
II.- RESUMEN	8
III.-ANTECEDENTES	10
1.- Incidencia y Prevalencia	10
2.-Manifestaciones Clínicas	13
3.- Genética de la Ectopia Lentis.	14
Defectos en la posición del cristalino	14
Enfermedades Heredo Familiares con Ectopia Lentis	18
Naturaleza del Aparato Zonular	19
Ectopia Lentis Aislada	20
Proteinasas ADAMTS	21
Evolución y Estructura de las Proteinasas ADAMTS	22
ADAMTSL Estructura y Dominios	26
Proteinasas ADAMTSL Hialecanasas 1,4,5,8,9,15	30
IV.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	36
V.- OBJETIVOS GENERALES	36
VI.- OBJETIVOS PARTICULARES	36
VII.-HISTORIA FAMILIAR	37
VIII.- DISEÑO DEL ESTUDIO	39
IX.- MATERIAL Y MÉTODOS	40

1.-Población Incluida en el Estudio	
2.- Extracción del DNA Genómico	
A) Obtención de muestra	
B) Diseño de oligonucleótidos y PCR	
D) Purificación del fragmento amplificado y productos de extensión	
3.- Reacción de secuenciación	
4.- Purificación de los productos de extensión	
5.- Montaje en el equipo de secuenciación	
X.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
XI.- APÉNDICE	53
1.- Secuencia del gen <i>ADAMTSL4</i>	
XII.- GLOSARIO	57
XIII.- REFERENCIAS	59

I.- SIGLAS Y ABREVIATURAS

ADAMTSL4 (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 4)

ADAM (a disintegrin and metalloproteinase)

EL Ectopia Lentis

AD Autosómico Dominante

AR Autosómico Recesivo

LOH (LOSS OF HETEROZIGOSIDAD) Pérdida de heterocigocidad

CRD dominio rico en cisteínas.

PCR Reacción en Cadena de la Polimerasa.

TSR Repetido de Trombospondina Tipo-1 (TSR).

MMP Metaloproteinasa.

EGF-like Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF)-like

ECM Matriz Extra-Celular (ECM)

kDa kilodaltons

IGD Dominio Interglobular (IGD)

ARNm ARN mensajero

ADNc

TSP1 Tipotrombospondina-1(TSP1)

II.- RESUMEN

La ectopia lentis (EL) o desplazamiento del cristalino es una condición genéticamente heterogénea que se caracteriza por la subluxación del cristalino resultante de la disrupción de las fibras zonulares. Los pacientes con ectopia lentis suelen presentar una marcada pérdida de la agudeza visual, además de una serie de posibles complicaciones oculares que la acompañan, como son las cataratas, la miopía y desprendimiento de retina. Se han descrito formas sindrómicas, autosómicas dominantes y más recientemente formas aisladas de la ectopia del cristalino en familias consanguíneas que muestra un patrón de herencia autosómico recesivo. Actualmente, existen reportes de mutaciones homocigotas en el gen *ADAMTSL4* asociadas a ectopia lentis, lo cual ha impulsado un interés en la búsqueda de nuevas mutaciones, así como el papel que desempeña su producto protéico en el desarrollo y/o la integridad de las fibras zonulares. Del mismo modo se plantea la necesidad de generar un asesoramiento genético más exacto e incluso abrir las puertas para posibles diagnósticos prenatales.

El objetivo del presente estudio es analizar clínica y genéticamente a una familia mexicana afectada en varios de sus integrantes con ectopia lentis, para lo cual se eligió amplificar y secuenciar el gen *ADAMTSL4* en los pacientes afectados en busca de posibles mutaciones como explicación a su padecimiento.

Se realizó amplificación por PCR de los 19 exones del gen *ADAMTSL4* en el probando, en familiares en primer orden y controles asintomáticos. La secuenciación de todos los exones no mostró cambios comparándolos con los controles sanos ni con la base de datos de NCBI. La ausencia de mutaciones en el gen *ADAMTS 4* en los presentes casos de ectopia lentis, deja expuesta la gran heterogeneidad del padecimiento y sugiere la posible participación de otros genes en la génesis de la ectopia lentis.

III.- ANTECEDENTES

La luxación del cristalino es un trastorno conocido por más de dos siglos (1,2). La luxación traumática del cristalino que se conoce desde hace varios siglos, hace una clara distinción entre dislocaciones espontáneas y traumáticas, ésta se dio sólo a partir de la publicación del artículo Sichel en 1846. Posteriormente en 1859 Sippel (quien sufría de ectopia lentis congénita), estableció una distinción entre la forma congénita y las formas secundarias.

La luxación del cristalino es una enfermedad rara, la incidencia exacta en la población general se desconoce, aunque algunos datos hablan de una prevalencia de 8 en 100 000 en los Estados Unidos y de 6 en 100 000 en población danesa, en donde la causa más común de ectopia del cristalino es la traumática siendo casi la mitad de todos los casos de luxación del cristalino (6). La clasificación que se utilizan actualmente distingue entre primaria (congénita) y secundaria (adquirida) (3).

Las luxaciones adquiridas o secundarias del cristalino pueden ser de origen traumático (la causa más frecuente), espontáneas (secundarias a otras patologías oculares) y post-quirúrgicas (4). Las luxaciones espontáneas se producen por la rotura de las fibras zonulares como consecuencia de procesos degenerativos e inflamatorios, en el glaucoma de larga evolución, en el desprendimiento de retina y en el síndrome de pseudoexfoliación (3-5). Las luxaciones post-cirugía de catarata son por rotura de la cápsula posterior y son relativamente frecuentes (5). Finalmente las luxaciones congénitas de cristalino o

ectopia lentis pueden aparecer en formas sindrómicas bien caracterizadas como en la homocistinuria (subluxación bilateral ínferonasal), en el síndrome de Marfán (subluxación del cristalino superior y bilateral) y el síndrome de Weill-Marchesani (microesferofaquia). (Ver tabla 1)

Tabla 1

CAUSAS DE ECTOPIA LENTIS	
Trauma perforante y no perforante	
Secundario a proceso ocular	Estafilomas, ectasia
	Buftalmia
	Miopía
	Catarata hipermadura
	Sífilis, uveítis crónica
	Úlceras corneales perforadas
	Dislocación por tumores
Etiología desconocida, posiblemente heredofamiliar	Síndrome de Pseudoexfoliación
Enfermedades Sistémicas Heredofamiliares	Síndrome de Marfán
	Variantes de Marfán: Aracnodactilia Contractural Congénita, Síndrome de Marfán Asimétrico
	Homocistinuria
	Weill-Marchesani
	Esferofaquia Dominante (Mc-Gavic's)
	Ectopia Lentis Simple
	Ectopia Lentis et Pupillae
	Hiperlisinemia
	Deficiencia de Sulfito-oxidasa
Enfermedades Sistémicas Heredofamiliares poco asociadas	Oxicefalia
	Aniridia con microcórnea
	Síndrome de Conradi
	Síndrome de Pfaundler
	Síndrome de Crouzon
	Síndrome de Pierre-Robin
	Síndrome de Ehlers-Danlos
	Pseudomarfanismo Familiar
	Síndrome de Kniest
	Disostosis Mandíbulo-facial
	Megaloftalmos
	Síndrome de Sturge-Weber
	Deformidad de Sprengel
	Síndrome de Refsum
	Síndrome de Wildervanck
	Talla baja proporcional asociada a Ectopia Lentis

El término Ectopia Lentis designa a las formas congénitas o hereditarias, donde el conocimiento del espectro clínico y genético de esta entidad se ha desarrollado considerablemente durante este siglo identificando a la ectopia como una característica común de varias y diferentes enfermedades oftalmológicas y sistémicas (6).

Manifestaciones Clínicas

El cuadro clínico de ectopia del cristalino es muy característico, en la infancia la lesión se puede demostrar sólo en los casos más pronunciados, pero los signos y síntomas del cristalino deficiente se van acentuando gradualmente a medida que las diversas partes del ojo crecen de tamaño en el niño. Los síntomas subjetivos son particularmente difíciles de detectar en la infancia, los cuales consisten principalmente en diferentes grados de pérdida de la visión. Si el cristalino se mantiene en su eje principal el resultado será una miopía debido al aumento de la curvatura causada por la desaceleración de la aparato zónular. Si la pupila está completamente afásica el paciente está en un estado como si se hubiese operado por catarata. Ambos dan la vuelta al eje vertical así como al horizontal y producen la luxación lateral del cristalino que es la de mayor frecuencia provocando un astigmatismo.

La pupila parcialmente afásica puede dar lugar a una diplopía monocular, que es especialmente desagradable, ya que a menudo está presente en ambos ojos causando cuadriplopía .

La exploración física muestra una cámara con gran profundidad, el iris sobresale de la zona del cristalino, la Iridodonesis es un signo casi constante y es más pronunciada en la parte del iris que está libre del cristalino.

Las pupilas son generalmente pequeñas y reaccionan mal a los midriáticos, a menudo son ectópicas, usualmente en una dirección opuesta a la de la ectopia lentis. El cristalino se desvía por regla hacia arriba de manera asimétrica. Por transiluminación el borde del cristalino se ve como una línea de color negro. Y podemos obtener una imagen doble distintiva del fundus (en el caso de los cristalinos translúcidos).

En el caso de la luxación severa se puede ver el borde del cristalino cruzando la pupila cuando ésta es de tamaño moderado. En la dislocación menos pronunciada ésta sólo puede obtenerse por la dilatación artificial de la pupila. En ocasiones podemos observar temblor del cristalino. El cristalino ectópico es frecuentemente más pequeño de lo normal y a veces también deformada. La zónula de Zinn es a menudo visible en la lámpara de hendidura. Puede ser atrófica o ausente del todo, y en la zona áfaca el vítreo sobresale hacia la cámara.

DEFECTOS EN LA POSICIÓN DEL CRISTALINO

Hay también anomalías congénitas que pueden tener un origen mesodérmico afectando la posición del cristalino en el globo. La ectopia lentis o el desplazamiento del cristalino, es quizás la más

común de las anomalías congénitas lenticulares que no corresponden a la catarata. Esta condición suele ser bilateral y puede ser causada por una malformación extensa de las fibras zonulares, dando como resultado el desplazamiento del cristalino en dirección opuesta a la zona de la zónulas afectados. El desplazamiento, generalmente superior (o superomedial), es el mismo en ambos ojos. Posteriormente la luxación espontánea del cristalino en la cámara anterior o en el humor vítreo puede ser una secuela asociada a la ectopia lentis. Seguido a la luxación espontánea, el cristalino se convierte en una estructura cataratosa desarrollando y con ello otras complicaciones como el desarrollo de una elevada presión intraocular.

La ectopia del cristalino puede presentarse como una entidad aislada o puede estar asociada con otras anomalías oculares. También puede ser una secuela de la enfermedad sistémica mesodérmica, como en el síndrome de Marfán o Weill-Marchesani, y puede ser una complicación de trastornos metabólicos generales, como la homocistinuria.

Las siguientes son las condiciones con su herencia asociadas con ectopia del cristalino.

I. Anomalía aislada

A. Ectopia lentis simple (autosómica dominante)

B. Subluxación espontánea tardía (ninguno)

II. Trastornos oculares asociados con ectopia del cristalino

A. Desplazamiento del Cristalino et pupila (autosómica recesiva)

B. La aniridia (autosómica dominante o esporádica)

- C. Megalocórnea (ligada al X, autosómica dominante o recesiva, o esporádico)
- D. La retinitis pigmentosa (ligada al X, autosómica dominante o recesiva, o esporádico)
- E. Córnea plana
- F. Coloboma (autosómica dominante o recesivo, o esporádico)
- G. Hiperplasia primaria de vítreo persistente (ninguno)
- H. Trauma (ninguno)
- I. La sífilis (ninguno)
- J. Microesferofaquia (autosómica dominante o esporádica)
- K. Buftalmos (ninguno)

III. Trastornos sistemáticos con ectopia del cristalino

- A. Síndrome de Marfán (autosómica dominante)
- B. Homocistinuria (autosómica recesiva)
- C. El síndrome de Weill-Marchesani (autosómica recesiva)
- D. Ehlers-Danlos (autosómica dominante)
- E. Síndrome de Rieger's (autosómica dominante)
- F. El síndrome de Treacher Collins (autosómica dominante)
- G. Hiperlisinemia (autosómica recesiva)
- H. Pfaundler-Hurler síndrome (autosómica recesiva)
- I. Sulfito oxidasa deficiencia (autosómica recesiva)
- J. Síndrome de Alpert (autosómica recesiva)
- K. Síndrome de Treacher Collins (autosómica dominante)
- L. Síndromes similares a Marfán (autosómica dominante)

En la ectopia del cristalino sin complicaciones, las zónulas suelen estar presentes, pero son pocas y muy separadas unas de otras. El cristalino tiende a asumir una forma esférica y es más pequeño de lo normal, lo que sugiere que las fibras zonulares se debilitan. El cristalino suele estar claro al comienzo, pero puede convertirse en catarata más tarde.

