



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS**  
**MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**  
**INSTITUTO DE OFTALMOLOGÍA CONDE DE VALENCIANA**

**Análisis genómico en pacientes con distrofias**  
**corneales atípicas**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**  
**MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS**

**P R E S E N T A:**  
**MÉD. CIR. ESPC. OFTALMOLOGÍA JESÚS CABRAL MACÍAS**

**Tutor de Tesis:**  
**Dr. Juan Carlos Zenteno Ruiz**  
**Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana**

**Ciudad Universitaria, Cd. Mx.    Marzo 2017**



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.

<b>Índice General .....</b>	<b>2</b>
<b>1. Resumen estructurado .....</b>	<b>3</b>
<b>2. Introducción .....</b>	<b>5</b>
<b>3. Planteamiento del problema .....</b>	<b>17</b>
<b>4. Pregunta de investigación .....</b>	<b>18</b>
<b>5. Justificación .....</b>	<b>18</b>
<b>6. Objetivo general .....</b>	<b>18</b>
<b>7. Diseño del estudio .....</b>	<b>18</b>
<b>8. Material y métodos .....</b>	<b>19</b>
<b>8.1 Criterios de inclusión .....</b>	<b>19</b>
<b>8.2 Criterios de eliminación .....</b>	<b>19</b>
<b>8.3 Pacientes .....</b>	<b>19</b>
<b>8.4 Análisis molecular .....</b>	<b>20</b>
<b>8.5 Aislamiento de DNA molecular .....</b>	<b>20</b>
<b>8.6 Determinación de la concentración y pureza del DNA obtenido.....</b>	<b>21</b>
<b>8.7 Identificación de regiones de homocigosidad en genoma completo.....</b>	<b>21</b>
<b>8.8 Amplificación por PCR .....</b>	<b>23</b>
<b>8.9 Secuenciación automatizada de los productos de PCR .....</b>	<b>24</b>
<b>8.10 Secuenciación de exoma .....</b>	<b>25</b>
<b>8.11 Preparación (enriquecimiento) de las muestras para secuenciación.....</b>	<b>25</b>
<b>8.12 Secuenciación de siguiente generación.....</b>	<b>26</b>
<b>8.13 Análisis de datos de secuenciación e identificación de variantes.....</b>	<b>27</b>
<b>8.14 Validación de mutaciones deletéreas.....</b>	<b>27</b>
<b>8.15 Análisis de predicción funcional de mutaciones .....</b>	<b>28</b>
<b>8.16 Tamaño de muestra .....</b>	<b>28</b>
<b>8.17 Variables de estudio .....</b>	<b>29</b>
<b>9. Aspectos éticos .....</b>	<b>29</b>
<b>10. Aspectos de bioseguridad .....</b>	<b>29</b>
<b>11. Financiamiento .....</b>	<b>30</b>
<b>12. Resultados .....</b>	<b>30</b>
<b>12.1 Distrofia corneal en lattice unilateral .....</b>	<b>30</b>
<b>12.2 Distrofia de Thiel Behnke .....</b>	<b>33</b>
<b>12.3 Distrofia corneal gelatinosa en forma de gota .....</b>	<b>36</b>
<b>12.4 Distrofia corneal endotelial de Fuchs .....</b>	<b>44</b>
<b>12.5 Síndrome de meretoja.....</b>	<b>49</b>
<b>13. Discusión .....</b>	<b>51</b>
<b>14. Conclusiones .....</b>	<b>60</b>
<b>15. Apéndices .....</b>	<b>61</b>
<b>16. Bibliografía .....</b>	<b>65</b>

## **1. RESUMEN ESTRUCTURADO**

### Antecedentes

Las distrofias corneales son un grupo de entidades típicamente bilaterales, simétricas y progresivas pero sin factores ambientales o sistémicos relacionados. Existen casos que pueden considerarse atípicos en los que el fenotipo, genotipo y/o patrón de herencia no concuerdan con lo descrito en la literatura. Puntualmente, consideramos una distrofia corneal atípica (DCA) como aquella en la que se encuentra un fenotipo característico sin el genotipo esperado; un fenotipo característico con patrón de herencia distinto al reconocido en la literatura o un fenotipo novedoso sin etiología genética conocida. En estos casos, el diagnóstico genético por técnicas moleculares convencionales (PCR y secuenciación tipo Sanger) es complicado, costoso y generalmente ineficaz.

### Justificación

El análisis genómico de familias afectadas con DCA contribuirá a ampliar el conocimiento de las bases moleculares de las distrofias corneales. Por ello, la aplicación de tecnologías que permiten estudiar todo el genoma o analizar docenas o cientos de genes simultáneamente en el DNA de los pacientes, es una alternativa moderna y eficaz para la caracterización adecuada de estas distrofias atípicas.

### Objetivo general

Identificar las mutaciones causales en casos familiares de DCA.

### Material y Métodos

Estudio descriptivo, observacional, transversal.

Se analizaron familias con diagnóstico clínico de distrofia corneal atípica. El diagnóstico clínico fue realizado por un oftalmólogo especialista. Se analizaron los casos familiares referidos al departamento de Genética del Instituto de Oftalmología “Conde de Valenciana” en el periodo de Marzo de 2015 a Junio de 2016 que cumplieran con nuestros criterios de inclusión. A dichos pacientes se les invitó a participar en el estudio y posterior a la aceptación y firma de su consentimiento informado. Se obtuvieron las historias clínicas y oftalmológicas para cada miembro disponible de las familias.

El análisis molecular se realizó dependiendo el probable patrón de herencia de la enfermedad: en los casos sugerentes de herencia autosómica recesiva se llevó a cabo un análisis genómico de homocigosidad con microarreglos de SNPs en genoma completo. El gen o genes candidatos dentro de las regiones homocigotas candidatas se amplificaron por PCR y secuenciación nucleotídica tipo Sanger. Los casos con probable herencia autosómica dominante o casos esporádicos, procedieron directamente al análisis de secuenciación masiva llamado secuenciación de exoma. Esta metodología permitió secuenciar en un solo ensayo las regiones codificantes (exones) de todos los genes (o de un subgrupo de genes) en el genoma humano.

## 2. INTRODUCCIÓN

El término distrofia se ha definido históricamente como “el proceso y consecuencia de entidades hereditarias sobre células específicas en uno o más tejidos que inicialmente tenían una función normal.”<sup>1</sup> Las distrofias corneales son un grupo de entidades típicamente bilaterales, simétricas y progresivas pero sin factores ambientales o sistémicos relacionados.<sup>2</sup> Se caracterizan por el acúmulo de depósitos solubles en diferentes capas de la córnea lo cual produce pérdida de transparencia y discapacidad visual.<sup>3</sup> Conforme se expande el conocimiento acerca de las distrofias corneales se identifican excepciones a esta definición.

Por ello, el Comité Internacional para la Clasificación de las Distrofias Corneales (IC3D) desarrolló un sistema de clasificación para incorporar información genética, clínica y patológica a las definiciones tradicionales. A cada distrofia se le asigna una categoría del 1 al 4, según el nivel de evidencia que apoya la existencia de una distrofia. Las distrofias mejor definidas, con un fenotipo clínico sólido, en el que un gen causal y sus mutaciones ha sido identificados, pertenecen a la categoría 1 y los peor caracterizados, en los que ni la información clínica ni genética es convincente, pertenecen a la categoría 4.<sup>2</sup>

Las 4 categorías se especifican de la siguiente manera:<sup>2</sup>

Categoría 1: Una distrofia bien definida, donde el gen ha sido identificado, mapeado y se conocen las mutaciones específicas.

Categoría 2: Una distrofia corneal bien definida, de la cual se han mapeado uno o mas *loci* específicos, pero aún no se conocen los genes causales.

Categoría 3: Una distrofia corneal bien definida, en el cual el desorden aún no ha sido mapeado a un locus específico.

Categoría 4: Se reserva esta categoría a distrofias corneales nuevas, en sospecha o previamente documentadas aunque la evidencia no es convincente.

De acuerdo a la actualización del IC3D en su segunda edición, las distrofias se dividen en: epiteliales y subepiteliales, epiteliales-estromales relacionadas a mutaciones en el Factor de Crecimiento Transformante Inducido tipo Beta (*TGFBI*), estromales y endoteliales.<sup>2</sup>

Según el nivel de la córnea involucrado, las distrofias se separan en distrofias epiteliales y subepiteliales, las presentes en la capa de Bowman, el estroma, la membrana de Descemet y las endoteliales.<sup>2</sup> (Tabla 1).

**Tabla 1. Clasificación actual de las Distrofias Corneales según la capa corneal afectada.**

<b>La Clasificación IC3D-2. C= Categoría</b>
<b>Distrofias Epiteliales y Subepiteliales</b>
1. Distrofia Membrana Basal Epitelial, raramente C1
2. Distrofia Epitelial de Erosión Recurrente Distrofia Cornea de Franceschetti, C3 Distrofia Smolandiensis, C3 Distrofia Helsinglandica, C3
3. Distrofia Corneal Subepitelial Mucinoso, C4
4. Distrofia corneal de Meesmann, C1
5. Distrofia Corneal Epitelial de Lisch, C2
6. Distrofia Corneal Gelatinosa en forma de Gota, C1
<b>Distrofias de Epiteliales-Subepiteliales TGFBI</b>
1. Distrofia Corneal Reis–Bücklers, C1
2. Distrofia Corneal Thiel–Behnke, C1
3. Distrofia Cornea en Lattice o Encaje, C1 - Variantes (III, IIIA, I/IIIA, IV), C1
4. Distrofia Corneal Granular, tipo 1, C1
5. Distrofia Corneal Granular, tipo 2, C1
<b>Distrofias Estromales</b>
1. Distrofia Corneal Macular, C1
2. Distrofia Corneal Schnyder, C1
3. Distrofia Corneal Estromal Congénita, C1
4. Distrofia Corneal en Fleck, C1

5. Distrofia Corneal Amorfa Posterior, C1
6. Distrofia Central Nubosa de François, C4
7. Distrofia Corneal Pre-Descemet, C1 o C4
<b>Distrofias de Membrana de Descemet y Endoteliales</b>
1. Distrofia Corneal Endotelial de Fuchs, C1, C2 o C3
2. Distrofia Corneal Polimorfa Posterior, C1 o C2
3. Distrofia Corneal Endotelial Hereditaria Congénita , C1
4. Distrofia Corneal Endotelial ligada al X, C2
<b>Distrofias Removidas</b>
1. Distrofia Corneal de Grayson-Wilbrandt

*Modificado de IC3D-2 (Weiss JS et al <sup>2</sup>).*

Existen casos que pueden considerarse atípicos en los que el fenotipo, genotipo y/o patrón de herencia no concuerdan con lo descrito en la literatura. Puntualmente, consideramos una distrofia corneal atípica como aquella en la que se encuentra un fenotipo característico sin el genotipo esperado; un fenotipo característico con patrón de herencia distinto al reconocido en la literatura o un fenotipo novedoso sin etiología genética conocida. En estos casos, el diagnóstico genético por técnicas moleculares convencionales (PCR y secuenciación tipo Sanger) es complicado, costoso y generalmente ineficaz.<sup>4</sup>

Entre las distrofias epiteliales-estromales relacionadas a mutaciones en *TGFBI* se incluyen: Distrofia Corneal de Reis-Bücklers (RBCD), Distrofia Corneal de Thiel–Behnke (TBCD), Distrofia Corneal en Lattice (LCD) y la Distrofia Granular tipo 1 y 2.<sup>5</sup>

### **DISTROFIA CORNEAL EN LATTICE O CLÁSICA**

Se conocen al menos 5 tipos de DCL con base en características clínicas y la localización de los depósitos y corresponden a diferentes mutaciones en *TGFBI*. La excepción es la

DCL tipo II, la cual es una forma de amiloidosis sistémica y la tipo 3 que debe ser evaluada más a fondo desde el punto genético.<sup>5</sup>

La DCL tipo 1 o clásica se manifiesta clínicamente por la aparición en la segunda década de la vida, de una red de opacidades lineares, centrales, ramificadas, orientadas radialmente en patrón de encaje. Las opacidades corresponden a depósito de amiloide en estroma superficial y a nivel subepitelial en la periferia corneal. Esta entidad se hereda de forma autosómica dominante con un locus identificado en 5q31. El gen causal es *TGFBI*.<sup>5</sup>

Estos cambios se originan de manera central, distribuyéndose centrífugamente respetando el estroma más periférico. Clásicamente la membrana de Descemet y el endotelio se encuentran sin afectación. Conforme la enfermedad progresa, se observa una opacidad subepitelial difusa en aspecto de vidrio despulido con aumento en la cantidad de líneas en patrón de encaje en la zona paracentral; todo ello acompañado de erosiones epiteliales recurrentes.

La afectación es usualmente bilateral y simétrica aunque se han reportado casos unilaterales. Las variantes tipo IIIA muestra líneas en encaje de mayor grosor y la tipo IV se caracteriza por depósitos profundos sin desarrollo de erosiones epiteliales. Los síntomas que se producen son dolor y discapacidad visual progresiva generalmente hacia la cuarta década de la vida.<sup>5</sup>

Se han descrito distintas mutaciones en *TGFBI* correspondiendo a cambios como c.370 C4T (Arg124Cys) que se considera la mutación clásica,<sup>6</sup> hasta reportes de variabilidad fenotípica con la misma mutación.<sup>7-9</sup>

La DCL tipo 1 presenta heterogeneidad genética y el fenotipo se ha asociado con diversas mutaciones como c.1553T>C (Leu518Pro),<sup>10</sup> c.1706T>G (Leu569Arg),<sup>11</sup> c.1514T>A (Val505Asp)<sup>12</sup>, entre otras.

El análisis por microscopía óptica muestra atrofia y disrupción epitelial con degeneración de las células epiteliales basales; adelgazamiento focal o ausencia de la Bowman, la presencia de una capa eosinofílica entre la membrana basal epitelial y la Bowman y depósitos estromales de amiloide que se tiñen característicamente con rojo Congo y muestran una birrefringencia verde manzana con un filtro polarizado y dicroísmo rojo/verde cuando se añade un filtro verde a esta tinción.<sup>13,14</sup>

Por microscopía electrónica de transmisión aparecen masas extracelulares de fibrillas finas electrodensas, de unos 8-10 nm de diámetro, que indican la presencia característica de proteína amiloide, habiendo menor densidad de queratocitos en las áreas de depósito amiloide. A la microscopia confocal se observan estructuras lineares ramificadas a nivel estromal con reflectividad cambiante y márgenes pobremente demarcados.<sup>13,14</sup>

### **DCL Atípica**

Se han descrito formas atípicas de esta entidad en asociación con al menos 8 mutaciones en *TGFBI*. Algunas son una combinación entre tipo I y III. Por otra parte la mutación c.1877A>G (His626Arg) se ha identificado en una forma asimétrica de DCL designada como tipo I/III, manifestada por líneas en encaje gruesas en estroma anterior con un inicio tardío en la cuarta década de la vida.<sup>15-17</sup>

### **DISTROFIA CORNEAL ESTROMAL DE THIEL- BEHNKE**

También conocida como Distrofia Corneal de capa de Bowman tipo II o Distrofia corneal en patrón de panal de abeja. Tiene un patrón de herencia autosómico dominante con locus 5q31. El gen causal es *TGFBI*. La Distrofia Corneal de Thiel-Behnke (TBCD) fue descrita en 1967 y se caracteriza por erosiones corneales dolorosas y recurrentes de manera bilateral, baja visual y opacidades en patrón de panal de abeja a nivel de capa de Bowman.<sup>18</sup> Existe evidencia en la literatura de que TBCD se asocia fuertemente a la mutación p. Arg555Gln.<sup>2,19-23</sup>

Es una enfermedad que inicia en la niñez o adolescencia con opacidades irregulares en morfología de hojuela dispersas a nivel de la capa de Bowman. Posteriormente, se presentan opacidad en panal de abeja de manera bilateral y simétrica. Clásicamente, la córnea periférica se encuentra respetada. En etapas más tardías, las opacidades pueden afectar capas estromales más profundas y la periferia corneal.

Las erosiones corneales recurrentes son dolorosas en las primeras décadas. Posteriormente las erosiones se vuelven menos frecuentes. El deterioro visual es lentamente progresivo como resultado de la cicatrización corneal. La discapacidad visual se presenta de manera más tardía en comparación de RBCD debido a que tiene un curso menos agresivo pero es difícil de diferenciar en casos individuales.<sup>2,24</sup>

Se han establecido diversas mutaciones específicas para ciertos fenotipos como p. Arg555Trp en la Distrofia Corneal granular tipo 1, p. Arg124His en la Distrofia Corneal granular tipo 2, p. Arg124Cys en DCL tipo 1, p. Arg555Gln en TBCD y p. Arg124Leu en RBCD.<sup>5</sup> Entre estas, en los codones para los residuos de Arginina entre las posiciones 124 y 555 se presentan más del 50% de las mutaciones asociadas a *TGFBI*.

Frecuentemente, TBCD se confunde con RBCD,<sup>25,26</sup> ya que ambas afectan la capa de Bowman y la diferenciación clínica e histopatológica puede llegar a ser un reto.<sup>2,24</sup> Las características clínicas que apoyan el diagnóstico de TBCD son las opacidades en panel de abeja, deterioro relativamente moderado de la visión<sup>27</sup> y una tasa de recurrencia postoperatoria más lenta.<sup>28</sup>

A la microscopía se observa engrosamiento y adelgazamiento irregular de manera alterna en la capa epitelial para compensar los pliegues y surcos del estroma subyacente. Existe ausencia focal de la membrana basal epitelial, mientras que la capa de Bowman es reemplazada por *pannus* superficial con un patrón ondulatorio en dientes de sierra el cual es patognomónico. A la microscopía electrónica de transmisión se observan fibras onduladas de colágena con un diámetro de 9 a 15 nm que tiñen positivamente para Queratoepitelina, que difiere de RBCD, al presentarse en esta última, cuerpos extracelulares cristaloides en forma de bastón.<sup>13,25,26</sup>

La tomografía de coherencia óptica muestra material hiperrefléctico prominente a nivel de Bowman que se extiende a epitelio en patrón de dientes de sierra, lo cual es una de las características principales que diferencian TBCD de RBCD.

El deterioro visual causado por los depósitos insolubles en TBCD puede ser tratado mediante queratectomía superficial, trasplante de córnea y/o queratectomía fototerapéutica.<sup>29</sup>

### **DISTROFIA CORNEAL GELATINOSA EN FORMA DE GOTA**

La Distrofia Corneal Gelatinosa en forma de Gota (DCGFG), también conocida como Amiloidosis Subepitelial Familiar es una entidad rara de herencia autosómica recesiva

descrita por primera vez en 1914 por Nakaizumi con mayor incidencia en Japón. Se estima su incidencia en 1:33,000.<sup>30,31</sup> Sólo se han descrito algunos casos en Europa y América del Norte.<sup>32,33</sup>

Las manifestaciones clínicas aparecen durante la primera década de vida con lesiones corneales bilaterales, elevadas, de aspecto gelatinoso en patrón en mora que contienen depósitos de proteína amiloide. Dichos depósitos se localizan a nivel subepitelial y estromal anterior.

Durante estadios tempranos de la enfermedad, las lesiones nodulares amarillo-blanquecinas se identifican en la porción subepitelial central de la córnea. Posteriormente, las lesiones aumentan en cantidad y profundidad, extendiéndose periféricamente hasta coalescer.<sup>34,35</sup>

En estadios más severos, puede ocurrir neovascularización a nivel subepitelial y estromal anterior, todo ellos conduciendo a la aparición de sensación de cuerpo extraño, fotofobia, y discapacidad visual severa.<sup>36</sup>

La DCGFG se maneja inicialmente con fotoablación con láser excimer o con raspado corneal, reservando el trasplante corneal para casos mas avanzados. Sin embargo, existe una elevada tasa de recurrencia.<sup>37,39</sup>

El gen causal de esta enfermedad es el Transductor de señales de Calcio asociado a tumores tipo 2 (*TACSTD2*), localizado en el cromosoma 1p32.<sup>39</sup> El gen *TACSTD2* codifica una glicoproteína transmembranal de 323 aminoácidos, expresada en altos niveles por el epitelio estratificado normal, trofoblastos y la córnea.<sup>40</sup>

Se han descrito menos de 30 mutaciones en *TACSTD2* en sujetos con DCGFG. Aunque las variantes patogénicas pueden suscitarse a lo largo de la secuencia del gen, la

mutación p.Q118\* se presenta hasta en el 90% de los sujetos Japoneses afectados y es probablemente la mutación fundadora.<sup>40</sup> A la fecha, no se han caracterizado clínica ni genéticamente sujetos en Latinoamérica afectados por esta enfermedad.

### **DISTROFIA CORNEAL ENDOTELIAL DE FUCHS (DCEF)**

Esta entidad es la forma más común de distrofia endotelial. Fue descrita en 1910 por Ernst Fuchs.<sup>41</sup> Se caracteriza por pérdida progresiva, cambios morfológicos en tamaño y forma de las células endoteliales y formación de excrescencias de la membrana de Descemet (*guttae*) con pérdida de la transparencia en las estructuras corneales y disminución de la visión.<sup>42,43</sup>

El endotelio corneal participa en el transporte del líquido estromal, al regular por difusión la toma de nutrientes y solutos así como mecanismos de transporte activo secundarios.<sup>44,45</sup> En condiciones fisiológicas la fuga de líquido al interior de la córnea se regula para mantener en un estado relativo de deshidratación a la misma. La pérdida de células endoteliales que ocurre en DCEF ocasiona una pérdida en el transporte de iones provocando una incapacidad para mantener un adecuado balance de fluidos ocasionando edema estromal y epitelial con una consecuente pérdida de la transparencia corneal.<sup>44,45</sup>

Se han descrito 2 tipos de DCEF: de inicio temprano e inicio tardío. Comienza a partir de la cuarta década de la vida o después, aunque la variante de inicio temprano se presenta en la primer década de la vida. El sistema de clasificación IC3D-2 considera la DCEF de inicio temprano como categoría 1, ya que está bien caracterizado clínica y genéticamente. La variante de inicio tardío es categoría 2 con un síndrome clínico bien

definido y evidencia de *loci* genéticos, sin gen específico descrito a la fecha o categoría 3 con un fenotipo clínico bien definido, pero ninguna base genética conocida aún.<sup>2</sup> Independientemente del tipo, la DCEF progresa generalmente a través de cuatro etapas clínicas en un periodo aproximado de dos a tres décadas.

Las 4 estadios clínicos descritos en DCEF son: estadio 1 en el que el paciente está asintomático, aunque por microscopia especular se evidencian *guttae* no confluentes; estadio 2 en el que las *guttae* coalescen, se acentúa la pérdida de células endoteliales y se altera la morfología de las mismas, con aparición de pleomorfismo (modificación en la forma hexagonal de las células) y polimegatismo (aumento en el tamaño celular) reflejando estrés celular; estadio 3 en el que aparece edema corneal como consecuencia del compromiso endotelial; y la etapa 4 en la que el edema crónico intraepitelial (bulsas epiteliales) y la cicatrización y neovascularización secundarias son la causa de la baja visual y dolor.<sup>2,46</sup> La agudeza visual empeora por las mañanas debido al aumento en el edema. El dolor, la fotofobia y la epífora se deben a las erosiones epiteliales que son resultado de las bulas epiteliales que revientan. La incidencia global de la enfermedad es del 3.8-11 % en pacientes mayores a 40 años de edad, siendo más frecuente en Europa y en mujeres con una proporción 2.5:1<sup>47-49</sup>

En la actualidad, el único tratamiento definitivo para restaurar la pérdida visual es el trasplante de córnea en forma de la queratoplastia penetrante o trasplante lamelar posterior sustituyendo la membrana de Descemet y endotelio corneal.<sup>50</sup>

La DCEF fue originalmente considerada una entidad esporádica, aunque varios reportes familiares entre 1970 y 1980, permitieron establecer también un patrón autosómico dominante.<sup>47</sup>

En cuanto a las causas genéticas descritas, la forma familiar de DCEF se asocia con mutaciones en el gen *COL8A2*, en 1p34.3–p32 que codifica para el subtipo  $\alpha 2$  de la colágena tipo VIII, que es un componente mayor de la membrana de Descemet.<sup>51</sup> Existen otros reportes de mutaciones heterocigotas en el gen *SLC4A11* en casos esporádicos.<sup>52</sup> Además, el gen *TCF8* que codifica para un factor de transcripción de dedos de zinc, ha sido considerado como gen candidato para el desarrollo de la enfermedad.<sup>53</sup> Estudios familiares han permitido identificar *loci* susceptibles de la enfermedad como 13pTel-13q12.13, 18q21.2-q21.32 y 5q33.1–q35.2.<sup>54-56</sup> El análisis de ligamiento por genoma ha identificado regiones potenciales en los cromosomas 1, 7, 15, 17 y X.<sup>57</sup>

Ambas formas de DECF han mostrado engrosamiento de la membrana de Descemet, atenuación de las células endoteliales y depósitos aberrantes de las  $\alpha$  y  $\beta$  de la colágena tipo VIII.<sup>58</sup>

Se han reportado algunos casos autosómicos dominantes, aunque la mayoría es de herencia desconocida y no existen reportes en la literatura con herencia autosómica recesiva documentada hasta el momento.

### **DISTROFIA CORNEAL EN ENCAJE TIPO GELSOLINA (SÍNDROME MERETOJA) (DCEG)**

En esta entidad con herencia autosómico dominante también conocida como Amiloidosis Familiar, tipo Finlandés se deposita proteína amiloide en diferentes tejidos causando un mal funcionamiento en diversos órganos.<sup>59</sup> Otros sinónimos son síndrome Meretoja, Amiloidosis hereditaria tipo gelsolina o distrofia corneal en *lattice* tipo II. En

Finlandia afecta alrededor de 600 sujetos.<sup>60,61</sup> Hay reportes de esta entidad en Europa, Japón, Irán y Estados Unidos de América.<sup>62-64</sup>

Esta entidad surge por mutaciones puntuales en el gen que codifica a la Gelsolina (G654A o G654T) en el cromosoma 9q33-34. Esta proteína tiene un peso de 83kDa y es una moduladora de actina y se sintetiza en la mayoría de tejidos.<sup>65</sup>

El papel de dicha proteína aún no se conoce con claridad pero participa en la unión y remoción de actina. La degradación deficiente de Gelsolina tiene como consecuencia un producto aberrante de 7-kDa produciendo el acúmulo de amiloide.<sup>66</sup> En esta enfermedad, el amiloide se deposita en distintas partes del ojo, aunque usualmente se afecta primero la córnea.<sup>61</sup> El diagnóstico se confirma por histopatología al momento del trasplante de córnea.<sup>67</sup>

Los estudios de inmunohistoquímica muestran huellas de amiloide en estroma medio y anterior, bajo la capa de Bowman y ocasionalmente en membrana basal epitelial. Los depósitos producen erosiones corneales recurrentes y pérdida visual.<sup>67</sup>

En casos avanzados, los pacientes tienen queratitis neurotrófica, erosiones recurrentes y daño subsecuente de los nervios corneales.<sup>68</sup> Los pacientes inician entre la tercera y cuarta década de la vida con alteraciones corneales pero por lo general la visión se mantiene hasta la séptima década de la vida cuando se pierde la transparencia corneal.<sup>69</sup> El tratamiento consiste en queratoplastia penetrante. En el síndrome Meretoja se afectan los nervios craneales (paresia, parálisis bulbar y piel facial laxa) siendo el nervio facial el más afectado. La polineuropatía periférica afecta principalmente las sensaciones de vibración y tacto. Se ha descrito también síndrome del túnel de carpo. Las alteraciones autonómicas incluyen hipotensión ortostática y

anomalías en la conducción cardíaca. Existen otras neuropatías y defectos sensoriales en cara clínicamente significativos.<sup>68-70</sup> La blefarochalasis, entropión, ectropión y lagoftalmos se encuentran frecuentemente entre las alteraciones palpebrales.