La ectopia del cristalino complicado por otros trastornos oculares, como ectopia pupilar primaria, muestra los mismos síntomas en ectopia simple, salvo que en este caso la pupila suele ser deforme y en forma de rendija. Ambas, la ectopia simple y la ectopia complicada tienen fuertes tendencias hereditarias. El primero es, en su mayor parte, transmitida como un rasgo dominante, mientras que la segunda suele ser recesiva. Como se señaló anteriormente, hay al menos diez enfermedades sistémicas asociadas con ectopia del cristalino. De ellas, el síndrome de Marfán, síndrome de Weill-Marchesani, y la homocistinuria representan más de 75% de las luxaciones del cristalino. Histológicamente, hay cambios similares relacionados con las zónulas en la homocistinuria y en el síndrome de Weill-Marchesani, los cuales se caracterizan por luxación inferior de ambos cristalinios. A nivel histológico, la degeneración de las fibras zonulares filamentosos produce una gruesa capa de PAS-positivo que cubre el epitelio ciliar. En la microscopía electrónica se muestran las fibrillas zónulares más finas y sin la alineación paralela normal. Curiosamente, la cápsula del cristalino aparece más delgada y las pantallas de la capa granular reticular muestran un arreglo desordenado de fibrillas. Por el contrario,

la dislocación general superior del cristalino, que se produce en aproximadamente 80% de los pacientes con síndrome de Marfán, se caracteriza principalmente por un aparente desarrollo retardado del ángulo de los ojos y mal desarrollo de los procesos ciliares. Las zónulas, que son pocas y mal formadas, están compuestas por fibrillas dispuestas al azar (Ver figura. 1), en contraste con la alineación paralela típica de las zónulas normales.

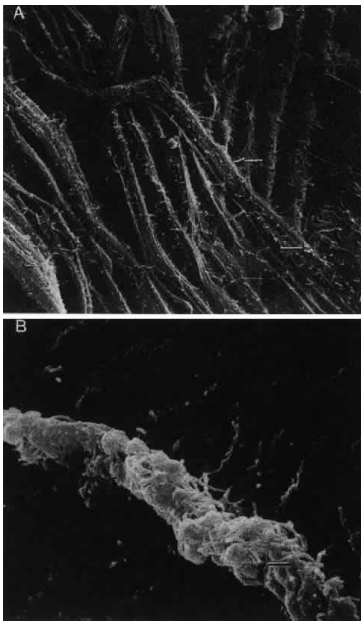


Figura 1 Escaneo con microscopio electrónico de barrido de las zónulas en las regiones ecuatoriales posteriores a los cristalinios de humanos. A. El cristalino normal muestra zónulas bien organizadas compuestas de fibrillas paralelas. B. Una cristalino de un paciente con síndrome de Marfán muestra fibras zonulares irregulares y mal formados. En este caso la composición fibrilar de la cápsula también se altera y es irregular. (Farnsworth PN, P Burke, ME Dotto, AA Cinotti: las alteraciones ultraestructurales en un cristalino de síndrome de Marfán. Arch Ophthalmol 95:1601, 1977)

Enfermedades Heredo Familiares con Ectopia Lentis

En ausencia de un traumatismo significativo, la luxación bilateral del cristalino con o sin signos sistémicos de otro tipo suele deberse a una anomalía genética. Un número limitado de enfermedades sistémicas se han asociado con luxación de cristalino siendo la mayoría enfermedades del tejido conectivo (véase tabla1). En una muestra

representativa de 310 niños que requirieron cirugía por la dislocación del cristalino, Seetner y Crawford encontraron que 16 tenían síndrome de Marfán, 7 tenían ectopia lentis idiopática, 4 tenían homocistinuria, 2 tenían ectopia lentis et pupila y 1 tenía una condición heredofamiliar de tipo desconocido. El reconocimiento de la luxación a cualquier edad requiere una mayor investigación para descartar síndromes hereditarios que pueden ser fatales o morbilidad significativa si no se tratan adecuadamente. El tratamiento, como la restricción dietética en la homocistinuria y la reparación de una ampliación de la aorta antes del desarrollo de aneurisma disecante en el síndrome de Marfán, puede ser sólo parcialmente efectivo. Debido a la superposición de signos y una escasez de pruebas específicas, el diagnóstico de muchos de estos síndromes del tejido conectivo se vuelve una tarea difícil, pero con los avances en biología molecular ha sido posible la identificación de defectos en genes específicos y con ello la realización de diagnósticos de certeza que permitan un enfoque terapéutico más exitoso.

NATURALEZA DEL APARATO ZONULAR

El **ligamento suspensorio del cristalino**, también conocido como **zónula de Zinn**, **zónula ciliaris**, **fibras zonulares** o **zónula**, es una estructura del ojo compuesta por una serie de fibras y filamentos que sirven para que el cristalino mantenga su posición y forma.

Las fibras se unen por un extremo a la zona más externa del cristalino (la cápsula) y por el otro a una parte del ojo que se llama cuerpo ciliar,

estos filamentos forman una compleja estructura tridimensional y poseen una gran capacidad de distensión sin llegar a romperse.

En el cuerpo ciliar existe un pequeño músculo que se denomina músculo ciliar, la contracción del músculo ciliar hace que se relajen las fibras que constituyen el ligamento suspensorio y como consecuencia el cristalino cambia de forma y se hace mas esférico, aumentando su capacidad de refracción para poder enfocar objetos cercanos.

Las fibrillas zonulares están compuestas de glicoproteínas ricas en cisteínas cuyos principales componentes proteicos son la fibrilina-1, una proteína de 13-kDa y de 350 aa codificada en el cromosoma 15q21, y el oxitalán. Las fibrillas zonulares son parte del sistema elástico y por ende su afección condiciona la dislocación del cristalino en enfermedades del tejido conectivo.

ECTOPIA LENTIS SIMPLE (AISLADA)

La ectopia lentis simple se transmite generalmente como una enfermedad autosómica dominante. Lo más común es que se presente en el nacimiento, con desplazamiento del cristalino hacia arriba y temporal, pero no tiene evidencia de enfermedad cardiovascular y son nulas o mínimas las manifestaciones óseas. El análisis genético en familias con este trastorno ha demostrado la vinculación, con en el síndrome de Marfán, en el gen que codifica para la fibrilina-1 (FBN1) en el cromosoma 15. También como en el

síndrome de Marfán, las mutaciones con frecuencia sustituyen un sólo aminoácido en dominios que pueden interferir con la unión del calcio entre las microfibrillas. Los cristalinos suelen ser pequeños y esféricos. En algunas familias, la aparición de la ectopia se retrasa, presentando incluso en las sexta y séptima década con una tendencia al desplazamiento hacia abajo. Dos estudios de microscopía electrónica en barrido de los cristalinos de ectopia lentis simples, mostraron estructuras de cristalino pequeñas, esféricas con deficiencia marcada de las fibras zonulares, una agregación pobres de las fibras presentes, y focalmente algunas fibrillas demasiado gruesas de tipo zonular.

PROTEINASAS ADAMTS

Las proteínas ADAMTS de las siglas en ingles (**a disintegrin and metalloproteinase with thrombo-spondin motifs**) son un grupo de enzimas proteinasas que son secretadas, de las cuales muchas se han encontrado expresadas en el cartílago [30] (véase tabla 2). Investigaciones funcionales de estas enzimas se han limitado en gran parte a unos pocos miembros específicos, en particular ADAMTS-4, que se ha implicado en la progresión de la artritis [31,32].

Tabla 2.

Biological activities of ADAMTSs		
Enzyme	Substrate	Activity
ADAMTS-1	Aggrecan, versican, α_2 -macroglobulin	Cleavage of proteoglycan core proteins, anti-angiogenic
ADAMTS-2	Procollagen I, procollagen II	Processing of N-propeptide of procollagen
ADAMTS-3	Procollagen II	Processing of N-propeptide of procollagen
ADAMTS-4	Aggrecan, versican, brevican	Cleavage of proteoglycan core proteins
ADAMTS-5	Aggrecan	Cleavage of aggrecan core protein
ADAMTS-8		Anti-angiogenic
ADAMTS-13	von Willebrand factor	Reduced activity results in thrombotic Thrombocytopenic purpura
ADAMTS-14	Procollagen I	Procollagen N-proteinase

ADAMTS, a disintegrin and metalloproteinase domain with thrombospondin motif.

Evolución y Estructura de las Proteinasas ADAMTS.

Las proteinasas ADAMTS fueron descritas por vez primera en ratones por el investigador Kuno y sus colegas en 1997 [33], y posterior a esto, se han ido identificando más en mamíferos y *Caenorhabditis elegans*. Forman parte de la subfamilia B (subfamilia adamalinas), de la familia M12, de las metaloproteinasas, tal como se definen en la base de datos MEROPS [34,35], y están evolutiva y estructuralmente relacionadas con las enzimas ADAM del inglés (**a** desintegrin **and** metaloproteinase: también parte de la subfamilia adamalinas) y más lejanamente, de las metaloproteinasas (MMP de la familia M10).

Una comparación de la organización de los dominios entre estos grupos de proteinasas se muestra en la (ver figura. 2).

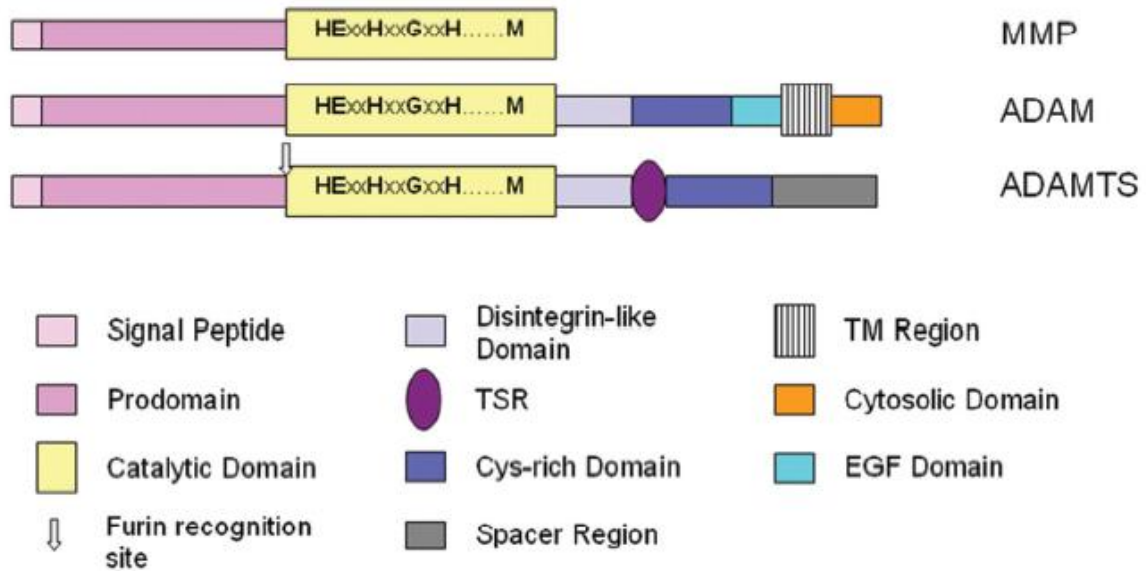


Figura 2 Representación esquemática de la organización de los dominios de metaloproteinasas de la matriz (MMP), ADAM (una proteinasa de desintegrina) y ADAMTS (una metaloproteinasas de desintegrina con motivos trombospondina) ejemplo ADAMTS-4 proteinasas. Tenga en cuenta que la mayoría de las MMP poseen extensiones adicionales C-terminal que contiene dominios tipo hemopexina y fibronectina II. Las proteínas ADAMTS poseen de 0 a 14 repetidos tipo de trombospondina 1 (TSR)-like como dominios espaciadores C-terminal. EGF, factor de crecimiento epidérmico; TM, transmembrana.

Diecinueve productos de genes humanos ADAMTS han sido identificados hasta la fecha. Mediante el uso de software se han realizado alineaciones de secuencia entre estas proteínas indicando que las proteínas ADAMTS humanas pueden clasificarse en cuatro subdivisiones y que también parecen compartir características estructurales y funcionales. Un dendrograma construido a partir de la secuencia de alineación de los dominios catalíticos resultó con gran homología, lo que implica que los dominios catalíticos y funcionales evolucionaron de forma paralela. La primera de las divisiones, comprende al grupo de ADAMTS-1, -4, -5, -8, -9, -15 y -20, se

subdivide en otros dos grupos, uno integrado por ADAMTS-9 y -20 y la otra de ADAMTS-1, -4, -5, -8 y -15. El segundo y bien definido grupo contiene ADAMTS-2, -3 y -14. ADAMTS-13 se convierte en único, y los restantes miembros forman un subgrupo ADAMTS vagamente definido en la que los miembros se dividen en cuatro pares (ADAMTS-19 y -17, ADAMTS-18 y -16, ADAMTS-12 y -7, y ADAMTS-10 y -6) compartiendo características estructurales comunes. Un estudio detallado de la relación filogenética de los miembros de la familia ADAMTS ha publicado recientemente [36]. (Fig. 3).

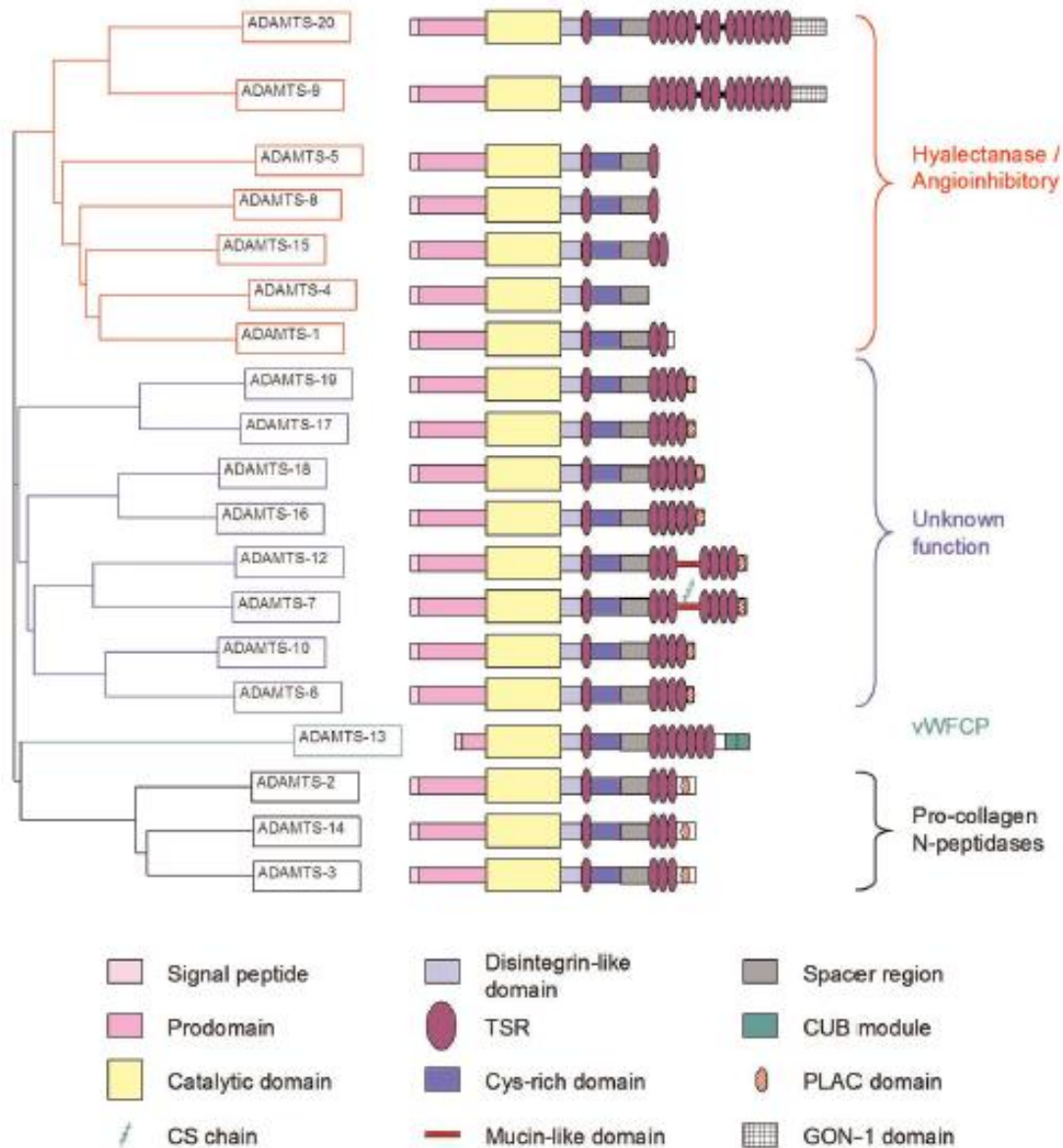


Figura 3. Representación esquemática de la relación estructural y evolutivo de los 19 ADAMTS humanos (una desintegrina y una metaloproteína con motivos trombospondina) los productos génicos. El dendrograma se calculó con Clustal / W. CS, condroitín sulfato, CUB, complemento, C1r/C1s, UEGF (proteínas de crecimiento epidérmico relacionadas con el factor de erizo de mar) y BMP-1 (proteína ósea morfogenética-1); PLAC, la proteasa y lacunina; TSR, repetidos de trombospondina I; VWFCP, Von Willebrand factor de la proteasa-hender.

ADAMTS estructura de dominios

La secuencia de señales de las proteínas ADAMTS es seguida por una pro-región de longitud variable, pero que es particularmente corta en ADAMTS-13. El pro-dominio de todas las proteasas ADAMTS contiene al menos un motivo consenso de hendidura furina, por lo tanto, generalmente se cree que las proteasas ADAMTS se generan como zimógenos inactivos y éstos son rotos dentro de la célula para ser secretadas en la forma madura o activa. Este mecanismo de maduración se apoya en estudios de ADAMTS-4 en los cuales identifican una región N-terminal en el sobrenadante de células transfectadas con ADAMTS-4, lo que sugiere que el pro-dominio se remueve eficientemente *in vivo* [37]. El mismo estudio también demostró que al purificar proADAMTS-4 ésta puede ser escindida por furina recombinante en experimentos libres de células.

Los dominios catalíticos de las proteasas ADAMTS comparten un alto grado de similitud y contienen una secuencia de unión de zinc HEXXHXXGXXH, en el que el zinc es asociado al sitio catalítico de los tres residuos de histidina. Esta disposición se ve facilitada por la glicina conservada, que permite un asa en horquilla estrecha y permite a la tercer histidina ocupar su posición correcta [39,38]. Como en todas las MMP y adamalinas, la secuencia de unión a zinc es seguida a corta distancia antes del dominio C-terminal por unos residuos de metioninas altamente conservadas, denominado "metzincin-type". Esta metionina constituye el "Met-turn, una curva

cerrada organizada como un tornillo hacia la derecha que parece desempeñar una importante función en la estructura del sitio activo [40].

El dominio catalítico es seguido por una región con identidad de 25 a 45% con la desintegrinas presentes en veneno de serpiente, aunque éste no contiene el dominio de cisteína de este último. Este dominio ha sido denominado por lo tanto desintegrina-like, aunque actualmente no hay evidencia publicada de que este dominio de las proteinasas ADAMTS interaccionen con las integrinas.

A diferencia de las proteínas ADAM, las proteinasas ADAMTS poseen una secuencia bien conservada llamada repetido de trombospondina tipo-1 (TSR), entre el dominio de desintegrina-like y el dominio rico en cisteínas (CRD). Este dominio central de TSR de las proteasas ADAMTS se cree que funciona como un dominio de unión a glicosaminoglicanos sulfatados.

El dominio CRD es una secuencia bien conservada rica en cisteína que contiene 10 residuos de cisteína. En contraste a las proteínas de ADAM, en la que el CRD es seguido por el factor de crecimiento epidérmico (EGF)-like, todas las proteasas ADAMTS poseen una región espaciadora en lugar del de cisteína. El dominio varía en longitud y contiene varios residuos conservados en la parte hidrofóbica N-terminal y una porción C-terminal extremadamente variable. La expresión de los distintos constructos con diferentes deleciones de la proteína murina ADAMTS-1 muestra la secuencia CRD-spacer como un dominio funcional de unión a matriz extracelular (ECM-binding

domain) [41]. Este papel, apoyado por la investigación de las formas transformadas del dominio de secuencia CRD-espaciador, indicó que estos dominios sirven también de unión a heparina y los glicosaminoglicanos del agregón [37].

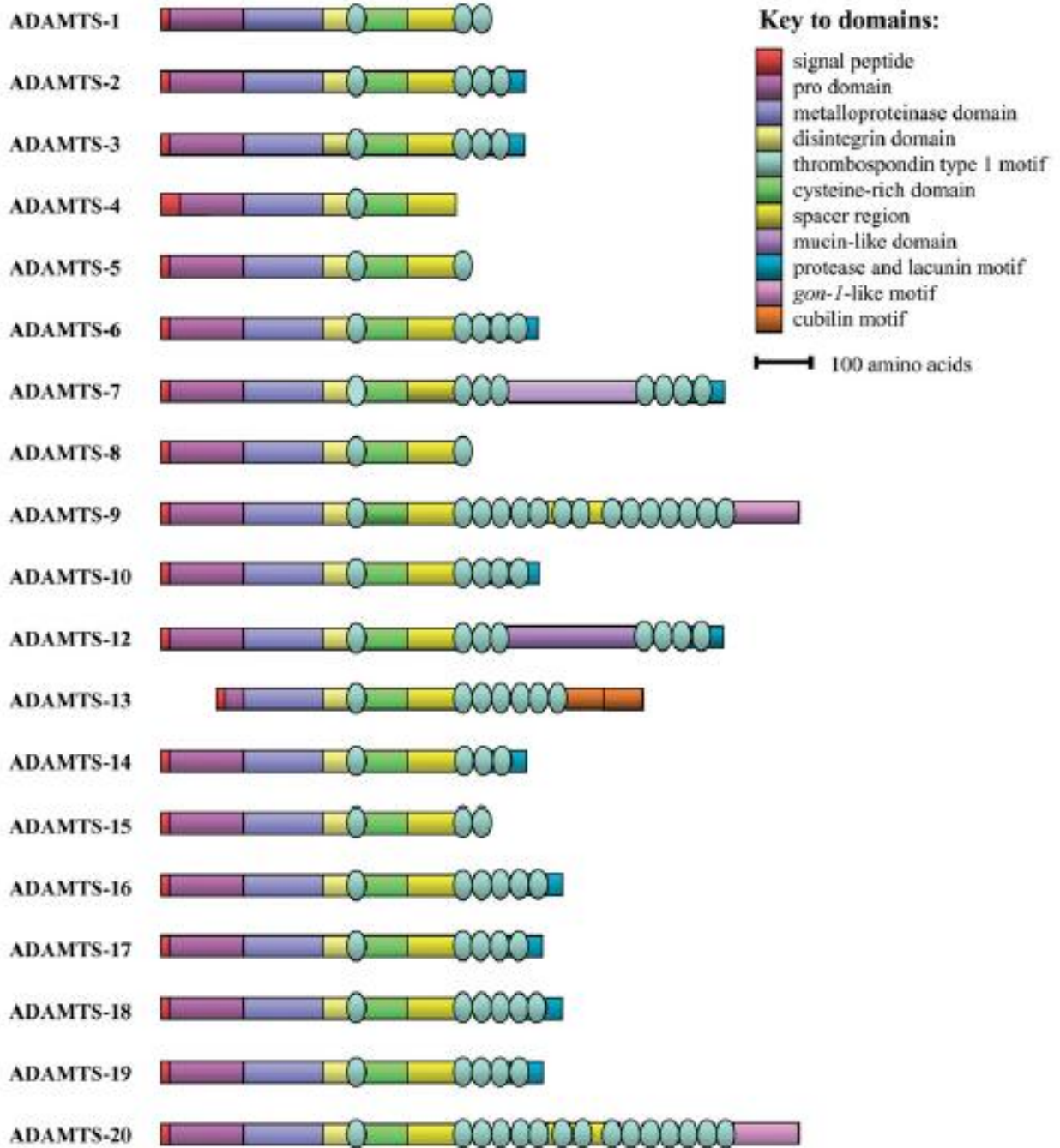


Figura. 3 Estructura y dominio de las proteínas ADAMTS. En el caso de las proteínas con isoformas diferentes, sólo la isoforma más larga está representada aquí. Los dominios de trombospondina 1 se destacan por los óvalos.