Tiene una progresión lenta. En homocigotos (poco frecuentes), el componente sistémico es severo, manifestándose con síndrome nefrótico y falla renal debido a depósitos amiloides glomerulares.<sup>61,70</sup> Esta entidad puede conducir a la muerte debido a las complicaciones cardíacas y renales.

Por otra parte, en los últimos años, el desarrollo de nuevos métodos de análisis genotípico ha permitido un avance considerable en el conocimiento de las bases genéticas de numerosas distrofias corneales. Esta caracterización genética de las distrofias corneales reveló características novedosas como su heterogeneidad genética, es decir, mutaciones en diferentes genes causan un mismo fenotipo de distrofia o su heterogeneidad fenotípica, en la que mutaciones en un mismo gen causan diferentes fenotipos o diferente tipo de distrofia. En consecuencia, mediante la mejora de nuestra comprensión de las distrofias, la información genética reciente ha hecho que el sistema de clasificación fenotípica sea poco preciso.

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Las distrofias corneales se consideran un importante motivo de ceguera a nivel mundial. Son un grupo de enfermedades con gran heterogeneidad clínica y genética. A pesar de los recientes avances en diagnóstico genómico, existen diversas formas de DCA, en las que no se conocen las mutaciones causales. Con el advenimiento de

nuevas tecnologías es posible establecer sus bases moleculares y correlaciones fenotipo-genotipo.

Así, la identificación de DCA es importante para la descripción de nuevas variantes de distrofia corneal que aporten conocimiento de relevancia en el campo de las enfermedades corneales hereditarias.

#### **4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Cuáles son las mutaciones causales en pacientes con distrofias corneales atípicas?

#### **5. JUSTIFICACIÓN**

El análisis genético/genómico de familias afectadas con DCA contribuirá a ampliar el conocimiento de las bases moleculares de las distrofias corneales. Por ello, la aplicación de tecnologías que permiten estudiar todo el genoma o analizar docenas o cientos de genes simultáneamente en el DNA de los pacientes, es una alternativa moderna y eficaz para la caracterización adecuada de estas distrofias atípicas.

#### **6. OBJETIVO GENERAL**

Identificar las mutaciones causales en casos familiares de DCA.

#### **7. DISEÑO DEL ESTUDIO**

Estudio descriptivo, observacional, transversal.

## **8. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **8.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

1. Aceptación a participar en el estudio.
2. Sujetos con distrofia corneal atípica. Se consideró una DCA como aquella en la que se encuentra un fenotipo característico sin el genotipo esperado; un fenotipo característico con patrón de herencia distinto al reconocido en la literatura o un fenotipo novedoso sin etiología genética conocida.
3. Contar con al menos un familiar afectado.

### **8.2. CRITERIOS DE ELIMINACIÓN**

Retiro de consentimiento informado

### **8.3 PACIENTES**

Se analizaron familias con diagnóstico clínico de distrofia corneal atípica. El diagnóstico clínico se realizó por un oftalmólogo con subespecialidad en Córnea. Se analizaron casos familiares referidos al departamento de Genética del Instituto de Oftalmología “Conde de Valenciana” en el periodo de Marzo de 2015 a Junio de 2016 que cumplieron con los criterios de inclusión mencionados. A dichos pacientes se les invitó a participar en el estudio posterior a la aceptación y firma de su consentimiento informado. Se obtuvieron las historias clínicas y oftalmológicas para cada miembro disponible de las familias.

#### **8.4 ANÁLISIS MOLECULAR**

El análisis molecular se realizó según el patrón de herencia de la enfermedad: en los casos sugerentes de herencia autosómica recesiva se llevó a cabo un análisis genómico de homocigosidad con microarreglos de SNPs en genoma completo. Cuando se identificaron regiones homocigotas candidatas, se procedió a la amplificación por PCR y secuenciación nucleotídica de los exones del gen o genes candidatos dentro de esas regiones. En los casos con probable herencia autosómica dominante o casos esporádicos, se procedió directamente al análisis de secuenciación masiva llamado secuenciación de exoma. Esta metodología permite secuenciar en un solo ensayo las regiones codificantes (exones) de todos los genes (o de un subgrupo de genes) en el genoma humano.

#### **8.5 AISLAMIENTO DE DNA GENÓMICO**

Previo consentimiento informado, se extrajeron 2 ml de sangre por punción venosa en cada sujeto a partir de la cual se aisló el DNA genómico mediante el kit QUICKGENE DNA WHOLE BLOOD (DB-S, FujiFilm Co.) Se colocaron 30 microlitros de solución EDB (proteasa) en un microtubo Eppendorf de 1.5 ml. Posteriormente se agregaron 250 microlitros de sangre total (se recomienda el uso de sangre total colectada en EDTA-2Na o EDTA-2K) y 250 microlitros de solución LDB (buffer de lisis). Inmediatamente se mezcló el tubo 5 veces invirtiéndolo de arriba hacia abajo, se agitó con vórtex a máxima velocidad durante 15 segundos y se centrifugó durante unos segundos. La muestra se incubó a 56°C durante 2 minutos y se agregaron 250 microlitros de etanol al 99%. Se repitió la agitación con vórtex durante 15 segundos y la muestra se centrifugó unos segundos.

Dentro de los siguientes 30 minutos se realizó el aislamiento de DNA. Se transfirió el lisado dentro del “cartucho” del sistema automático de aislamiento de ácidos nucleicos QuickGene-810 (se transfiere todo el contenido del microtubos en el cartucho) y se procedió a la extracción automatizada. El DNA genómico obtenido se resuspendió en un volumen aproximado de 200 microlitros. La muestra se almacenó a una temperatura de -20°C hasta su utilización.

#### **8.6 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN Y PUREZA DEL DNA OBTENIDO**

Se determinó la concentración y pureza del DNA extraído por medio de un análisis de absorbancia de la muestra a 260/280 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro. La relación 260/280 permitió evaluar la pureza de la muestra, considerando que la lectura a 280 nm corresponde a la fracción proteica. Se consideraron adecuadas para análisis las relaciones entre 1.6 y 2. Además, se realizó electroforesis en geles de agarosa de cada muestra de DNA obtenida para verificar que no existía degradación de este ácido nucleico. La concentración de DNA obtenida se determinó por la lectura a 260 nm considerando obtener concentraciones promedio de 50 ng/microlitro.

#### **8.7 IDENTIFICACIÓN DE REGIONES DE HOMOCIGOSIDAD EN GENOMA COMPLETO**

La identificación de las regiones de homocigosidad genómicas en DNA de los afectados se realizó por medio de ensayos con microarreglos de DNA Affymetrix de 250 K Nsp y utilizando el kit de reactivos Genechip (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Se fragmentaron 250 ngs de DNA genómico con la enzima NspI (Affymetrix) y ligados a adaptadores específicos necesarios para efectuar una PCR de enriquecimiento de fragmentos de aproximadamente 400 pares de bases, utilizando la enzima AmpliTaq

Platinum (Clontech Laboratories, CA, USA) y un oligonucleótido específico para los adaptadores ligados. Los productos se purificaron y se sometieron a una nueva fragmentación para generar productos menores a 80 pares de bases que se marcaron e hibridaron al microarreglo en un horno de hibridación. Después, el microarreglo se lavó en una estación de fluidos GeneChip 450 (Affymetrix) y se analizó en un escáner de microarreglos 3000 7G, generando así el archivo con los genotipos de 262,264 polimorfismos de base única (SNPs) distribuidos en todo el genoma. Se analizaron solamente las muestras con un índice de identificación (*call rate*) igual o mayor a 95%. La identificación de regiones en las que los SNPs eran homocigotos en DNA de los afectados de cada familia se realizó con el programa HomozygosityMapper ([www.homozygositymapper.org](http://www.homozygositymapper.org)) que permite la comparación simultánea de los 260,000 SNPs e identifica regiones cromosómicas homocigotas mayores de 3 megabases. Una vez identificadas las regiones homocigotas, se realizó un análisis manual para reconocer si algún gen asociado a la distrofia corneal con herencia autosómica recesiva se localiza dentro de una de las regiones de homocigosidad reconocidas. Se dio prioridad a las regiones homocigotas de mayor extensión. De manera alternativa, se utilizó el programa computacional GeneDistiller ([www.genedistiller.org](http://www.genedistiller.org)) para identificar genes candidatos dentro de las regiones de homocigosidad que sean expresados en córnea o se hayan asociado previamente a un fenotipo ocular. Una vez identificados el o los genes candidatos, se procedió al análisis de esos genes por PCR y secuenciación nucleotídica para identificar las mutaciones responsables del fenotipo.

## **8.8 AMPLIFICACIÓN POR PCR**

Se realizó análisis molecular (amplificación por PCR y secuenciación nucleotídica automatizada) del gen o los genes candidatos dentro de las regiones de homocigosidad identificadas. Posteriormente, se efectuó la amplificación por PCR de cada uno de los exones y de las uniones exón/intrón de estos genes a partir del DNA de los sujetos afectados y de sus familiares con la enfermedad, utilizando pares de oligonucleótidos derivados de la secuencia normal de cada exón.

Cada reacción de amplificación de PCR tuvo un volumen final de 15 microlitros que consistió de 7.5 microlitros de HotStart Taq DNA polimerasa master mix (compuesta por 10xPCR buffer que contiene 25mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM de cada dNTP y 2.5 unidades de HotStarTaq DNA polimerasa), de 50-100 ngs de DNA genómico (volumen variable), 1mMol del oligonucleótido correspondiente (sentido y antisentido) y se aforo con agua bidestilada hasta alcanzar el volumen establecido. Se utilizó un programa de temperaturas que incluía 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 para amplificar los exones de los genes candidatos de interés 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 1.5% con tinción de bromuro de etidio para identificar las bandas específicas con el producto amplificado, utilizando como referencia un marcador estándar de peso molecular de 100 pb. Después de reconocer las bandas de interés, se escindieron del gel para la purificación del producto de DNA amplificado utilizando el método de purificación por columna (Promega) o el método de unión a silica (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.

### **8.9 SECUENCIACIÓN AUTOMATIZADA DE LOS PRODUCTOS DE PCR**

Se realizaron nuevas reacciones de PCR para la secuenciación nucleotídica de cada uno de los amplicones de los genes candidatos identificados por el análisis de homocigosidad, incluyendo las uniones exón/intrón. Cada reacción de 10 microlitros contenía 2 microlitros de BigDye Terminator Cycle Sequencing kit mix (Applied Biosystems) que contiene los cuatro dideoxinucleótidos trifosfatados (ddNTPs) marcados por fluorescencia, deoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs) no marcados, Tris-HCl (Ph 9.0), MgCl<sub>2</sub> y la enzima ampliTaQ polimerasa; se agregó además 1 microlitro del oligonucleótido correspondiente a una concentración de 10 micromolar 10-20 ngs del DNA de cada producto de PCR como templado y agua bidestilada para un volumen final de 10 microlitros. Para esta reacción de PCR se utilizó un programa de 25 ciclos que incluyó 30 segundos a 97°C para la desnaturalización, 15 segs a 50°C para el alineamiento y 4 min a 60°C para la extensión.

Los productos de esta segunda amplificación de PCR se purificaron por medio de columnas Centri-Sep (Applied Biosystems) para eliminar el exceso de oligonucleótido y de ddNTPs fluorescentes. Cada muestra se resuspendió en 20 microlitros de formamida y posteriormente se desnaturalizó a 95°C por 5 min. Los productos se analizaron por electroforesis capilar en un secuenciador automático ABI Prism 310 y las secuencias de DNA obtenidas en sujetos enfermos se compararon con las secuencias silvestres de los genes de interés para identificar posibles mutaciones.

A la identificación de mutaciones potenciales no descritas previamente en la literatura, se descartó que correspondieran a un polimorfismo benigno mediante el análisis de al menos DNA de 150 sujetos (300 alelos) sin la enfermedad, procedentes del Banco de DNA de la Unidad de Investigación del Instituto de Oftalmología “Conde de Valenciana”.

### **8.10 SECUENCIACIÓN DE EXOMA**

La secuenciación de siguiente generación se realizó utilizando un panel de aproximadamente 5000 genes humanos asociados a enfermedades hereditarias (<http://www.illumina.com/products/trusight-one-sequencing-panel.ilmn>). El kit que incluye los reactivos necesarios para la secuenciación de estos genes se conoce como Trusight one y contiene todos los reactivos necesarios para la amplificación, enriquecimiento de amplicones e indización de muestras.

### **8.11 PREPARACIÓN (ENRIQUECIMIENTO) DE LAS MUESTRAS PARA SECUENCIACIÓN**

Se crearon múltiples librerías de DNA genómico (DNAg) para ser secuenciadas por la tecnología de nueva generación usando el equipo MiSeq (Illumina ). La preparación de las librerías realizó con el kit TruSight One Sequencing Panel Library Preparation (Illumina). Previa cuantificación por fluorometría, se procesaron enzimáticamente 250 ug de DNAg con la tecnología Transposoma de Nextera, en la que simultáneamente el DNAg se fragmenta y se le adicionan adaptadores en los extremos de los fragmentos generados. Los fragmentos tienen los adaptadores P5 en posición 5' y los adaptadores P7 en el extremo 3'. Los fragmentos se someten a amplificación utilizando a los adaptadores P5 y P7 como secuencias blanco para realizar la alineación de primer y la amplificación. Posteriormente, las librerías se marcaron con índices de

aproximadamente 8 nucleótidos. Se generaron tantos índices como muestras se tuvieron. En el siguiente paso, las librerías se mezclaron en cantidades equimolares, después de haber sido cuantificadas por el método fluorométrico (Qubit). Las librerías se hibridaron en una primera etapa con los oligos específicos (TruSight One Oligos) que fueron generados previamente en el programa DesignStudio. Después, se capturaron las regiones blancas que hibridaron con las sondas mediante una purificación con perlas de estreptavidina. Durante este proceso, se realizaron lavados y calentamiento para remover las uniones inespecíficas y enriquecer la librería. Se realizó una siguiente hibridación con los oligonucleótidos o sondas específicas para enriquecer la librería y asegurar la alta especificidad de las regiones capturadas. Se realizó una segunda captura con perlas de estreptavidina y el DNA purificado fue sujeto a una segunda amplificación para asegurar que las librerías generaran resultados de secuenciación de alta calidad. Durante este proceso, se realizaron diferentes purificaciones usando perlas magnéticas. Finalmente, las librerías fueron validadas por método fluorométrico y por PCR en tiempo real usando el kit Kappa Library Quantification (Inochem). Se incluyeron en la secuenciación solamente aquellas librerías que tuvieron una concentración entre de 2 nM-40 nM. Las librerías fueron desnaturalizadas con NaOH antes de ser colocadas en el equipo de secuenciación.