Funciones de las proteínas ADAMTS Hialectanasas: ADAMTS-1, -4, -5, -8, -9, -15 y -20

Las proteinasas ADAMTS-1, -4, -5, -8 -9 y -15 cortan el hialectan (proteoglicanos de unión al ácido hialurónico), una actividad que ha sido previamente identificada y llamada “agrecanasa” [43]. Varias de estas proteasas ADAMTS también escinden al versican hialectan mientras que ADAMTS-4 corta a un hialectan, el brevican [43]. Estas proteasas ADAMTS pueden ser llamadas hialectanasas. ADAMTS-4 puede tener actividad proteolítica sobre el COMP (cartílago oligoméric matriz protein), así como en la fibromodulina y decorina, lo que indica que este subgrupo de proteinasas no se limita a la ruptura de proteoglicanos y podría tener un espectro proteolítico más amplio [44]. No se han publicado informes de actividad de hialectanasa ADAMTS-20, pero el dominio catalítico de esta proteínasa ha demostrado ser activa proteolíticamente [45].

La participación de las proteasas ADAMTS en el recambio de tejido conectivo ha sido demostrada por el uso de anticuerpos específicos que excluyen la participación de otras proteinasas, en particular las MMP [32,46]. ADAMTS-4 y -5 han sido caracterizadas como agrecanasas implicadas en la degradación de agrecán en la osteoartritis y otros tejidos ricos en matriz cartilaginosa.

Los estudios de ADAMTS-4 han dado una idea de la influencia que los dominios complementarios tienen sobre las actividades de la

proteínasa. Un estudio reciente de formas truncadas recombinantes de ADAMTS-4 indica que la presencia del dominio CRD se requiere para la actividad agrecanasa máxima, mientras que la inclusión de la región espaciadora impide la escisión del agrecán en el lugar de IGD (dominio interglobular) [47]. Además, la presencia de la región espaciadora impide la ruptura de los sustratos no proteoglicanos como son el agrecán deglicosilado, la transferrina y la fibromodulina. Estos datos indican que el dominio catalítico ADAMTS-4 posee una actividad proteolítica que es modulada por la región espaciadora.

La amplificación del cDNA a partir de tejido humano adulto muestra expresión de ADAMTSL4 en colon, corazón, leucocitos, hígado, pulmón, músculo esquelético, bazo, testículos y placenta; expresión en menos cuantía se observa en médula ósea, tejido cerebral, riñón y páncreas. Por otro lado, el estudio de la expresión en el tejido fetal revela fuerte expresión en el corazón, riñón, hígado, pulmón y en músculo esquelético, también se ha observado una menor expresión en cerebro y piel de ADAMTSL4 así como en ojo de ratón y humano.

La metaloproteínasa ADAMTS-4 miembro de la subfamilia de reprotinas metaloproteínasas M12, se ha designado también como "agrecanasa 1", basada en su capacidad para romper el enlace Glu373-Ala374 encontrado dentro del dominio interglobular (IGD) de la proteína central agrecán (2), una propiedad característica propuesta para las agrecanasas (3). ADAMTS-4 tiene la capacidad de escindir el agrecan en varios lugares y gran parte de su eficiencia está

determinada por la integridad de sus dominios secundarios no catalíticos.

La secuencia genómica de *ADAMTSL4* consta de 19 exones que abarcan alrededor de 11,5 kb en cromosoma 1q21.2. El mRNA es de 4209 pb y codifica una proteína de 1074 aminoácidos (116,5 kDa), que muestra una homología de 76% con la proteína Adamtsl4 del ratón. Existen también variantes producidas por el uso alternativo de exones que originan diferentes isoformas, siendo dos isoformas las principales, la “a” (la más grande) con una longitud completa y la “b” que codifica una proteína de 877 aminoácidos que carece de los últimos 200 aminoácidos. La región no traducida 5´ es de 236 pb de longitud y el codón de iniciación de la traducción está en el exón 3. La región no traducida 3´ es de 740 pb de longitud y sigue del codón de terminación en el exón 19. El *ADAMTS-like 4* se compone de siete repetidos tipo trombospondina-1(TSP1), un dominio espaciador de ADAM-TS 1 (que contiene la mutación reportada), un dominio PLAC, y un dominio de cremallera de leucina (Figura 4). La proteína se sabe que se localiza en la matriz extracelular.

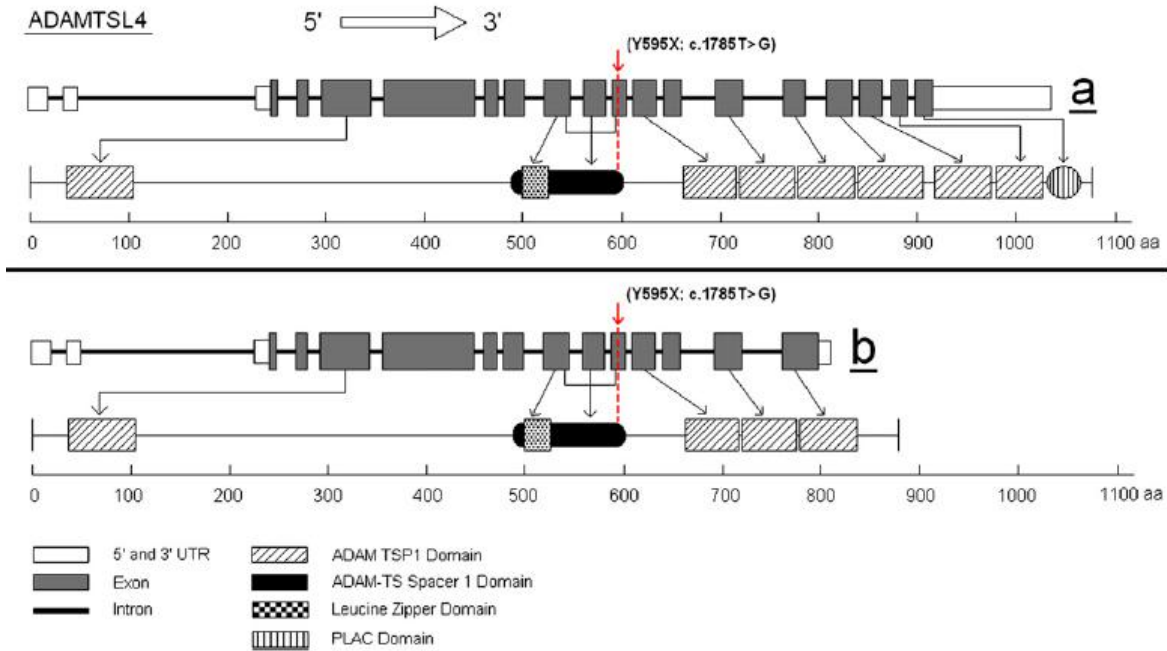


Figura 3. Diagrama de *ADAMTSL4* y sus isoformas, representación de *ADAMTSL4* y sus dos isoformas, A (completo) y B. Los dominios de la proteína en la isoforma pequeña, en rojo se muestran la posición de la mutación reportada por Ahran D. y col. (2009), que está presente en las dos isoformas principales. La Isoforma b carece de tres dominios TSP1 y el PLAC dominio.

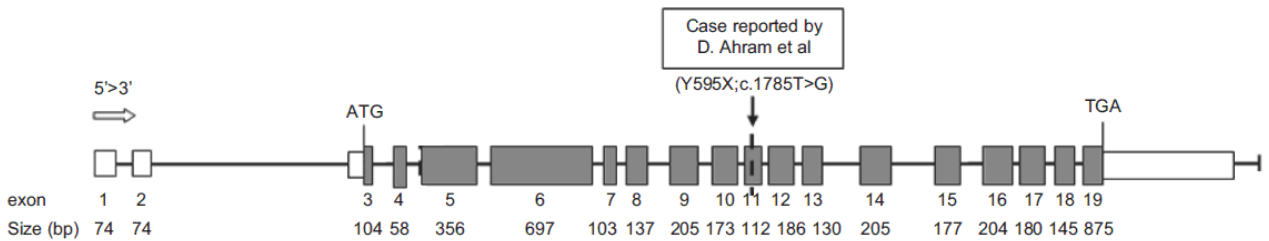


Figura 4. Representación del gen *ADAMTSL4* con sus exones y número de pares de bases así como la mutación reportada por D. Ahran et al.

Recientemente, se reportó una familia árabe con ectopia lentis aislada autosómica recesiva y la presencia de una mutación p.Y595X que da

origen a una proteína truncada de 594 aminoácidos que carece de 6 de los 7 repetidos de trombospondina 1 y que afecta a ambas isoformas principales.(Fig. 3)

Se cree que *ADAMTSL4* puede anclarse a la matriz extracelular (MEC) con uno o más de los dominios TSP1. Los miembros de la súper familia de proteasas ADAMTS están involucrados en diversos procesos biológicos que incluyen la organización del tejido conjuntivo, la coagulación, la inflamación, la artritis, la angiogénesis y la migración celular (22).

La presencia de sólo manifestaciones oculares descritas en esta familia por Ahram D. y colaboradores, aparentemente sin manifestaciones sistémicas no debe excluir una función integral de *ADAMTSL4* en las microfibrillas de todo el cuerpo. La hipótesis de que la ausencia de la función *ADAMTSL4* es sólo aparente en las fibras zonulares, podría ser explicado porque estas fibras experimentan un lento recambio (26) y, como tal, el inicio de la debilidad en su estructura no se ve en otros lugares debido al rápido recambio en otros tejidos.

El cribado de estas familias confirmó que las mutaciones encontradas, explicaban y estaban acorde con el fenotipo de EL. Este estudio confirma que las mutaciones homocigóticas en *ADAMTSL4* se asocian con EL autosómica recesiva en las familias británicas. La identificación de estas mutaciones en *ADAMTSL4* (ver tabla 2) permite la exclusión del síndrome de Marfán en estas familias y orienta al mejor manejo

clínico, de especial importancia en niños afectados por éste y otros trastornos.

Caso	Edad	Diagnóstico	SE	O	C	P	HF	Exón	Nucleótido	Dominio	Mutación
1	6	EL	-	S	-	-	1	6 6	c.767_786del c.826_836del	- -	Heterocigoto compuesto
2	8	EL	-	S	-	-	-	6 6	c.767_786del c.826_836del	- -	Heterocigoto compuesto
3	15	EL	-	S	-	-	-	6	c.767_786del	-	Homocigoto
4	41	EL	L	S	-	-	-	12	c.1960C>T	-	Homocigoto
5	34	EL	-	S	-	-	1	12	c.2008C>T	ADAM TSR-1	Homocigoto
6	4	EL	L	S	-	-	-	19 19 6	c.3153C>A c.3161A>G c.926G>A	PLAC PLAC -	Heterocigoto compuesto

Tabla 2. Mutaciones reportadas en el gen *ADAMTSL4* que originan EL aislada Gavin A. y col. (2010). SE: sistema esquelético, O: oftálmico, C: cardíaco, P: piel, HF: heredo familiares, L: leve, S: severo, EL: ectopia lentis.

IV.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

La Ectopia Lentis es una entidad genéticamente heterogénea en la cual se identifican tanto formas síndrómicas como aisladas. Recientemente se ha involucrado al gen *ADAMTSL4* en algunas formas de ectopia lentis familiar con patrón de herencia autosómico recesivo. Esto abre la posibilidad de búsquedas de mutaciones que puedan explicar la presencia de dicha patología, por lo que nuestro planteamiento del problema se resumiría en conocer cuales son los cambios moleculares presentes en el gen *ADAMTSL4* en una familia con Ectopia Lentis.