### **8.12 SECUENCIACIÓN DE SIGUIENTE GENERACIÓN**

La secuenciación de siguiente generación se realizó en un equipo MiSeq (illumina) con el que cuenta nuestro instituto. Una vez validadas las librerías se cargaron en la celda (flow cell) del equipo y se eligió el modo de resecuenciación de amplicones. Cada corrida de secuencia es capaz de analizar un máximo de 12 muestras individuales.

### **8.13 ANÁLISIS DE DATOS DE SECUENCIACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE VARIANTES**

El análisis de los datos de cada corrida, control de calidad y cantidad de datos generados por muestra se realizó con el software MiSeq Reporter, incluido en el equipo de secuenciación y visible en la computadora incorporada al equipo. Una vez finalizadas las corridas se procedió a la identificación de variantes en cada muestra. Esto se realizó con el programa informático VariantStudio (Illumina) instalado en una computadora diferente. Este programa permite el análisis de los archivos vcf generados durante la corrida de secuenciación y mediante el uso de una interface intuitiva que no requiere el manejo de un experto en datos de secuenciación masiva permite reconocer las variantes identificadas en cada muestra comparándolas con las descritas en bases de datos como dbSNP, RefSeq, 1000 Genomas, Exome Variant server, entre otros. El programa indica el alelo de referencia, el cambio identificado en la muestra secuenciada, la localización cromosómica y en el cDNA (gen) del cambio, si tal cambio está incluido o no como polimorfismo en las bases de datos, la consecuencia a nivel de la proteína, si tal cambio se encuentra relacionado o no con un fenotipo del OMIM, frecuencia del cambio en bases de datos de poblaciones, índices de conservación filogenética del residuo mutante, entre otras numerosas características.

### **8.14 VALIDACIÓN DE MUTACIONES DELETÉREAS**

Todas las mutaciones identificadas en la secuenciación de siguiente generación se validaron por secuenciación tipo Sanger. En los casos donde se contó con DNA de familiares afectados, se verificó la segregación de la mutación con el fenotipo, también por secuencia Sanger. Por otra parte, se analizó si las mutaciones nuevas identificadas en el estudio estaban incluidas en bases de datos de variantes polimórficas, tales como

el proyecto de los 1000 Genomas (<http://www.1000genomes.org/>) y el Exome Variant Server (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>). Las mutaciones potencialmente deletéreas que no habían sido reportadas previamente en la literatura se investigaron en un panel de 200 alelos control de sujetos Mexicanos sanos para excluir la posibilidad de que se traten de polimorfismos propios de nuestra población. Las mutaciones no descritas previamente no incluidas como polimorfismos en las bases de datos mencionadas y no identificadas en el panel de 200 alelos control, se sometieron a su análisis de patogenicidad in silico.

### **8.15 ANÁLISIS DE PREDICCIÓN FUNCIONAL DE MUTACIONES**

Las mutaciones nuevas identificadas como posibles responsables de la enfermedad serán analizadas mediante los programas de computación Polyphen (polymorphism phenotyping, <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) y PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships, <http://www.pantherdb.org>) para estimar la posibilidad de que la mutación alterara la función de la proteína y por lo tanto fuera causante de la enfermedad. Para fines similares, la conservación entre especies de los residuos proteicos afectados por las mutaciones se determinó mediante el programa computacional ClustalW ([www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/))

### **8.16 TAMAÑO DE MUESTRA**

El tamaño de la muestra constó de sujetos afectados con distrofias corneales atípicas que cumplieron los criterios de inclusión mencionados y fueron referidos al departamento de Genética del Instituto de Oftalmología “Conde de Valenciana” en el periodo de Junio de 2016 a Febrero de 2017.

### **8.17 VARIABLES DE ESTUDIO**

Fenotipo corneal.

Presencia o ausencia de mutación causal.

### **9. ASPECTOS ÉTICOS**

Esta investigación se llevó a cabo de conformidad con la Declaración de Helsinki y todos los sujetos dieron su consentimiento (aprobado por unanimidad en el Comité de Ética en Investigación de nuestro Instituto, con fundamento en los Artículos 20, 21, 22 del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud) para participar previa explicación de la naturaleza de la investigación.

### **10. ASPECTOS DE BIOSEGURIDAD**

El investigador responsable como los investigadores asociados tuvieron el conocimiento en lo relacionado al manejo integral en cuanto a uso, recepción y desecho de residuos peligrosos, productos y/o materiales infectocontagiosos, biológicos de cualquier tipo y potencialmente por cualquier causa, como se encuentra dispuesto en la NOM-087-ECOL-SSA1-2002 referente a Protección ambiental – Salud Ambiental – Residuos peligrosos biológico-infecciosos – Clasificación y especificaciones de manejo.

La toma de sangre periférica de los participantes se realizó como se encuentra señalado en el manual de procedimientos del laboratorio clínico del Instituto. Los residuos de sangre periférica y los residuos líquidos obtenidos durante la extracción de

ADN se desecharon de acuerdo a la NOM-087-ECOL-SSA1-2002 colocándolos en el bote para desechos líquidos RPBI.

Todos los demás desechos obtenidos durante los diferentes procedimientos no tenían riesgo biológico ni químico.

## **11. FINANCIAMIENTO**

Departamento de Genética, Instituto de Oftalmología “Fundación Conde de Valenciana” I.A.P.

## **12. RESULTADOS**

### **12.1 DISTROFIA CORNEAL EN LATTICE UNILATERAL**

PACIENTE #1: Sujeto masculino de 53 años sin antecedentes heredofamiliares relacionados a la patología, que se presentó con dolor ocular, lagrimeo y sensación de cuerpo extraño de 4 años de evolución en ojo derecho, mientras que el ojo izquierdo era asintomático. El paciente refería diabetes *mellitus* de 16 años de evolución. La visión era de 3/200 mediante Snellen para ojo derecho sin mejoría a la visión con estenopeico, mientras que era de 20/40 Snellen el ojo izquierdo el cual se encontraba completamente asintomático. El paciente refirió tener 2 hermanos, de los cuales desconoce antecedentes oftalmológicos o sintomatología ocular. Negó antecedentes oftalmológicos en ambos padres y al momento de la revisión el sujeto refirió que sus 3 hijos se encontraban ocularmente asintomáticos. **(Figura 1)**

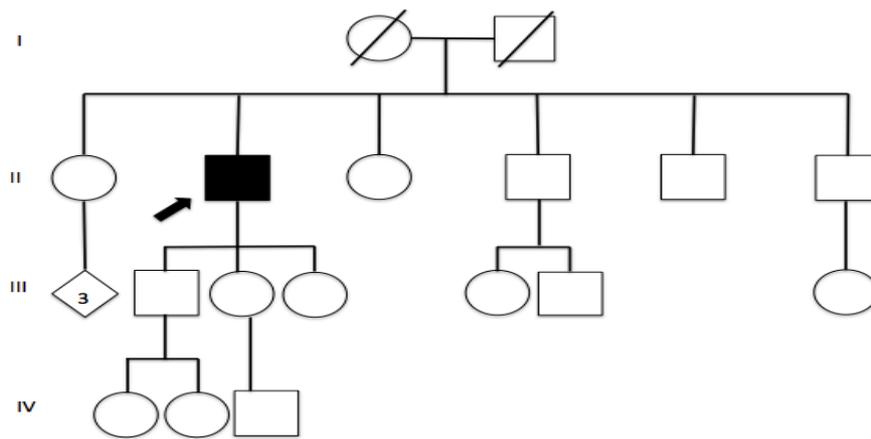


Figura 1. Árbol genealógico del paciente # 1 (Sujeto II-2) o *propositus*.

A la evaluación clínica mediante biomicroscopía, se observó un conglomerado de opacidades corneales lineares, radiales, de aspecto arborizado a nivel subepitelial y estromal anterior que afectaba el eje visual en el ojo derecho. Cabe mencionar que el epitelio se mostraba pobremente adherido lo cual condicionaba la presencia de defectos epiteliales recurrentes. El ojo izquierdo se encontró clínicamente normal sin la presencia de lesiones corneales a ningún nivel. (Figura 2)

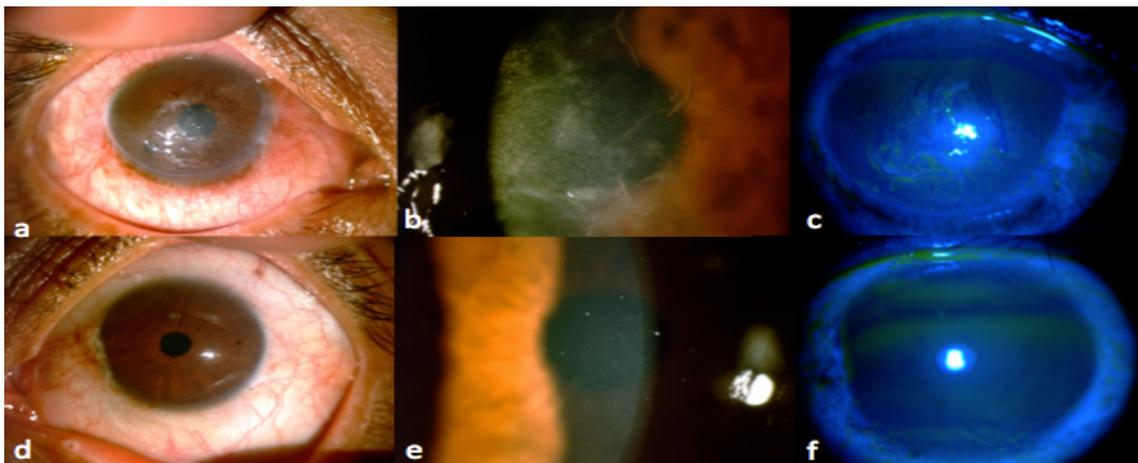
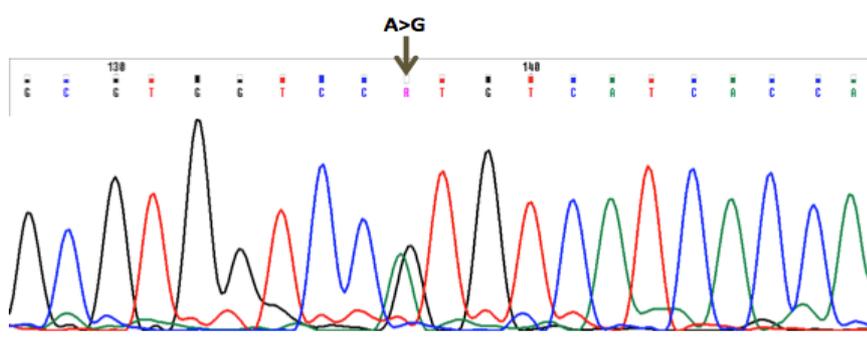


Figura 2. Fotos clínicas del Paciente #1 (sujeto II-2). (a,b) Ojo derecho, con evidencia de opacidad corneal y líneas reticulares en patrón de encaje. (c) Tinción con fluoresceína y filtro con luz de cobalto evidenciando irregularidad epitelial de ojo derecho y algunos defectos epiteliales. (d,e) Ojo izquierdo

sin alteraciones. (f) Tinción con fluoresceína con normalidad del epitelio corneal del mismo ojo.

El cuadro clínico de este paciente correspondió a una DC atípico ya que de manera tradicional las distrofias corneales ocurren de manera bilateral. Basados en el fenotipo y la localización estromal de los depósitos corneales se decidió realizar el análisis molecular del gen *TGFBI*, cuyas mutaciones representan la causa más común de distrofias corneales estromales. El análisis genético del gen *TGFBI* mediante secuenciación nucleotídica, reveló una mutación heterocigota en el exón 14 de este gen en el ADN del paciente. Específicamente, tal cambio correspondió a la transición c.1877A>G, que predice un cambio de sentido equivocado p.His626Arg a nivel de la proteína *TGFBI*. **(Figura 3)** No se logró obtener muestra de ADN genómico de ningún otro integrante familiar debido a su negativa de participar en el estudio.



**Figura 3. Análisis genético del paciente 1 con distrofia corneal atípica. La flecha señala una mutación heterocigota de adenina a guanina en la posición 1877 (exón 14) del gen.**

Actualmente el paciente se encuentra bajo seguimiento clínico para recibir rehabilitación visual mediante una queratoplastia penetrante del ojo afectado y ya recibió consejo genético correspondiente.

## 12.2 DISTROFIA CORNEAL DE THIEL BEHNKE

Paciente # 2: Se presenta el caso de un sujeto del sexo femenino de 67 años que consulta por visión borrosa de larga evolución, sensación de cuerpo extraño y lagrimeo ocasional en ambos ojos. Negaba patología sistémicas pero refería que su padre (finado) y 2 hermanas así como 1 hermano presentaban la misma sintomatología.

(Figura 4)

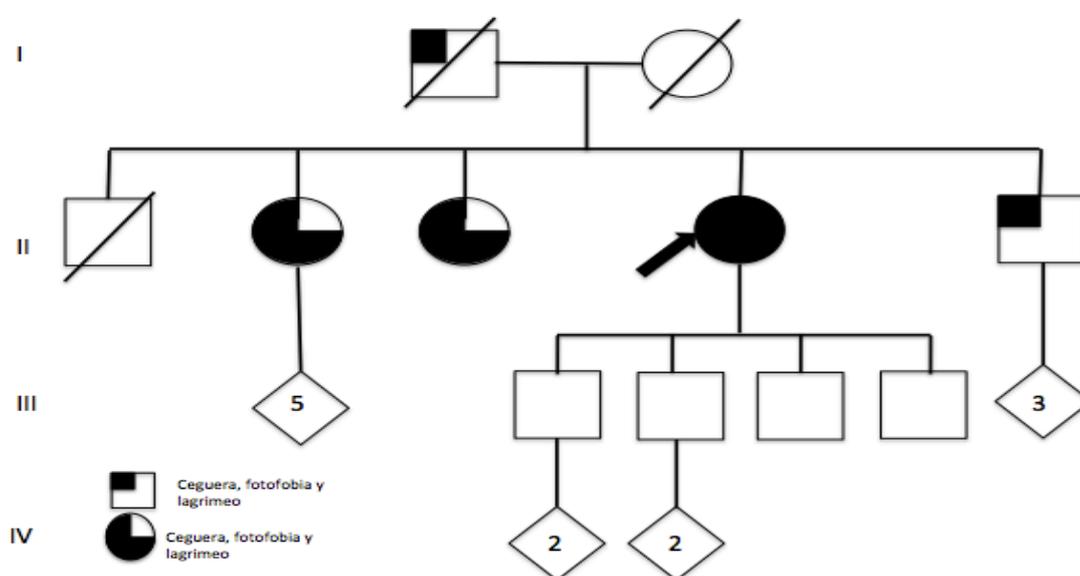
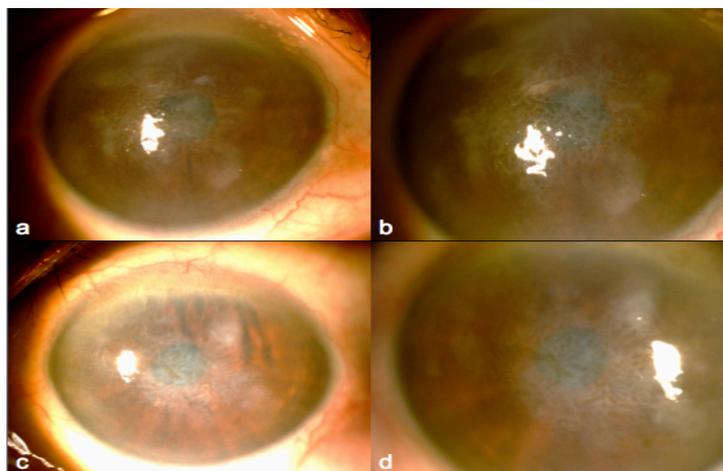


Figura 4. Genealogía del Paciente 2 (Sujeto II-4), señalado con una flecha como *propositus*. Único sujeto disponible con sintomatología disponible para evaluación clínica y genética. Individuos II-2, II-3 y II-5 no disponibles para evaluación clínica. Los sujetos III-2, III-3, III-4 y III-5 clínicamente sanos y sin alteraciones a la evaluación genética.

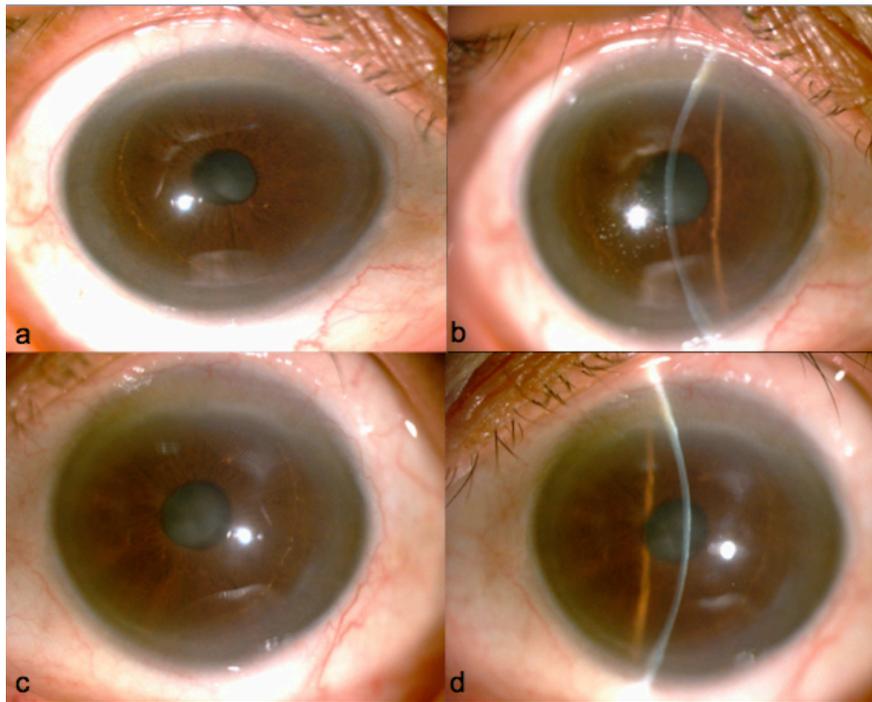
La visión a la exploración inicial era de 20/800 en ambos ojos mediante la cartilla de Snellen, mientras que con agujero estenoico presentaba una mejoría a 20/400 sin ser posible realizar refracción subjetiva por opacidad corneal en ambos ojos. La presión intraocular se encontraba dentro de rangos normales siendo 13 y 12 mmHg para ambos ojos respectivamente.

La exploración oftalmológica mostró la presencia de opacidades en patrón de panal de abeja a nivel subepitelial y estromal anterior de distribución central, originando una superficie corneal irregular en ambos ojos. **(Figura 5)** Al momento de la exploración no hubo evidencia de erosión corneal, aunque la paciente manifestaba episodios de fotofobia y dolor intenso en ambos ojos especialmente durante su cuarta década de la vida.



**Figura 5.** Evaluación por biomicroscopia de ambos ojos del paciente 2. Imágenes clínicas por biomicroscopía del caso índice. (a,b) Ojo derecho con presencia de opacidades en patrón de panal de abeja con obstrucción del eje visual que comprometen la visión. (c,d) Mismos hallazgos clínicos en ojo izquierdo.

Dicho paciente fue manejado mediante queratectomía fototerapéutica transeptelial con láser excimer, realizando una ablación de 240 micras en ojo derecho y 220 micras en ojo izquierdo a una zona óptica de 8 milímetros. La visión postquirúrgica a los 6 meses era de 20/60 que mejoraba a 20/40 Snellen con una refracción subjetiva de +1.25 =-2.50 x 40º en el ojo derecho y de 20/40 que mejoraba a 20/30 con una refracción de +1.00 =-1.75 X 25º. La transparencia corneal se logró con dicho procedimiento quirúrgico y la sintomatología mejoró significativamente. **(Figura 6)**

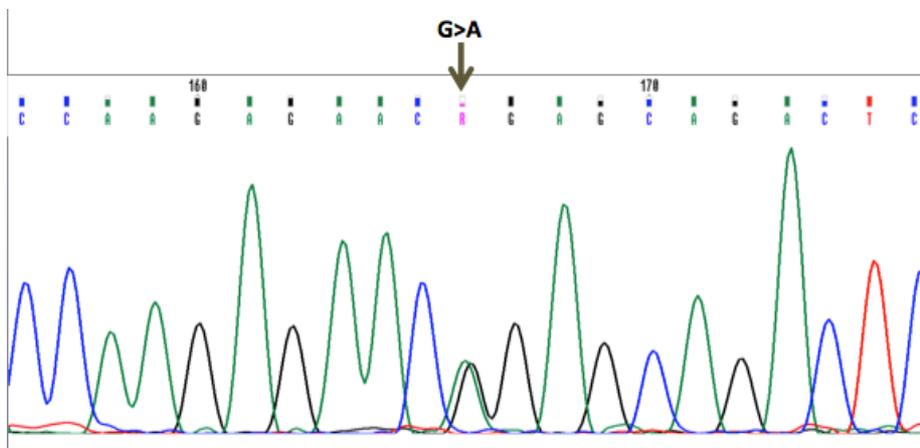


**Figura 6. Imágenes clínicas de segmento anterior de ambos ojos del paciente 2, posterior a queratectomía fototerapéutica. Imágenes por biomicroscopía de ambos ojos. (a,b) Ojo derecho que muestra transparencia corneal y regularidad de la superficie epitelial obtenida posterior al procedimiento quirúrgico. (c,d) Resultados postoperatorios en ojo izquierdo, logrando transparencia corneal y resolución de síntomas.**

La diferenciación diagnóstica entre la distrofia corneal de Reis-Bücklers y la de Thiel-Behnke representa un reto, ya que fenotípicamente comparten características clínicas que las vuelve prácticamente indistinguibles. En cuanto a la distrofia de Thiel-Behnke, sólo existe el reporte de un caso en población mexicana. Por las características clínicas compatibles con este tipo de distrofias se decidió secuenciar el gen *TGFBI* que se conoce ser el gen causal en ambos tipos de distrofias. Debido a la mayor prevalencia de Reis-Bücklers a nivel mundial, inicialmente se consideró la sospecha clínica de esta entidad.

Al realizar la secuenciación nucleotídica mediante el método Sanger del ADN genómico

del *propositus*, se encontró una mutación en estado heterocigoto en el gen *TGFBI* en el exón 12 que corresponde a c.1664G>A, (p.Arg555Gln). **(Figura 7)** Dicha mutación no se encontró en el resto de sujetos evaluados genéticamente (III-2, III-3, III-4, III-5).



**Figura 7.** Análisis genético del paciente 2 con distrofia corneal atípica. La flecha señala una mutación heterocigota de guanina a adenina en la posición la 1664 (exón 12) del gen *TGFBI*.

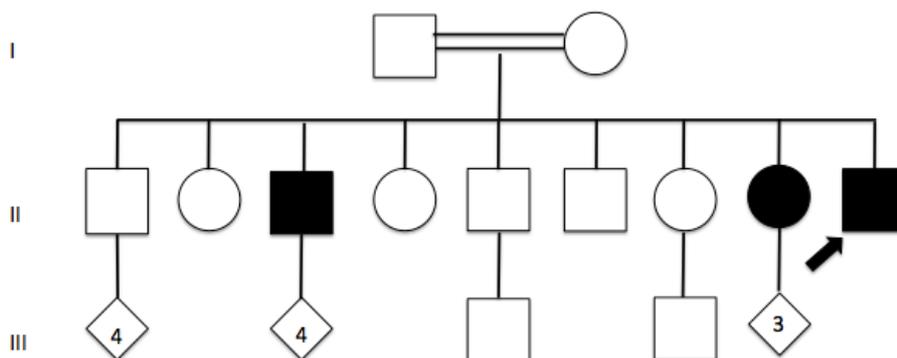
Debido a la mutación puntual encontrada, la cual se considera específica para distrofia corneal de Thiel-Behnke, se realizó el diagnóstico de esta entidad. La paciente fue incluida en este protocolo, debido a la inespecificidad del fenotipo corneal y a la rara incidencia de esta patología en nuestra población. Otro método diagnóstico diferencial es la microscopia electrónica la cual, debido a la falta de tejido corneal para su análisis, no se llevó a cabo.

### **12.3 DISTROFIA CORNEAL GELATINOSA EN FORMA DE GOTA**

A continuación, se describen 2 casos familiares con identificación de mutaciones nuevas en ambos casos.

Paciente #3: En el primer caso familiar, se trató de un paciente masculino de 30 años que consultó por baja visual progresiva severa en ambos ojos desde la segunda década de la vida. Refiere haber sido sometido a un procedimiento de queratectomía fototerapéutica en ambos ojos hace 14 años con recidiva del cuadro.

En cuanto a los antecedentes heredofamiliares, existía historia de consanguinidad entre ambos padres (primos hermanos) y 2 hermanos afectados con diagnóstico clínico previo en otras instituciones, de los cuales solamente se pudieron evaluar a una hermana. **(Figura 8)**



**Figura 8. Genealogía del Paciente 3 con diagnóstico de DCGFG. Genealogía del primer caso familiar de DCGFG. Propositus II-9 señalado con flecha negra. Se muestra el antecedente de consanguinidad que sugiere herencia autosómica recesiva. Se muestran los sujetos II-3 y II-8 quienes se encuentran clínicamente afectados con el diagnóstico clínico de DCGFG.**

En el caso índice, la visión en ambos ojos era 20/800 que mejoraba con agujero a 20/400 mediante cartilla de Snellen y de movimiento de manos sin mejoría respectivamente. La exploración mediante lámpara de hendidura permitió observar, las clásicas lesiones nodulares blanco-amarillentas en la superficie corneal, en patrón de mora, de aspecto gelatinoso de predominio en media periferia con involucro importante del eje visual de manera bilateral en los dos sujetos afectados que estuvieron disponibles para evaluación. Todo ello acompañado de vascularización corneal a nivel de estroma superficial. **(Figura 9)**

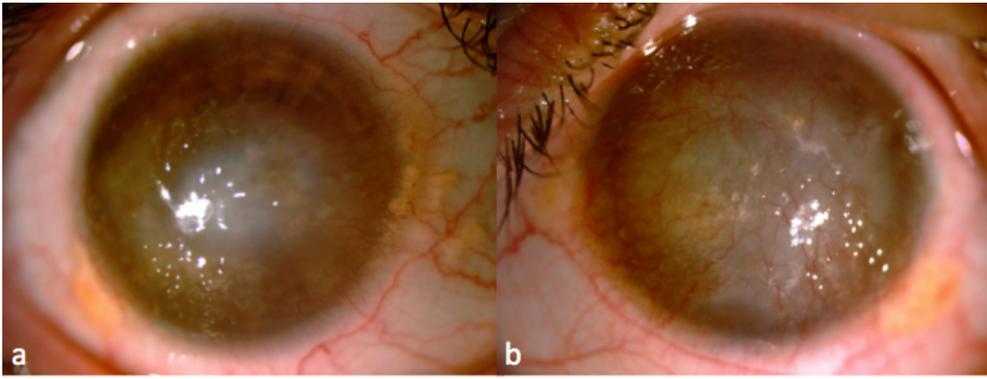


Figura 9. Fotografías clínicas de superficie ocular en ambos ojos del paciente 3. (a) Ojo derecho (b) Ojo izquierdo. Imágenes de biomicroscopía que muestran en ambos ojos opacidad corneal de distribución global de aspecto gelatinoso, granular, con vascularización superficial e irregularidad superficial. Dichas opacidades involucran el eje visual ocasionando discapacidad visual.