V.- OBJETIVOS GENERALES

Analizar el gen *ADAMTSL4* en una familia con Ectopia Lentis

VI.- OBJETIVOS PARTICULARES

Identificar alteraciones moleculares en el gen *ADAMTSL4* asociadas a la Ectopia Lentis autosómica recesiva

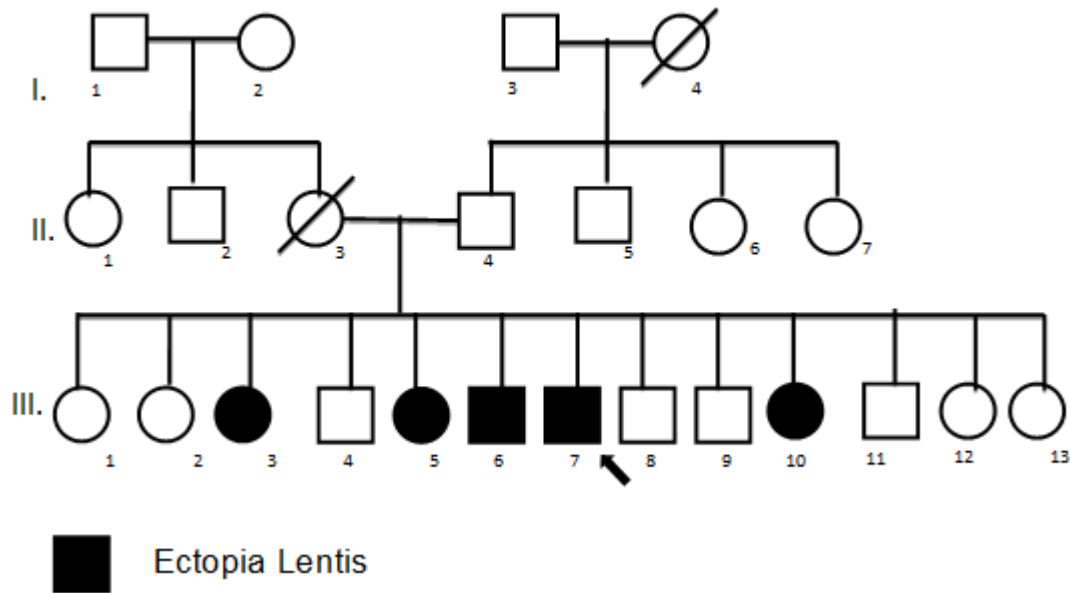
Identificar la presencia de polimorfismos en el gen *ADAMTSL4*

VII. HISTORIA FAMILIAR

Se trata de paciente masculino de 18 años, originario del estado de Oaxaca, soltero, estudiante de secundaria, miembro de una familia de 15 integrantes que forma parte de una comunidad endogámica, de origen Zapoteco. El paciente refiere que su cuadro comienza cuando nota pérdida de la agudeza visual desde los 10 años, la cual ha progresado hasta la fecha, el paciente cuenta con dos hermanos mayores afectados aparentemente por el mismo cuadro (ver árbol genealógico), el cual se caracteriza por pérdida paulatina de la agudeza visual hasta prácticamente la pérdida completa de la visión. El paciente, como sus hermanos muestra afección bilateral caracterizada por oftalmología como subluxación de cristalinos.

Dentro de los antecedentes personales patológicos y familiares interrogados no se encontraron datos de importancia para el padecimiento actual.

Árbol genealógico de la familia en estudio



Examen físico

Se trata de paciente con una talla de 1.57cm, peso de 44.5kg, normocéfalo, cara triangular, abundante bello y pelo, ptosis, visión disminuidas, cejas anguladas y pobladas, nariz larga y de base ancha, narinas antevertidas, filtrum ancho y largo, labios gruesos, paladar amplio, resto sin alteraciones. La exploración funcional reveló una agudeza visual de 20/400 en ambos ojos, que con corrección de +14.00 / -3.00 x 10° en el ojo derecho y +13.00 / -3.00 x 170° en el ojo izquierdo, permitió una agudeza visual de 4/10 y 5/10 respectivamente. La posición primaria de la mirada se encontró en exotropía de 60 D; las ducciones y versiones fueron normales. La presión intraocular en ambos ojos era normal. Se encontró iridodonesis en el ojo izquierdo y subluxación nasal superior del

cristalino de ambos ojos; el resto del segmento anterior se reportó normal. El segmento posterior se encontró sin datos patológicos

VIII. DISEÑO DEL ESTUDIO

1.- Tipo de investigación: Reporte de caso

2.- Universo

La población incluida en este estudio son miembros de una familia afectada de Ectopia Lentis como única manifestación clínica.

2.1.- Criterios de inclusión:

Pacientes con diagnóstico de Ectopia Lentis

2.2.- Criterios de exclusión:

Familiares que no deseaban realizarse el estudio o por motivos ajenos no se tomó la muestra sanguínea.

3.- Variables del estudio

Independiente

Pacientes con ectopia lentis

Dependiente

Mutación del gen *ADAMTSL4*

IX.- MATERIAL Y MÉTODOS

1.- POBLACIÓN INCLUIDA EN EL ESTUDIO

A) Miembros de la Familia Mestiza Mexicana Sintomáticos

B) Miembros de la Familia Mestiza Mexicana Asintomáticos

Todos los miembros de la familia que se encuentran en el grupo A y B recibieron asesoramiento genético previo y posterior a la toma de muestra sanguínea. La muestra se tomó con consentimiento informado. Además se interrogó a cada uno de ellos y se realizó estudio molecular.

2.- EXTRACCIÓN DEL DNA GENÓMICO

A) Obtención de muestra

1.-Se toman 20 ml de sangre periférica en tubos “vacutainer” que contengan EDTA como anticoagulante

2.-Transferir 3 ml de sangre a un tubo cónico de 15 ml.

3.- Agregar 3 ml de amortiguador TTS.

4.- Homogenizar (agitar) de manera gentil

5.- Centrifugar a 3,000 r.p.m. durante 5 minutos. Desechar cuidadosamente el sobrenadante.

6.- Al paquete leucocitario agregar 1 ml. De TTS

7.- Agitar de manera vigorosa y transferir a un tubo de 15 ml.

8.- Centrifugar a 10,000 r.p.m. durante 3 min.

9.- Decantar el sobrenadante

10. Repetir los pasos 6, 7 y 9 hasta que se obtengan células blancas libres de eritrocitos (por lo general con 2 pasos es suficiente)

11. Al paquete leucocitario se le agregan 570 microlitros de NaCl al 5Mm y se agita por 2 min.

12.- Adicionar 30 microlitros de SDS al 10 % y agitar 5 minutos vigorosamente.

13.- Adicionar 200 microlitros de NaCl saturado y agitar 10 minutos vigorosamente

14.- Centrifugar a 11,000 r.p.m. durante 30 min. A 4° C.

15.- Decantar el sobrenadante cuidadosamente en un tubo de 13 X 100 mm estéril y añadir 2 ml de etanol absoluto a -20 ° C.

En este paso se pueden congelar las muestras a -20 ° C o se puede continuar con la extracción. La congelación se puede hacer directamente en los tubos en los que se tienen las muestras. No se debe descongelar antes del momento de finalizar la extracción.

Si se decide continuar la extracción al momento de agregar el etanol absoluto a -20°C se observa precipitar el DNA.

16.- Capturar el DNA con una varilla de vidrio y enjuagar en etanol al 70 % dejando evaporarlo en condiciones estériles.

17.- Resuspender el DNA en un microtubo de 200 microlitros de agua estéril.

18.- Colocarlo en un termobloque a 60 ° C durante dos horas.

Todos los materiales que se utilicen deben estar estériles para evitar la presencia de nucleasas. Es importante trabajar con guantes durante el proceso de extracción. La pureza de los reactivos debe ser muy alta, de lo contrario la calidad del DNA disminuye o puede degradarse.

A) Diseño de oligonucleótidos y PCR

Los alelos pueden identificarse por la técnica de PCR usando las secuencias flanqueadoras previamente diseñadas y flanqueadas dependiendo del exón que se busca amplificar.

1.- Calcular el volumen correspondiente a 500 ng de DNA genómico

2.- Adicionar en un tubo de 2 mL.

a) El volumen equivalente a 500 ng de DNA genómico

b) 1 mM MgCl₂ (1 microlitro)

c) dNTPs a una concentración de 2.5 mM. Llevarlos a una concentración de 125 microMoles (1 microlitro)

d) Buffer 10X llevarlo a una concentración de 0.5 X (1 microlitro)

e) Oligonucleótidos F a una concentración de 20 Mm, llevarlos a 10 mM.

f) Oligonucleótidos R a una concentración de 20 Mm, llevarlos a 10 mM.

g) 0.75 unidades de Taq polimerasa (1 unidad = 0.3 microlitros)

h) Aforar con agua estéril hasta 50 microlitros

Colocar el termociclador (Ependorf, Mastercycle gradient) en el siguiente programa

Desnaturalización	95° C	30 segundos
Alineación	55° a 57°C	1 minuto
Extensión	72° C	2 minutos
		30 ciclos

Una vez que concluye el programa los productos son sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % con objeto de confirmar la presencia de los alelos. El peso esperado de los fragmentos amplificados varía de 893-1694pb. Una vez que se confirmó el producto de amplificación. Se procede a la purificación del fragmento.

C) Purificación del fragmento amplificado y productos de extensión

La purificación del fragmento observado se realizó mediante el kit QUIAEX II; esto evita contaminantes en la reacción de secuenciación. Esta técnica remueve el exceso de dNTP`s,

oligonucleótidos, enzima, ADN, etc., de esta manera obteniendo una secuencia limpia.

- 1) Cortar la banda del fragmento amplificado del gel y pesarla
- 2) Agregar 3 veces el peso de la banda en Buffer QXI y 5 microlitros de QUIAEX II en un tubo de 2 mL.
- 3) Incubar por 10 minutos a 50° C agitando cada 2 minutos el tubo.
- 4) Centrifugar durante 1 minuto a 10 000 r.p.m., decantar y añadir 500 microlitros de buffer QXI.
- 5) Centrifugar durante 1 minuto a 10 000 r.p.m., decantar y eliminar los residuos
- 6) Eliminar los residuos de buffer PE y secar la muestra a temperatura ambiente. Resuspender con 20 microlitros de agua estéril, centrifugar 2 minutos a 10 000 r.p.m. y el sobrenadante se coloca en un microtubo.
- 7) Verificar que la purificación haya sido exitosa, electroforesis del producto obtenido en un gel de agarosa usando un marcador de peso y cantidad (low- mass) de 100 pb.

3.- Reacción de secuenciación

Teniendo la muestra purificada, todo el producto de PCR contiene el ADN correspondiente a los alelos de los exones de *SDHD*. Preparamos la muestra para la secuenciación automática. La tecnología de secuenciación del ADN nos permite saber el orden o secuencia de los nucleótidos que forman parte del gen.

Las condiciones de la reacción son las siguientes

- 1) Adicionar un tubo de de 200 microlitros
 - a) Mezcla de reacción del kit Big Dye Terminator (2 microlitros)
 - b) Purificado de PCR 100 ng/ microlitro (1 microlitro)
 - c) Oligonucleótidos F a una concentración de 10 microM (1 microlitro)
 - d) Oligonucleótidos R a una concentración de 10 microM (1 microlitro)
 - e) Agregar agua estéril (16 microlitros)
 - f) Adicionar un tubo de de 200 microlitros
- 2) Colocar en el termociclador el siguiente programa

Desnaturalización	96° C	30 segundos
Alineación	55° a 57° C	15 segundos
Extensión	60° C	4 minutos
		25 ciclos

4.- Purificación de los productos de extensión

La purificación se realiza por el método de columnas Centri Sep para eliminar la fluorescencia en exceso y permitir una secuenciación limpia

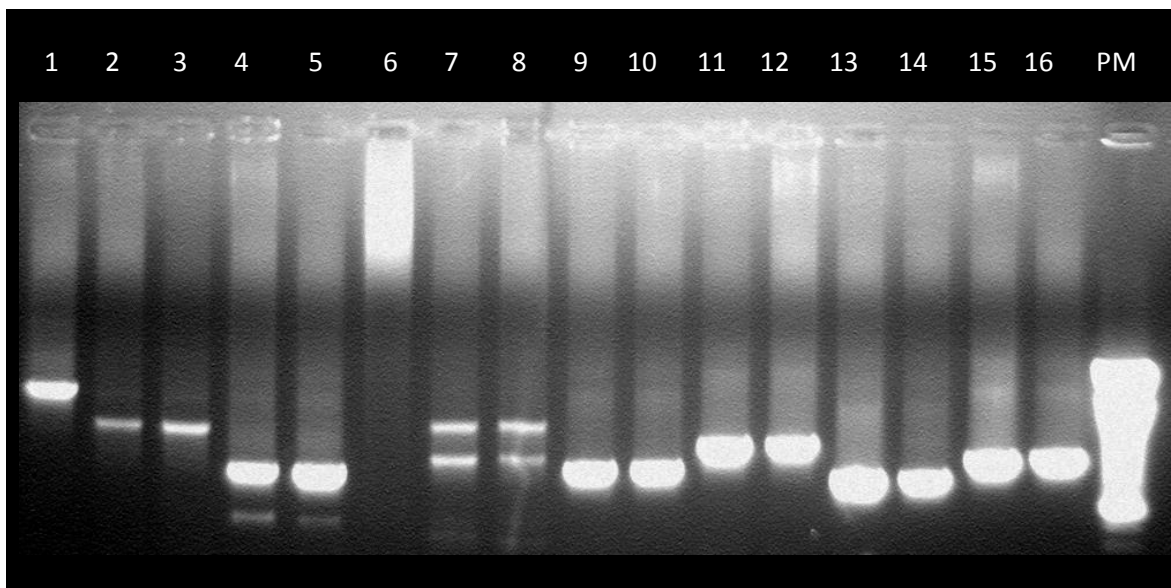
- 1.- Pesar una columna de 0.06 g de sephadex
- 2.- Agregar 800 microlitros de agua inyectable, esperar por lo menos dos horas a que se hidraten
- 3.- Centrifugar durante 3 minutos a 3000 r.p.m para retirar el exceso de agua.
- 4.- Colocar el producto de la PCR en las columnas y centrifugar durante 3 minutos a 3000 r.p.m. para obtener el producto purificado.
- 5.- Centrifugar la muestra en una centrifuga al vacío (Opied Vac.), esperar hasta que el producto seque y tapar con una septa.