La evaluación del segmento posterior no era posible por opacidad corneal, sin embargo por ecografía se reportaba sin alteraciones. Al *propositus* se le realizó implante de queratoprótesis de primera intención sin complicaciones en el ojo izquierdo con una agudeza visual final de 20/25 en su última revisión a los 8 meses. **(Figura 10)** El otro ojo se mantuvo en vigilancia clínica, mientras que la hermana afectada se registró a lista de espera en un banco de ojos local.

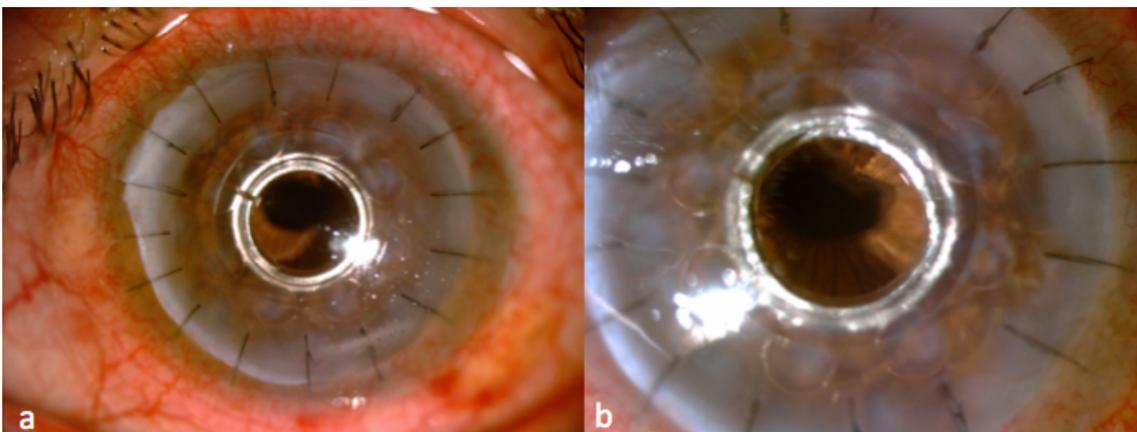
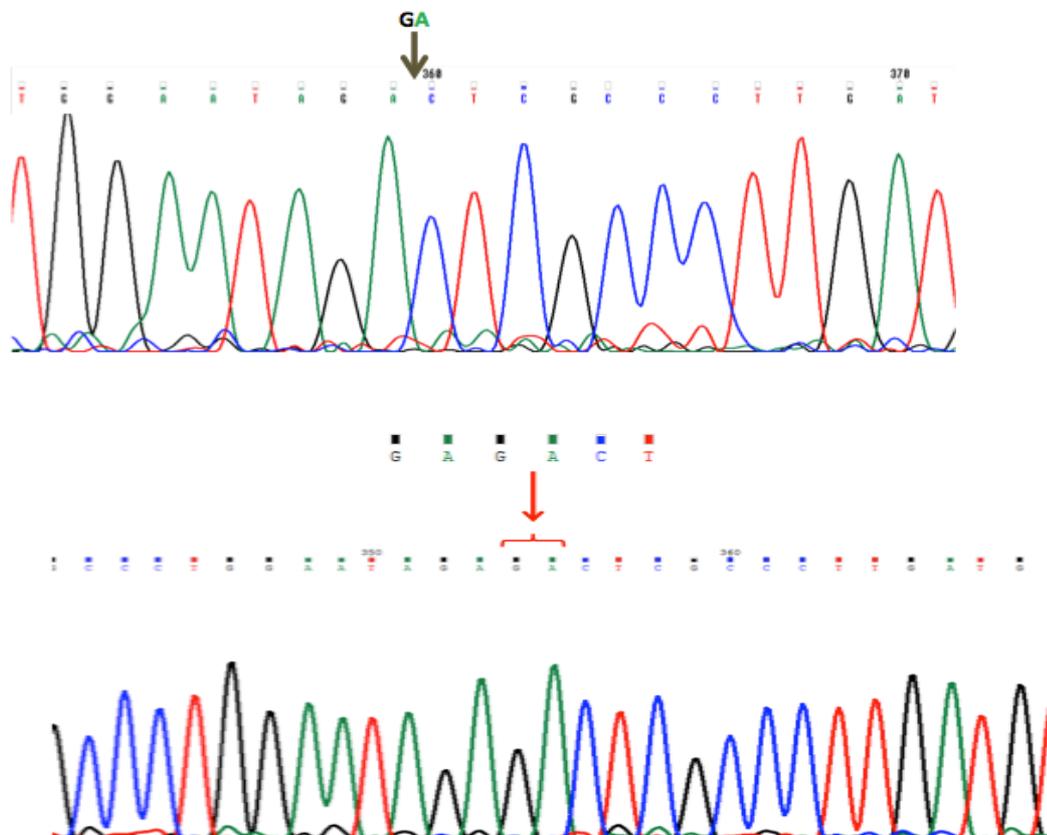


Figura 10. Imagen clínica de queratoprótesis de Boston tipo 1 de ojo izquierdo del paciente 3. (a,b) Imágenes de biomicroscopía de ojo izquierdo del paciente 3 (II-9) 8 meses posterior a la colocación de

**Queratoprótesis de Boston tipo 1. Se observa el plato de la queratoprótesis in situ con el óptico a nivel de eje visual recobrando la transparencia de medios.**

Se decidió incluir este caso familiar, debido a la rara incidencia de esta entidad en nuestro medio, siendo mayor su incidencia en poblaciones asiáticas. El único gen conocido para esta entidad, es *TACSTD2*, por lo que se secuenció su único exón al considerarse el gen candidato.

El análisis genético mediante secuencia de nucleótidos por el método Sanger, evidenció en el gen *TACSTD2* del ADN de ambos hermanos afectados un cambio homocigoto c.703\_704delCT, p. Leu235Ilefs\*141, (**Figuras 11 y 12**) mientras que dicho cambio se encontró en estado heterocigoto para la madre de los afectados. (**Figura 13**)



**Figura 11. Análisis genético del paciente 3 con distrofia corneal atípica. Secuencia parcial del gen *TACSTD2* que demuestra una delección homocigota de dos pares de bases c.703\_704delCT (parte**

superior). Esta mutación predice una alteración del marco de lectura p.Leu235Ilefs\*141 en la proteína *TACSTD2*. Secuencia parcial normal del gen *TACSTD2* en la región de interés. (parte inferior)

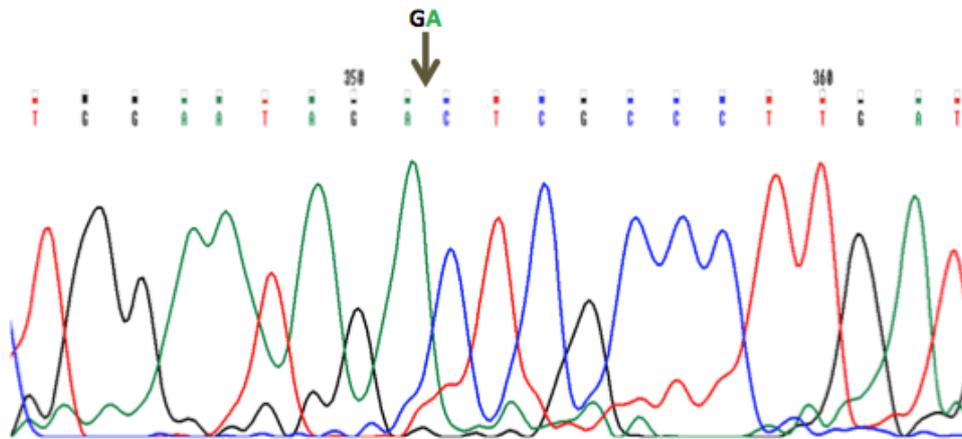


Figura 12. Análisis genético del sujeto II-8 (hermana del probando) con distrofia corneal atípica. Secuencia parcial del gen *TACSTD2* que demuestra una delección homocigota de dos pares de bases c.703\_704delCT. Esta mutación predice, al igual que en el paciente 3, una alteración del marco de lectura p.Leu 235Ilefs\*141 en la proteína *TACSTD2*.

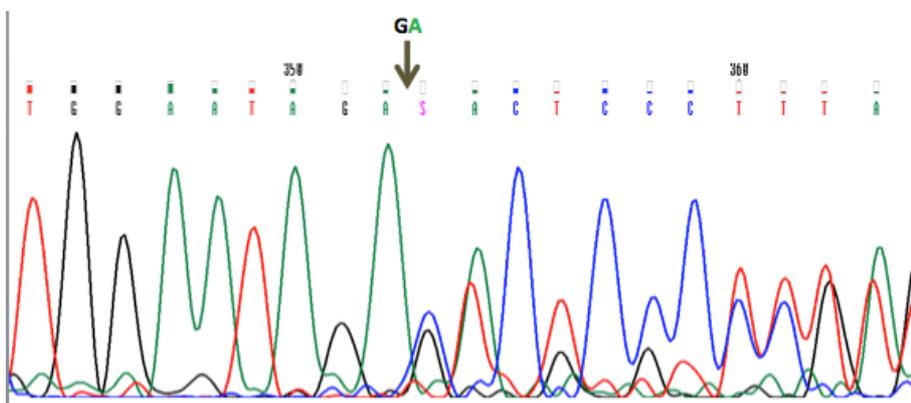
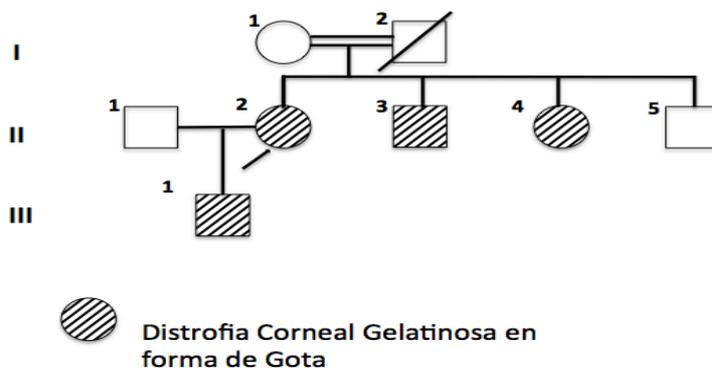


Figura 13. Secuenciación tipo Sanger en el sujeto I-2, madre del paciente 3. Secuenciación del sujeto I-2 (madre) que muestra una delección heterocigota c.703\_704delCT, p.Leu 235Ilefs\*141 en el gen *TACSTD2* que le confiere el estado de portadora, sin afectación clínica.

En el segundo caso familiar de DCGFG, se identificaron 4 casos en 2 generaciones de una familia afectada. Todos los sujetos consultaron por una historia clínica de larga evolución caracterizada por fotofobia, sensación de cuerpo extraño así como

discapacidad visual.

Los 3 hermanos afectados de la segunda generación eran producto de un matrimonio consanguíneo. **(Figura 14)**



**Figura 14. Genealogía del paciente 4 con DCGFG. Paciente 4, señalado con flecha negra, así como los sujetos sometidos a análisis genético y afectación clínica. No se conoce si existe antecedente de consanguinidad entre sujetos II-1 y II-2.**

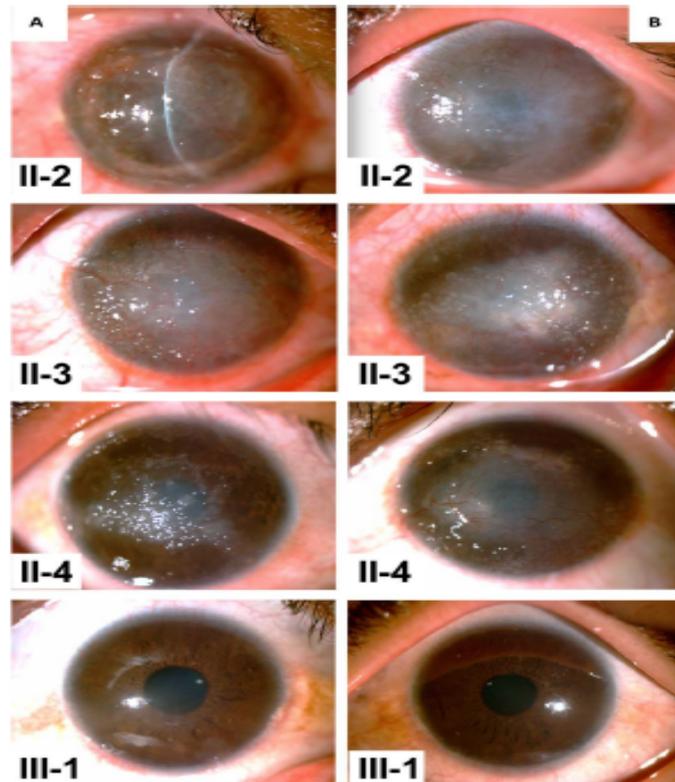
El paciente #4 (II-2) era una mujer de 35 años con una capacidad visual de percepción de luz en ambos ojos. Su historia oftalmológica consistía en una queratoplastia penetrante en ojo derecho a la edad de 26 años, que al momento de la exploración se encontraba con recidiva de la enfermedad.

El sujeto II-3 era un masculino de 21 años con una capacidad visual mediante cartilla de Snellen de 20/2000 en ambos ojos. El caso II-4 era una mujer de 19 años con capacidad visual de 20/160 en el ojo derecho y 20/800 en el izquierdo. Los 3 hermanos no presentaban alteraciones sistémicas asociadas.

El sujeto III-1 era un sujeto masculino de 14 años con una visión mejor corregida de 20/30 y 20/40 en ambos ojos, respectivamente. La evaluación mediante lámpara de hendidura en este paciente, reveló lesiones nodulares incipientes en la superficie

corneal periférica que respetaban parcialmente el eje visual de ojo derecho. Cabe señalar que había ausencia de vascularización corneal. Desafortunadamente, el padre de este sujeto no estuvo disponible para análisis genético ni evaluación clínica.

A la exploración mediante lámpara de hendidura en los sujetos afectados, se identificaron hallazgos clínicos clásicamente compatibles con DCGFG. **(Figura 15)**

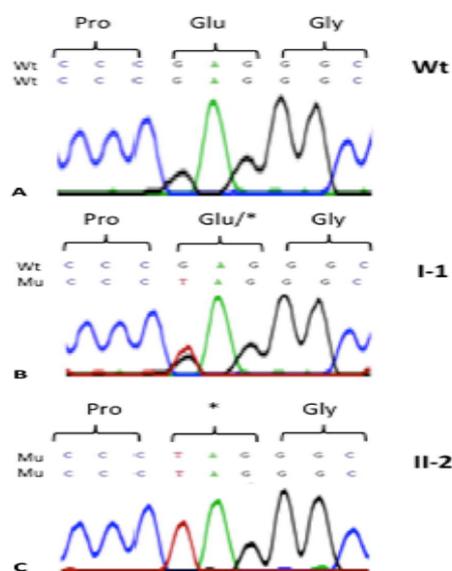


**Figura 15.** Imágenes por biomicroscopía de segmento anterior de sujetos afectados en este caso familiar. Los primeros 3 casos con múltiples lesiones nodulares blanco-amarillentas en la superficie corneal, predominantemente periféricas pero con involucro central, así como vascularización estromal. El caso III-1 con lesiones nodulares incipientes en ambas córneas involucrando parcialmente el eje visual en ojo derecho. A, ojo derecho. B, ojo izquierdo.

Debido a la imposibilidad para realizar la evaluación clínica del fondo de ojo, se realizó ecografía ocular modo B, la cual no mostró alteraciones en los sujetos estudiados.

El sujeto I-1 era una mujer sana de 67 años (madre de los sujetos II-2, II-3 y II-4) con una capacidad visual 20/30 en ambos ojos. La biomicroscopía se encontraba sin alteraciones al analizar el segmento anterior ocular.

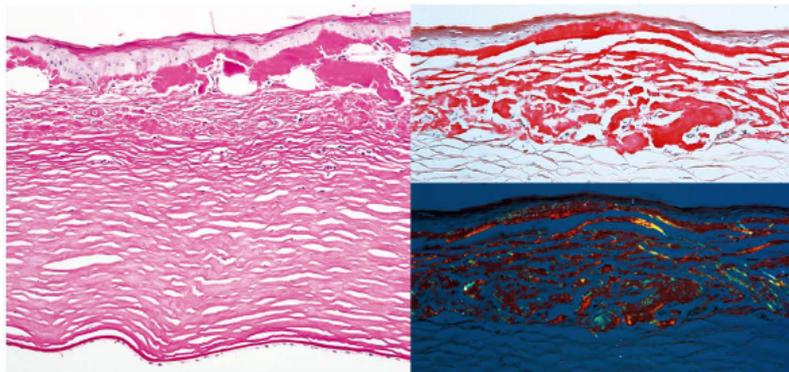
La secuenciación nucleotídica del gen *TACSTD2* del ADN de los sujetos II-2, II-3, II-4 y III-1, reveló una transversión homocigota c.331G.T lo cual traduce para una mutación sin sentido en el aminoácido en la posición 111 p.(E111\*) de la proteína. Dicha mutación se encontró en forma heterocigota en el ADN del sujeto sano, I-1. **(Figura 16)**



**Figura 16. Secuenciación parcial del gen *TACSTD2* en el paciente 4. (A) Secuencia normal de un sujeto control (wt). (B) Sujeto I-1 (sano) que muestra heterocigosidad para la transversión c.331G.T, que predice la mutación sin sentido p.(E111\*). (C) ADN del paciente 4 (II-2) demostrando homocigosidad para la mutación mencionada. Glu, ácido glutámico; Gly, glicina; Mu, mutado; Pro, prolina; Wt, wild type. \*stop.**

A los sujetos con afección clínica más severa (II-2, II-3 y II-4) se les realizó queratoplastia penetrante óptica en 1 ojo, con injertos transparentes después de 1 mes. La capacidad visual mejoró significativamente a 20/200 Snellen en los sujetos II-2 y II-3, y mejoró a 20/100 en el sujeto II-4. La evaluación histopatológica de las córneas

trepanadas de estos pacientes reveló epitelio con leve acantosis con cambios hidrópicos. La capa de Bowman estaba reemplazada por tinción positiva para ácido-Schiff y rojo Congo, la cual bajo luz polarizada reveló la típica birrefringencia verde-manzana, indicativa de material amiloide. Asimismo, el estroma corneal anterior mostraba leve cicatrización, mientras que la membrana de Descemet y el endotelio eran normales. **(Figura 17)**



**Figura 17.** Análisis histopatológico de la córnea del paciente 4. Se demuestra epitelio corneal con acantosis; la capa de Bowman muestra tinción PAS positiva (izquierda) y tinción rojo-Congo positiva (arriba a la derecha), la cual bajo luz polarizada muestra la típica birrefringencia verde-manzana (abajo a la derecha) indicativa de material amiloide. Magnificación 200x).

#### **12.4 DISTROFIA CORNEAL ENDOTELIAL DE FUCHS**

Se analizó a una familia en 2 generaciones con diagnóstico clínico de distrofia endotelial de Fuchs. Paciente #5: femenino de 67 años que consultó por baja visual de larga evolución y se evaluaron 2 hermanas afectadas con la misma sintomatología. En la genealogía de dicha familia, existía el antecedente de consanguinidad (primos hermanos) entre los padre de los individuos afectados con un sugerente patrón de herencia autosómico recesivo. **(Figura 18)**

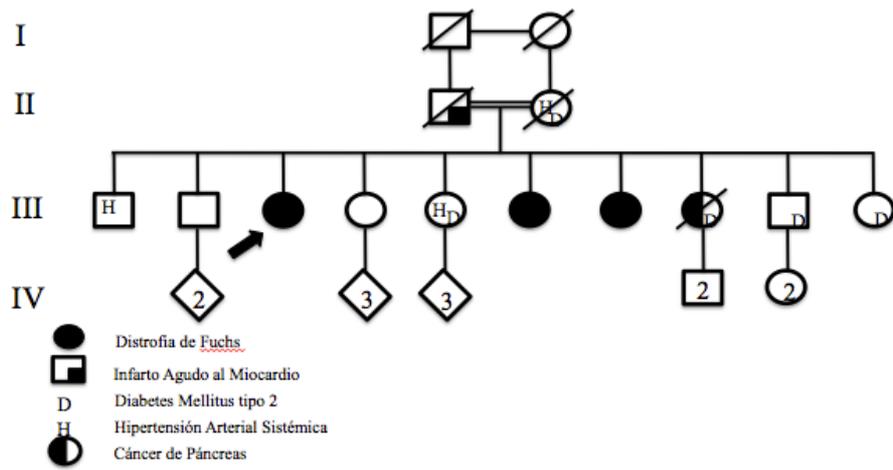


Figura 18. Genealogía de caso familiar con DCEF. Genealogía sugestiva de un patrón de herencia autosómico recesivo. El paciente 5 está señalado por una flecha negra. Sujetos II-3, II-6 y II-7 clínicamente afectados.

A la exploración oftalmológica mediante lámpara de hendidura se evidencian líneas de fibrosis subepitelial, vascularización superficial periférica, así como la presencia de guttae corneales. (Figura 19) Todo lo anterior, condicionando una mala visión.

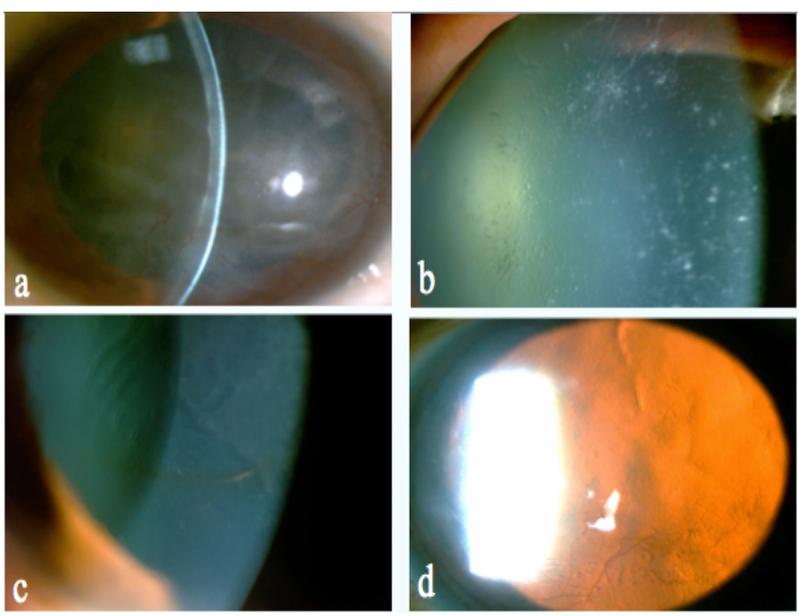
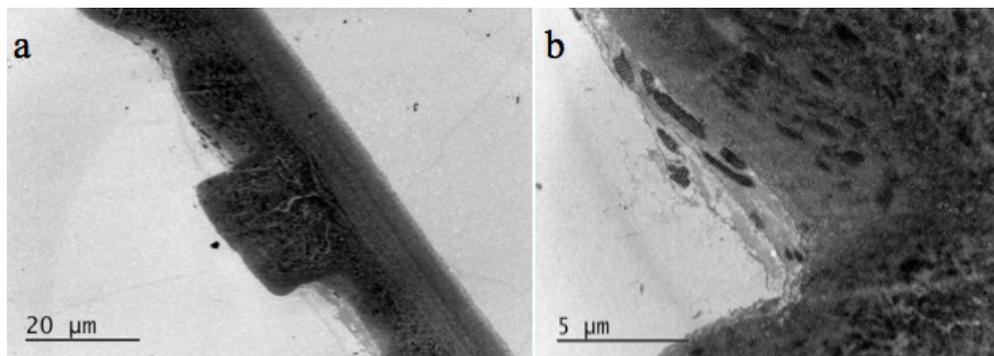


Figura 19. Imágenes clínicas de segmento anterior del paciente 5. (a,b) Ojo derecho con presencia de fibrosis subepitelial, guttae con irregularidad en córnea posterior. (c,d) Mismos cambios encontrados

en ojo izquierdo.

El caso índice (III-3), presentaba lagrimeo, fotofobia y sensación de cuerpo extraño de larga evolución. La agudeza visual inicial era de percepción de movimiento de manos en ojo derecho y de 20/800 Snellen en ojo izquierdo se sometió a trasplante corneal de ambos ojos para rehabilitación visual. Los individuos III-6 y III-7 presentan cambios corneales clínicamente incipientes en ambos ojos.

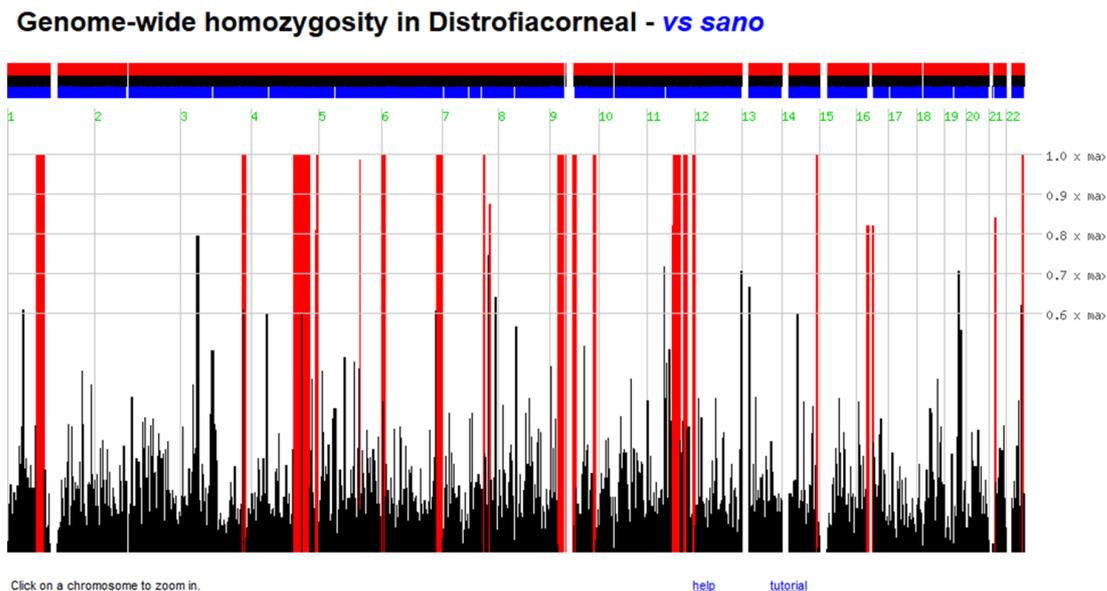
Posterior a la realización de la queratoplastia penetrante en el *propositus*, el tejido corneal se sometió a análisis histopatológico teniendo hallazgos compatibles con distrofia endotelial de Fuchs. Por microscopía electrónica de transmisión se evidenciaron excrescencias nodulares, compatibles con *guttae* corneales con ausencia de endotelio en dicha zona, lo cual se correlaciona con DCEF. **(Figura 20)**



**Figura 20.** Imágenes de microscopía electrónica de tejido corneal del paciente 5. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión que muestran excrescencia nodular con un espacio amplio de colágena posterior a la membrana de Descemet y fibronectina. (a) 20um (b) 5 um

En lo que corresponde al análisis genético, se realizó análisis de homocigosidad en el que se identificaron varias regiones de homocigosidad mayores a 3 megabases.,

específicamente en los cromosomas 4, 1, 9, 11 y 6. **(Figura 21)**



**Figura 21.-** Imagen del resultado del análisis de homocigosidad en DNA del paciente 5. Las barras rojas de mayor amplitud representan las regiones cromosómicas con homocigosidad mayor a 3 megabases. Como se aprecia, las principales regiones de homocigosidad se encontraron en segmentos de los cromosomas 4, 1, 11, 9 y 6.