5.- Montaje en la Muestra en el equipo de Secuenciación

- 1.- Añadir 20 microlitros de amortiguador de carga TSR Applied Biosystems.
- 2.- Transferir a un tubo de secuenciación y colocar una septa.
- 3.- Desnaturalizar la muestra a 94° C por 2 minutos y colocar inmediatamente en hielo
- 4.- Colocar la muestra en el secuenciador automatizado ABI PRISM modelo 310 de acuerdo a las instrucciones del equipo.

X.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

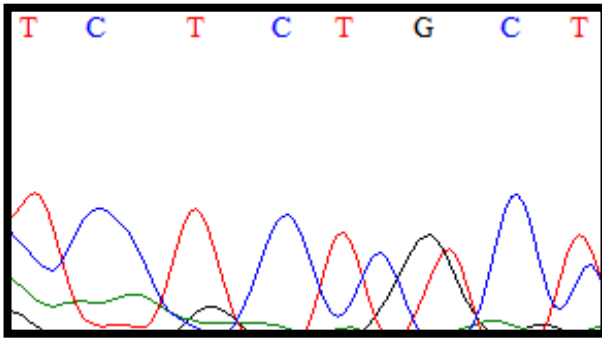
Se realizó historia clínica completa y posteriormente la amplificación y secuenciación de los 19 exones del gen *ADAMTS4* en pacientes afectados, en familiares de primer grado y en controles sanos. La amplificación por PCR de los exones se muestra en la (figura 4).



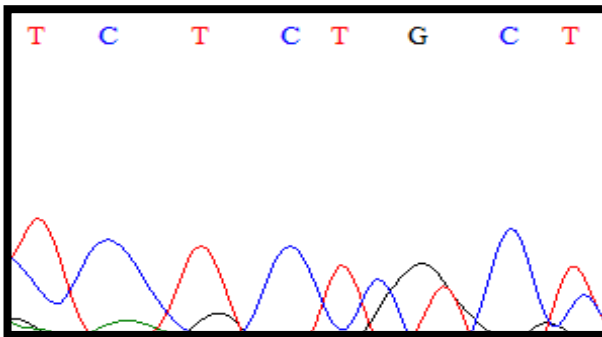
Carril 1	Oligo 3 1629pb	Carril 7	Oligo 4 1200pb	Carril 13	Oligo 7 819pb
Carril 2	Oligo 1 1235pb	Carril 8	Oligo 4 1200pb	Carril 14	Oligo 7 819pb
Carril 3	Oligo 1 1235pb	Carril 9	Oligo 5 910pb	Carril 15	Oligo 8 929pb
Carril 4	Oligo 2 893pb	Carril 10	Oligo 5 910pb	Carril 16	Oligo 8 929pb
Carril 5	Oligo 2 893pb	Carril 11	Oligo 6 1078pb	Carril 17	PM
Carril 6	Oligo 3 1629pb	Carril 12	Oligo 6 1078pb	Carril 18	-----

Figura 4.- Se muestran los amplificados para cada juego de oligos diseñado.

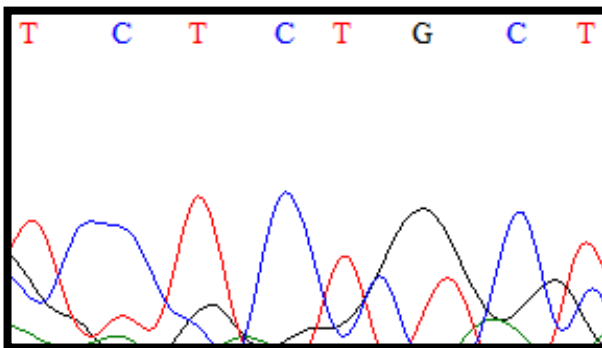
La secuenciación automatizada de todos los exones no mostró cambios en comparación con los controles sanos ni con la base de datos de NCBI. Las uniones intrón-exón y exón-intrón no mostraron ninguna modificación. Algunas secuencias se muestran en la (figura 5).



Control c.1785T>G Exón 11



Paciente c.1785T>G Exón 11

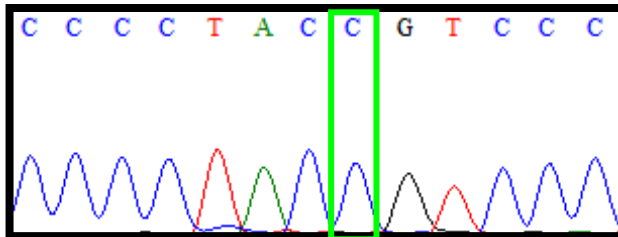


Padre c.1785T>G Exón 11

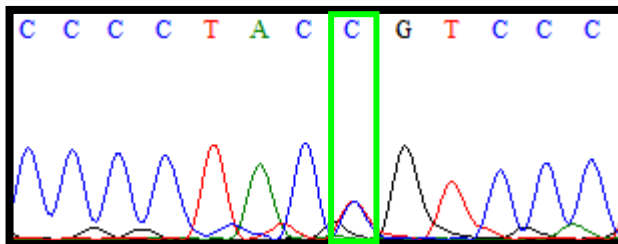
Fig. 5 Se representa la posición de la mutación reportada por Ahran 2009 donde no se observó mutación ni en paciente, su padre, ni control.

Por consiguiente las mutaciones reportadas por Ahran, et al., 2009 y por Arno et al. 2010 (tabla 2) tampoco se encontraron. Solamente se observó un cambio en el intrón 13 donde se sustituye una timina por una citosina (g.13373 t>c), este cambio se encuentra en estado

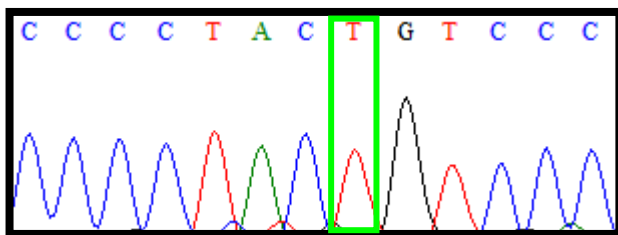
homocigoto para el probando y en estado heterocigoto para el padre del mismo.



Paciente Intrón 13



Padre Intrón 13



Control Intrón 13

Figura 5. Se muestra polimorfismo en la posición g.13373 t>c en el intrón 13 el cambio de una Citosina por una Timina.

La mayoría de los casos de ectopia lentis bilateral se observan en asociación con enfermedades sistémicas del tejido conectivo, como son el síndrome de Marfán, el síndrome de Weill-Marchesani y la homocistinuria. Sin embargo, la ectopia lentis como una entidad clínica aislada es mucho menos frecuente y su herencia ha sido reportada como un rasgo autonómico dominante, aunque reportes actuales sugieren la herencia autosómica recesiva como modo de herencia de la ectopia lentis aislada. Dada la ya mencionada

heterogeneidad genética de este padecimiento y el hecho de no encontrar mutación en el gen *ADAMTS4* durante la realización de este trabajo, consideramos la posibilidad de que otros genes participen activamente en la fisiopatología de la ectopia lentis aislada con patrón herencia autosómico recesivo. Estos mecanismos etiológicos se han observado en la catarata congénita, en la cual se han caracterizado varias formas de transmisión tanto autosómica dominante como autosómica recesiva. En ambas formas de transmisión no se han determinado en todos los pacientes los genes responsables, aún cuando se conocen algunos genes asociados a las formas recesivas, como es el caso de los genes de las beta cristalinas.

Las características clínicas de la familia aquí estudiada, la cual presenta numerosos miembros afectados, datos de consanguinidad y pertenecer a un grupo altamente endogámico, apoya fuertemente la participación de genes afectados en estado homocigoto y una gran oportunidad para la identificación de genes autosómicos recesivos participantes en la ectopia lentis. Esto tampoco descarta la posibilidad de la participación de otros genes de la familia *ADAMTS* como son *ADAMTS10* y *17*. Por lo cual es sería importante analizar la familia de estos genes para descartar su participación. Además, es interesante caracterizar el gen o genes involucrados en las patologías oftálmicas para tener un mejor conocimiento de la participación del genoma humano. Vale la pena mencionar que es en ocasiones primordial conocer precisamente el diagnóstico de la patología de fondo, ya que esto modifica la conducta del cirujano especialmente cuando se presentan las correcciones del cristalino. Ya que en el caso de tratarse

de un síndrome de Marfán o alguna patología del tejido conectivo el procedimiento quirúrgico del cristalino y el pronóstico serán diferentes a diferencia de si la causa es consecuencia de la afección a las proteínas adams.

Consideramos de especial importancia continuar con las investigaciones en esta familia ya que las características de los pacientes en estudio, permite realizar estudios de ligamiento con marcadores y/o SNP, con objeto de identificar genes candidatos adicionales en la ectopia lentis.

Finalmente se logró definir que la causa de ectopia en nuestros pacientes no se debía a padecimientos sindrómicas como sería el caso del síndrome Marfán y tampoco a una alteración en el gen *ADAMTS 4* como se sospechó inicialmente en la investigación. Es importante continuar con diversos estudios como la búsqueda de mutaciones en los demás genes adams y el análisis de ligamiento con objeto de poder identificar el gen o genes responsables de la ectopia de nuestros pacientes.

XI.- APÉNDICE

GEN	ADAMTSL4	PUBMED
DNA:	18516pb	Gene id.54507
mRNA:	4209pb	NM019032
CDS	3225pb	NP061905.2

Secuencias de cada exón:

Exón 1 (5001-5078)

1 ccgcgcgcgga gcgaggttgc ctggagagag cgctctggcg cagaagggtt aacgggccac
61 cgggggctcg cagagcag

Exón 2 (5401-5474)

1 gaggggtgctc tcggacgggtg tgtccccac tgcactoctg aacttgagg acagggctgc
61 cgcgagggac gcag

Exón 3 (7784-7887)

1 agagcacct ccacgccag atgcctgcgt agtttttctg accagtcgc tctgcctcc
61 cctctggggca gtagaggggg agcgatggag aactggactg gcag

Exón 4 (8122-8179)

1 gccctggctg tatctgctgc tgcttctgtc cctccctcag ctctgcttgg atcaggag

Exón 5 (8477-8832)

1 gtgttctcgc gacactctct tcagacacct acagaggagg gccagggccc cgaagggtgc
61 tggggacctt gggctccagt ggcctcttgc tccagccct ggggggtggg ggtgcagcgc
121 aggagccgga catgtcagct cctacagtg cagctccacc cgagtctgcc cctccctccc
181 cggcccccaa gacatocaga agcctctctc ccccggggcc agggctccag accccagact
241 tctccagaaa ccctcccctt gtacaggaca cagtctcggg gaaggggtgg cccacttcga
301 ggtcccgcct cccacctagg gagagaggag acccaggaga ttcgagcggc caggag

Exón 6 (9005-10046)

1 gtcccggctt cgagaccca tcaagccagg aatgttcggt tatgggagag tgccctttgc
61 attgocactg caocggaaacc gcaggcaacc tcggagccca ccagatctg agctgtccct
121 gatctcttct agaggggaag aggctattcc gtcccctact ccaagagcag agccattctc
181 cgaaaacggc agccccaaa ctgagctccc tcccacagaa ctgtctgtcc acacccatc
241 ccccaagca gaacctctaa gccctgaaac tgctcagaca gagggtggccc ccagaaccag
301 gcctgcccc ctacggcatc accccagagc ccaggcctct ggcacagagc cccctcacc
361 cacgactcc ttaggagaag gtggcttctt ccgtgcatcc cctcagccac gaaggccaag
421 tcccagggt tgggcccagtc cccaggtagc agggagacgc cctgatcctt ttccttcggt
481 cctcggggc cgaggccagc agggccaagg gccttgggga acggggggga ctctcaccg
541 gccccgcctg gagcctgacc ctcagcacc gggcgctgg ctgcccctgc tgagcaacgg

601 ccccatgcc agctccctct ggagcctctt tgctcccagt agccctattc caagatgttc
661 tggggagagt gaacagctaa gagcctgcag ccaagcg

Exón 7 (9944-10046)

1 ccctgcccc ctgagcagcc agacccccgg gcctgcagc ggcagcctt taactcccag
61 gaattcatgg gccagctgta tcagtgggag cccttccactg aag

Exón 8 (11008-11144)

1 tccagggctc ccagcgtgt gaactgaact gccggcccc tggttccgc ttctatgtcc
61 gtcacactga aaaggtccag gatgggaccc tgtgtcagcc tggagcccct gacatctgtg
121 tggctggacg ctgtctg

Exón 9 (11741-11945)

1 agccccggct gtgatgggat ccttggctct ggcaggcgtc ctgatggctg tggagtctgt
61 gggggtgatg attctacctg tcgccttgtt tcggggaacc tccactgaccg agggggcccc
121 ctgggctatc agaagatctt gtggattcca gcgggagcct tgcggctcca gattgcccag
181 ctccggccta gctccaacta cctgg

Exón 10 (12200-12372)

1 cacttctgtg ccctgggggc cggctccatca tcaatgggaa ctgggctgtg gatccccctg
61 ggtcctacag ggccggcggg accgtctttc gatataaccg tcctcccagg gaggagggca
121 aaggggagag tctgtcggct gaaggcccca ccaccagcc tgtggatgtc tat

Exón 11 (12518-12629)

1 atgatctttc aggaggaaaa ccagggcgtt ttttatcagt atgtcatctc ttcacctctc
61 ccaatccttg agaacccac ccagagccc cctgtcccc agcttcagcc gg

Exón 12 (12729-12914)

1 agattctgag ggtggagccc ccacttgctc cggcaccocg ccagcccgg accccaggca
61 ccctccagcg tcaggtgcgg atccccaga tgcccgcoccc gcccctccc aggaccccc
121 tggggtctcc agctgcgtac tggaaacgag tgggacactc tgcattgtca gcgtcctgag
181 ggaaag

Exón 13 (13073-13202)

1 gtgtctggcg ccccattttc ctctgcatct cccgtgagtc gggagaggaa ctggatgaac
61 gcagctgtgc cgcgggtgcc agggccccag cctcccctga accctgccac ggcacccat
121 gcccccata

Exón 14 (13524-13728)

1 ctgggaggct ggcagtgga catcctgcag ccgctcctgt ggccccggca ccagcaaccg
61 ccagctgcag tgccggcagg aatttggggg ggggtggctcc tcggtgcccc cggagcgtg
121 tggacatctc ccccggccca acatcaccca gtcttgccag ctgcgcctct gtggccattg
181 ggaagttggc tctccttga gccag

Exón 15 b (14052-14326)

1 tgctccgtgc ggtgcggcgc gggccagaga agccggcagg ttcgctgtgt tgggaacaat
61 ggtgatgaag tgagcgagca ggagtgtgcg tcaggcccc cgcagcccc cagcagagag
121 gcctgtgaca tggggccctg tactactgcc tggttccaca gcgactggag ctccaagggtg
181 agcccgaac cccagccat atcctgcctc ctgggtaacc acgcccagga cacctcagcc
241 tttccagcat agctcaataa acttgtattg atcaa

Exón 15 a (14052-14228)

1 tgctccgtgc ggtgcgggccg gggccagaga agccggcagg ttcgctgtgt tgggaacaat
61 ggtgatgaag tgagcgagca ggagtgtgcg tcaggccccc cgcagccccc cagcagagag
121 gcctgtgaca tggggccctg tactactgcc tggttccaca gcgactggag ctccaag

Exón 16 (14541-14744)

1 tgctcagccg agtgtgggac gggaaatccag cggcgctctg tggctctgct tgggagtggg
61 gcagccctcg ggccaggcca gggggaagca ggagcaggaa ctgggcagag ctgtccaaca
121 ggaagccggc cccctgacat gcgcgctgac agcctggggc cctgtgagag aacttggcgc
181 tggtagacag ggccctgggg tag

Exón 17 (14866-15045)

1 tgctcctccg aatgtggctc tggcacacag cgtagagaca tcactctgtgt atccaaactg
61 gggacggagt tcaacgtgac ttctccgagc aactgttctc acctccccag gccccctgcc
121 ctgcagccct gtcaagggca ggccctgccag gaccgatggt tttccacgcc ctggagccca

Exón 18 (15340-15489)

1 tgttctcgct cctgccaaagg gggaaacgcag acacgggagg tccagtgcct gagcaccaac
61 cagaccctca gcaccgatg cctcctcaa ctgcggccct ccaggaagcg cccctgtaac
121 agccaaccct gcagccagcg cctcg

Exón 19 (15639-16516)

1 atgatcaatg caaggacagc tctccacatt gccccctggt ggtacaggcc cggctctgcg
61 tctaccoccta ctacacagcc acctgttgcc gctcttgccg acatgtcctg gagcgggtctc
121 cccaggatcc ctctgaaag gggctcgggg caccttcacg gttttctgtg ccaccatcgg
181 tcaccatttg atcggccac tctgaacccc ctggctctcc agcctgtccc agtctcagca
241 gggatgtcct ccaggtgaca gagggtggca aggtgactga cacaaagtga ctttcagggc
301 tgtggtcagg cccatgtggt ggtgtgatgg gtgtgtgcac atatgcctca ggtgtgcttt
361 tgggactgca tggatatgtg tgtgctcaaa cgtgtatcac ttttcaaaaa gaggttacac
421 agactgagaa ggacaagacc tgtttccttg agactttcct aggtggaaag gaaagcaagt
481 ctgcagttcc ttgctaattc gagtactta gagtgtggtc tccccaccaa ctccagtttt
541 gtgccctaag cctcattttc catgttcaga cctcacatct tctaagccgc cctgtgtctc
601 tgaccocctc tcattttgct agtatctctg cccctgcctc cctaattagc tagggctggg
661 gtcagccact gccaatcctg ccttactcag gaaggcagga ggaaagagac tgctctcca
721 gagcaaggcc cagctgggca gagggtgaaa aagagaaatg tgagcatccg ctccccacc
781 accccgcca gccctagcc cactcctg cctcctgaaa tggttccac ccagaactaa
841 tttatTTTTT attaaagatg gtcatgacaa atgagaaa

Dominio STS (5820-6692)

1 gccgggaacg acaccaaagc agggacatgg aaaggggtga gaagcataaa tgtgctgtgtg
61 tttctgcaga ggagggggca tgggcccctg cgggctgctg caggggaggg tggggtggga
121 cttttccaga gaggagcca ggccctggcc gggcccggg agctcacgtc acccccacc
181 ctactttctc cagggaactg ccaaagccaa accagctcg ggatgggatt atgtgtactg
241 ggtagaccg tggagagggg ctgcgagaag agatctcggg ggcagagaga agcagaggca
301 gagagggcat gaagaggggt cggcatcaga gaaggggcag gcagtgacta tcacccatt
361 tcttcttccc tcagctggag taacaagagt caggcagagc ctgaagactt ggggtggaaca
421 tgggcccctc tctggagatc ctggcctccc cggttcagtc aggggtggagt tgctgacctt
481 agtggccggc ccagccaggg gaaggagtgg ccacggcaa cccccacccc aacccaatc
541 cctgaggcgc ccgctctggc tcagccactc tgaccocctc ctcaaattcc gaaccctagg
601 tctcagggag ggcagtgggg ctgagtgtct gccccaggc acattcctac ccttctcttg
661 gtcattttct gcccagagc tggcccacct cagcaatgag agggctcctt ggattcctct
721 cccgggtgcc tttcagatcc aacagaaaca gatttttttt ttocctggaaa gcagaactaa
781 gagtgggatg aggagcaggg gtgggaagga ctcaaagtga gaagaagggg gcaaagagag
841 tcaggccttg tggctggggg ggttccaaag cct

Secuencia de aminoácidos de la proteína

1 msqtgshpgr glagrwlwga qpclllpivp lswlvwllll llasllpsar lasplpreee
61 ivfpeklns vlpqsgapar llcrlqafge tllleleqds gvqveglvtq ylgqapellg
121 gaepgtyltg tingdpesva slhwdggall gvlqyrgael hlqpleggtp nsaggggahi
181 lrrkspasgq gpmcnvkapl gsp sprpra krfaslsrfv etlvvaddkm aafhgaglkr
241 ylltvmaaaa kafkhpsirn pvslvtrlv ilgsgeegpq vgpsaaqtlr sfcawqrgln
301 tpedsdphf dtailftrqd lcgvstcdtl gmadvgtvcd parscaived dglqsaftaa
361 helghvfnml hdnskpcisl ngplstsrhv mapvmahvdp eepwspcsar fitdfldngy
421 ghclldkpea plhlpvtfpg kdydadrqcg ltfgpdsrhc pqlpppcaal wscghlngha
481 mcqtkhspwa dgtpcgpaqa cmggrclhmd qlqdfnippa ggwgppwgpwg dcsrtcgggv
541 qfssrdctrp vprnggkyce grrtrfrscn tedcptgsal tfreeqcaay nhrtldlksf
601 pgpmdwvpry tgvapggqck ltcqaralgy yyvleprvvd gtpcspdsst vcvqgrciha
661 gcdriigskk kfdkcmvcgg dsgscskqsg sfrkfrygyn nvvtipagat hilvrqqgnp
721 ghrsiylalk lpdgsyalng eytlmpspst vvlpgavslr ysgataaset lsghgplaqp
781 ltlqvlvagn pqdtrlrysf fvprptpstp rptpqdlhr raqileilrr rpwagrk

Secuencia de los primers utilizados y tamaño de amplicón esperado:

F1 7815 ttt ttg tga cca gtc cgc tc
R1 9050 ccc ata acc gaa cat tcc tg Amplicón 1235pb

F2 8797 aga gag gag acc cag gag at
R2 9690 agg ctc tta gct gtt cac tc Amplicón 893pb

F3 9461 acg ccc tga tcc ttt tcc tt
R3 11090 tcc tgg acc ttt tca gtg tg Amplicón 1629pb

F4 11079 tcc cag cgc tgt gaa ctg aa
R4 12279 ggt tat atc gaa aga cgg tg Amplicón 1200pb

F5 12221 ggt cca tca tca atg gga ac
R5 13131 aca gct cgc ttc atc cag tt Amplicón 910pb

F6 13121 aac tgg atg aac gca gct gt
R6 14199 tgg aac cag gca gta gta ca Amplicón 1078pb

F7 14091 gtt cgc tgt gtt ggg aac aa
R7 14910 gat gat gtc tct acg ctg tg Amplicón 819pb

F8 14891 cac agc gta gag aca tca tc
R8 15820 atc aat ggg tga ccg atg gt Amplicón 929pb

XII.- GLOSARIO

Alelos

Versión específica de un gen que ocupa una localización determinada en el genoma. Se diferencia de otros alelos del mismo gen por ser distinta su secuencia de nucleótidos. En general uno de los estados alternativos de un mismo gen.

Amplificación de DNA

Proceso por el cual se generan copias de un fragmento de ADN, Puede producirse *in vivo* o realizarse *in vitro* mediante diversas técnicas.

Cromosoma

Elemento que existe en el núcleo de la célula en el momento de su división o mitosis, que contiene el material genético.

Enzima

Catalizador biológico, normalmente una proteína, que mediatiza y promueve un proceso químico sin ser ella misma alterada o destruida. Son catalizadores extremadamente eficientes y muy específicamente vinculados a reacciones particulares.

Gen

Secuencia de nucleótidos que codifica un producto funcional. Incluye regiones anteriores (5' no traducida) posteriores (3' no traducida) a la región codificante, así como secuencias interpuestas (intrones) entre exones. Unidad de transmisión hereditaria; ocupa un sitio determinado en los cromosomas llamados locus.

Genotipo

Conjunto de genes de un individuo que puede expresarse o no. La contribución genética de la descendencia. La constitución genética de un locus en particular. La constitución genética de un organismo.

Heterocigoto

Un individuo que ha recibido información genética diferente de cada uno de sus padres, para la unidad en cuestión. Tener dos alelos diferentes de un gen específico.

Homocigoto

Un individuo que ha recibido la misma información genética de cada uno de sus padres, para la unidad en cuestión. Tener dos alelos idénticos de un gen específico.

Kilodaltones

Es una pequeña unidad de masa usado para expresar masas atómicas y masas moleculares. Es definido como $1/16$ de la masa de un átomo de oxígeno.

Loci

El plural de locus.

Locus

En genética, punto de un cromosoma ocupado por un gen.

Multifactorial

Causado por interacción de múltiples genes y factores del medio ambiente.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Amplificación enzimática de fragmentos de DNA localizado entre un par de
Iniciadores

Secuenciación

Secuenciación de DNA. Determinación del orden en el cual se disponen las bases de una molécula de DNA. Proceso mediante el cual se determina el orden de los nucleótidos o de los aminoácidos de una molécula de ácido nucléico o proteína según sea el caso.

Taq polimerasa

Una DNA polimerasa termoestable aislada de una bacteria utilizada en PCR

XIII.- REFERENCIAS

1. Clarke CC (1939):Ectopia lentis. Arch Ophthalmol 21: 124-153.
2. Nelson LB & Maumenee IH (1981); Ectopia lentis. Surv Ophthalmol 27; 143-160.
3. Duke-Elder S, Jay B. System of Ophthalmology. (1976). Diseases of the lens and vitreous; glaucoma and Hypotony. St Louis: Mosby.
4. Roldan Pallares M, Vilar Maseda N. Vitrectomía y per- fluorocarbonos en el tratamiento de la luxación del cristalino. Arch Soc Esp Oftalmol 2001; 76: 431-436.
5. Miranda Díez I, Gómez de Liaño F, Vicente Ruiz A. Luxación espontánea del cristalino y síndrome de pseudoexfoliación. Studium Ophthalmologicum 1998; 17: 253-255.
6. Fuchs J., Rosemberg T. Congenital ectopia lentis. Acta Ophthalmol. Scand. 1998: 76: 20-26.
7. Yao K, Shentu X, Jiang J, Du X. Phacofragmentation without perfluorocarbon liquid for dislocated crystalline lenses or lens fragments after phacoemulsification. Eur J Ophthalmol 2002; 12: 200-204.
8. Amalinei C., Caruntu I., Balan R.A., Biology of metalloproteinase's. Romanian Journal of Morphology and Embryology 2007, 48(4): 323-334.
9. Vanita V., Singh J. R., Singh D., Varon R., Robinson P. N., Sperling K., A recurrent FBN1 mutation in an autosomal dominant ectopia lentis family of Indian origin. Molecular Vision 2007: 13:2035-40.
10. Tsutsui K., Manabe R., Yamada T., Nakano I., Oguri Y., Keene D., Sengle G., Sakai L. Y., Sekiguchi K., ADAMTSL-6 Is a Novel Extracellular Matrix Protein that Binds to Fibrillin-1 and Promotes Fibrillin-1 Fibril Formation. The Journal of Chemistry Vol. 285, No. 7, pp. 4870-4882.
11. Nagase H., Kashiwagi M., Aggrecanases and cartilage matrix degradation. Arthritis Res. Ther. 2003, 5:94-103.
12. Jones G. C., Riley G. P., ADAMTS proteinases: a multi-domain, multi- functional family with roles in extracellular matrix turnover and arthritis. Arthritis Research & Therapy 2005, 7:160-169.
13. Dina A., Shawn S., Kohilan A., Tayeh M., Chen S., Leal S., Mahmoud A., Hatem E., A Homozygous Mutation in ADMTSL4 Causes Autosomal-Recessive Isolated Ectopia Lentis. The American Journal of Human Genetics 84, 274-278, February 13, 2009.
14. Mahmoud A. Autosomal Recessive Ectopia Lentis in two Arab Family Pedigrees. Ophthalmic Paediatrics and Genetics 1990, Vol. 11, No. 2, pp. 123-127.
15. Porter S., Clark I. M., Kevorkian L., Edwards D. R., The ADAMTS metalloproteinase's. Biochem. J. (2005) 386, 15-27.

16. Haddad R., Uwaydat S., Dakroub R., Traboulsi E. I., Confirmation of the Autosomal Recessive Syndrome of Ectopia Lentis and Distinctive Craniofacial Appearance. *American Journal of Medical Genetics* 99:185-189(2001).
17. Trivedi H.T., Venkatsh R., Ectopia Lentis: Weill Marchesani Syndrome. *Bombay Hospital Journal*, Vol. 51, No. 1, 2009.
18. Nelson L. B., Maumenee I.H. Ectopia Lentis *Survey of Ophthalmology* Vol. 7 No. 3 Nov 1982.
19. Ruiz C., Rivas F., Villar-Calvo V. M., Serrano-Lucas J.I., Cantu J.M. Familial Simple Ectopia Lentis. *Ophthalmic Pediatrics and Genetics*, 1986, Vol. 7, No. 2, pp.81-84.
20. Adams J. C., Tucker R.P., The Thrombospondin Type 1 Repeat (TSR) Superfamily: Diverse Proteins With Related Roles in Neuronal Development. *Developmental Dynamics* 218:280-299(2000).
21. Morales J., Latifa A., Khalil D., Shinwari J. M. A., Bavi P., Rahima A. A., Al-Rajhi A., Alkuraya F. S., Meyer B.F., Al Tassan N., Homozygous Mutations in ADAMTS10 and ADAMTS17 Cause Lenticular Myopia , Ectopia Lentis, Glaucoma, Spherophakia, and Short Stature. *The American Journal of Human Genetics* 85, 558-568, Nov 13, 2009.
22. Green W. R. Isolated Ectopia Lentis: Potential Role of Matrix Metalloproteinases in Fibrillin Degradation. *Arch Ophthalmology* Vol. 122, Jan 2004.
23. Kuno K., Terashima Y., Matsushima K., ADAMTS-1 Is an Active Metalloproteinase Associated with the Extracellular Matrix. *The American Journal of Biological Chemistry*. Vol. 274, No. 26, Issue of June 25, pp. 18821- 18826, 1999.
24. Tortorella M., Pratta M., Liu R., Abbaszade I., Ross H., Burn T., Arner E. The Thrombospondin Motif of Aggrecanase-1 (ADAMTS-4) for Aggrecan Substrate Recognition and Cleavage. *The American Journal of Biological Chemistry*. Vol. 275, No. 33, Issue of August 18, pp 25791-25797, 2000.
25. Kashiwagi M., Enghild J. J., Gendron C., Hughes C., Caterson B., Yoshifumi I., Nagase H., Altered Proteolytic Activities of ADAMTS-4 Expressed by C-terminal Processing. *The American Journal of Biological Chemistry*. Vol. 279, No. 11, Issue of March 12, pp. 10109-10119, 2004.
26. Lauer- Fields J. L., Minond D., Sritharan T., Kashiwagi M., Nagase H., Fields G., Substrate Conformation Modulates Aggrecanase (ADAMTS-4) Affinity and Sequence Specificity. *The American Journal of Biological Chemistry*. Vol. 282, No. 1, pp. 142-150, January 5, 2007.
27. Hamel M. G., Mayer J., Leonardo C. C., Zuo F., Sandy J. D., Gottschall P. E. Multimodal Signaling By the ADAMTSs (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) Promote Neurite Extension. *Exp Neurology*. 2008 April: 210(2): 428-440 2007.

28. Gonzalez-Castaño C., Castro J., Alvarez-Sanchez M. Luxacion del Cristalino: Etiologia y Resultados. Arch. Soc. Esp. Oftalmol 2006; 81:471-478.
29. Aragon- Martin J. A., Ahnood D., Charteris D.G., Saggar A., Nischal K. K., Comeglio P., Chandra A., Child A. H., Arno G. Role of ADAMTSL4 Mutations in FBN1 Mutation-negative Ectopia Lentis Patients. Human Mutation in Brief (2010).
30. Kevorkian L, Young DA, Darrah C, Donell ST, Shepstone L, Porter S, Brockbank SM, Edwards DR, Parker AE, Clark IM: Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in cartilage. Arthritis Rheum 2004, 50:131-141.
31. Tortorella MD, Burn TC, Pratta MA, Abbaszade I, Hollis JM, Liu R, Rosenfeld SA, Copeland RA, Decicco CP, Wynn R, et al.: Purification and cloning of aggrecanase-1: a member of the ADAMTS family of proteins. Science 1999, 284:1664-1666.
32. Malfait AM, Liu RQ, Ijiri K, Komiya S, Tortorella MD: Inhibition of ADAM-TS4 and ADAM-TS5 prevents aggrecan degradation in osteoarthritic cartilage. J Biol Chem 2002, 277:22201-22208.
33. Kuno K, Kanada N, Nakashima E, Fujiki F, Ichimura F, Matsushima K: Molecular cloning of a gene encoding a new type of metal- loproteinase-disintegrin family protein with thrombospondin motifs as an inflammation associated gene. J Biol Chem 1997, 272:556-562.
34. MEROPS: the Peptidase Database [<http://merops.sanger.ac.uk>]
35. Barrett AJ, Rawlings ND, O'Brien EA: The MEROPS database as a protease information system. J Struct Biol 2001, 134:95-102.
36. Nicholson AC, Malik SB, Logsdon JM Jr, Van Meir EG: Functional evolution of ADAMTS genes: evidence from analyses of phylogeny and gene organization. BMC Evol Biol 2005, 5:11.
37. Flannery CR, Zeng W, Corcoran C, Collins-Racie LA, Chock- alingam PS, Hebert T, Mackie SA, McDonagh T, Crawford TK, Tomkinson KN, et al.: Autocatalytic cleavage of ADAMTS-4 (aggrecanase-1) reveals multiple glycosaminoglycan-binding sites. J Biol Chem 2002, 277:42775-42780.
38. Bode W, Gomis-Ruth FX, Stockler W: Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. FEBS Lett 1993, 331:134-140.
39. Rawlings ND, Barrett AJ: Evolutionary families of metalloproteases. Methods Enzymol 1995, 248:183-228.
40. Bode W, Gomis-Ruth FX, Stockler W: Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. FEBS

Lett 1993, 331:134-140.

41. Kuno K, Matsushima K: ADAMTS-1 protein anchors at the extracellular matrix through the thrombospondin type I motifs and its spacing region. *J Biol Chem* 1998, 273:13912-13917.

42. Flannery CR, Zeng W, Corcoran C, Collins-Racie LA, Chock-alingam PS, Hebert T, Mackie SA, McDonagh T, Crawford TK, Tomkinson KN, et al.: Autocatalytic cleavage of ADAMTS-4 (aggrecanase-1) reveals multiple glycosaminoglycan-binding sites. *J Biol Chem* 2002, 277:42775-42780.

43. Sandy JD, Neame PJ, Boynton RE, Flannery CR: Catabolism of aggrecan in cartilage explants. Identification of a major cleavage site within the interglobular domain. *J Biol Chem* 1991, 266:8683-8685.

44. Kashiwagi M, Enghild JJ, Gendron C, Hughes C, Caterson B, Itoh Y, Nagase H: Altered proteolytic activities of ADAMTS-4 expressed by C-terminal processing. *J Biol Chem* 2004, 279: 10109-10119.

45. Llamazares M, Cal S, Quesada V, Lopez-Otin C: Identification and characterization of ADAMTS-20 defines a novel subfamily of metalloproteinases-disintegrins with multiple thrombospondin-1 repeats and a unique GON domain. *J Biol Chem* 2003, 278:13382-13389.

46. Pratta MA, Yao W, Decicco C, Tortorella MD, Liu RQ, Copeland RA, Magolda R, Newton RC, Trzaskos JM, Arner EC: Aggrecan protects cartilage collagen from proteolytic cleavage. *J Biol Chem* 2003, 278:45539-45545.

47. Kashiwagi M, Enghild JJ, Gendron C, Hughes C, Caterson B, Itoh Y, Nagase H: Altered proteolytic activities of ADAMTS-4 expressed by C-terminal processing. *J Biol Chem* 2004, 279: 10109-10119.