Estas regiones identificadas fueron analizadas con el programa GenDistiller, que permite filtrar los genes presentes dentro de tales regiones y separarlos por varios parámetros, como por ejemplo su involucro en enfermedades corneales o su expresión en córnea. Sin embargo, el análisis de tales regiones no permitió identificar un gen o genes candidatos responsables de la enfermedad.

Debido a la falta de resultados tras el análisis de homocigosidad en esta familia, se procedió a realizar secuenciación de exoma en el DNA de tres sujetos afectados (II-3, II-6 y II-7). Este análisis permitió la identificación de 36 variantes en 33 genes distintos. **(Tabla 2)**. Sin embargo, al realizar la secuenciación específica para dichas variantes no se logró confirmar segregación de la mutación en los afectados de la familia y por lo

tanto se descartaron tales variantes como mutaciones causales.

**Tabla 2. Variantes identificadas por secuenciación de exoma en DNA II-3, II-6 y II-7 con DCEF**

GEN	VARIANTE
FGF2	Ex 1 c. 156 C>T p.S52S rs1449683
	Ex 1 c.577+17T>C rs41333248
NUDT6	Ex 1 c. 12 A>G p. P4P rs13134412
	Ex 2 c.340T>C p. C114R rs12648093
	Ex 5 c.626G>A p.R209Q rs1048201
PRDM5	Ex 15 c. 1904 A>T p.S554C
TMPRSS11A	c.3 G>A p. M1I
ZFYVE19	c.112_113insGGGGC p.W38Gfsx73
HEATR7B2	c.572 G>A p.W191*
SLC22A24	c.1503T>G p.Y501 * rs11231341
NEB	c.14734A>G p.N4912D
NDST4	c.728 C>T p. S243F
TAS2R7	c.640 C>T p.R214X
KRTAP9-9	c.33-34ins15 p.11-T12ins 5
FREM3	c. 3710 G>A p.R1237Q
HLADQA1	c. 592 C>A p.Q198K
GALNTL5	c.1192 C>G p.R398G
KLHDC7B	c.279C>G p.D93E
RSF1	c.3043 A>T p.T1015S
C7orf29	c.665 del p.A222Asf
WRNIP1	c. 1531 C>T p.R511W
CDC42EP1	C.758_778 del p.A254_P259del
KRTAP5-1	c.330_359 del p.G110_C119del

PGM5	c. 1682 G>A p.R561K
MYO7A	c. 61 G>A p.D21N
KRT1	c.1669_1689 del p.S557_G563 del
FCHSD2	c.451 G>T p. G151C
NBPF10	c.8989 A>T, A>G p.K2997X, p.K2997E
SLC35G5	c.137 G>A p.G46D
GLMN	c.144 T>G p.I48M
OR1B1	c.44_4insT p.L25FfsX9
CTBS	c.367 A>C p.I123L
GBP7	c.1402 G>A p.V468M
SLC44A3	c.416 (-75) T>G
MMP12	c.851 C>T p.284L
LUM	C.511 del G

## 12.5 SÍNDROME DE MERETOJA

Se analizó un caso familiar en 3 generaciones, cuyo caso índice de trata de una mujer de 59 años con 3 hermanos y 2 hijos afectados. **(Figura 22)**

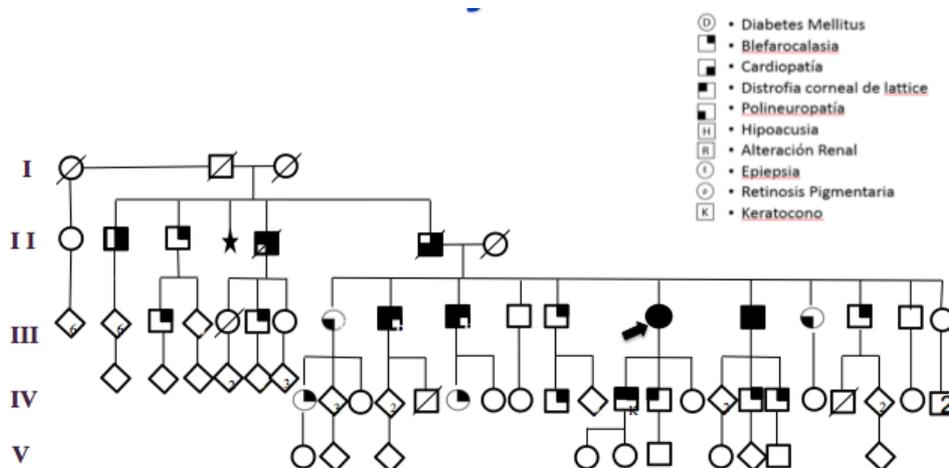
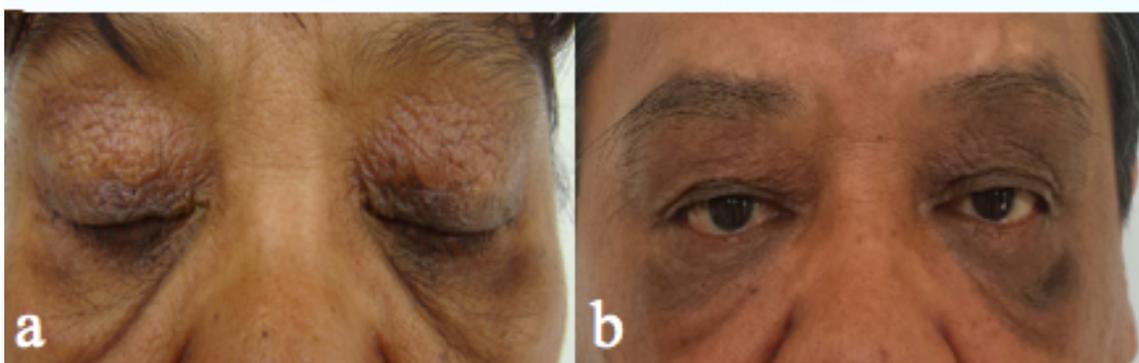


Figura 22. Genealogía en 5 generaciones, el paciente 6 se encuentra señalado por una flecha negra. 2

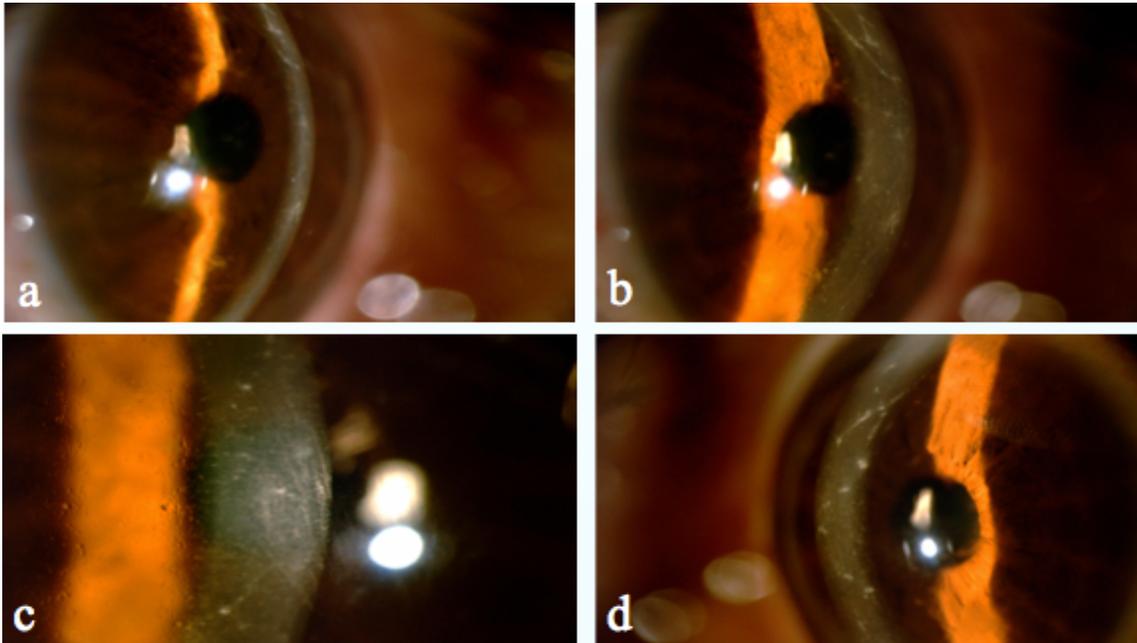
hijos del probando y 3 hermanos con afectación corneal. Patrón de herencia sugerente de ser autosómico dominante.

El paciente #6 y 2 hermanos consultaron por historia de sensación de cuerpo extraño en superficie ocular y mala visión de larga evolución. Asimismo, presentaban blefarochalasis de más de 20 años de evolución asociado a polineuropatía. La exploración física y oftalmológica reveló la presencia de hiperpigmentación en la región palpebral superior e inferior de ambos ojos así como una marcada hiperlaxitud de piel en dicha zona en los sujetos afectados. **(Figura 23)**



**Figura 23.** Imágenes de región palpebral en sujetos afectados de la misma familia. (a) Sujeto III-13 (probando) con marcada hiperpigmentación peripalpebral e hiperlaxitud de piel en dicha región. (b) Hermano de la probando (III-14) con los mismos hallazgos.

A la exploración oftalmológica, se evidenció la presencia de líneas finas reticulares en patrón de encaje, con distribución centripeta. Dichas opacidades involucraban el eje visual, causando discapacidad visual. **(Figura 24)** La visión en el caso índice era de 20/800 en ambos ojos que no mejoraba con su corrección. Cabe mencionar que el resto de la exploración oftalmológica era normal.



**Figura 24.** Imágenes clínicas de segmentos anterior de ambos ojos del paciente 6. (a,c) Fotografías de ojo derecho donde se hacen evidentes líneas reticulares en patrón de encaje, a nivel estromal y subepitelial con distribución centrípeta. (b,d) Mismos hallazgos clínicos en ojo izquierdo.

En cuanto al análisis genómico se realizó secuenciación del gen Gelsolina, único gen conocido para esta enfermedad, sin encontrar mutación alguna en los sujetos clínicamente afectados. Asimismo, se secuenció el gen Transtiretina (TTR) asociado a un tipo de amiloidosis con afección hepática y retiniana sin encontrar mutación alguna.

### **13. DISCUSIÓN**

Las distrofias corneales son un grupo heterogéneo de enfermedades hereditarias que afectan las diferentes capas de la córnea y que no se asocian a procesos inflamatorios.<sup>71</sup> Aunque en general se transmiten hereditariamente de una manera autosómica dominante, existen ciertas formas que presentan herencia autosómica recesiva o incluso ligada al cromosoma X. En años recientes los avances notables en el conocimiento del genoma humano así como el mejoramiento de las técnicas de

secuenciación del DNA han permitido reconocer la etiología molecular de numerosas distrofias corneales.<sup>72,73</sup> De esta manera, el consenso actual de clasificación toma en cuenta no solamente las características clínicas de la alteración corneal sino también el conocimiento o no de las bases genéticas de la enfermedad. Así se ha podido reconocer, por ejemplo, que diversas distrofias corneales que en el pasado se consideraban enfermedades distintas, son realmente variantes clínicas de mutaciones en un mismo gen, como ocurre particularmente para las distrofias asociadas al gen *TGFBI*.<sup>74,75</sup> Por otra parte, el reconocimiento de nuevos genes asociados a la enfermedad ha permitido un avance notable en el conocimiento de los procesos fisiológicos normales de la córnea al identificar la función de estos genes y los mecanismos de daño corneal cuando se encuentran mutados. Este conocimiento ha impactado de manera positiva en el proceso de diagnóstico y tratamiento de los pacientes ya que en la actualidad es posible realizar diagnósticos genéticos tempranos en un gran número de pacientes con diversas formas de distrofias corneales en las que existe un gen responsable identificado. Las correlaciones genotipo-fenotipo en este grupo de pacientes se han refinado de tal manera que de acuerdo al fenotipo corneal es posible predecir el gen mutante que origina la distrofia corneal y en algunos casos, inclusive la mutación específica. Por otra parte, la disponibilidad cada vez más amplia de laboratorios de diagnóstico molecular en instituciones de salud de tercer nivel permite que un mayor número de sujetos tenga acceso al diagnóstico molecular contribuyendo así al reconocimiento de patrones mutacionales en grupos étnicos específicos que pueden incluir efectos de mutaciones fundadoras, variabilidad en la expresión clínica de ciertas variantes y detección de mutaciones nuevas.<sup>72,76</sup>

A pesar de estos avances, existe un pequeño grupo de pacientes con distrofias

corneales en el que el diagnóstico genético definitivo se complica por la presentación atípica de la enfermedad. A estos casos se les denomina DCA y pueden definirse como aquellos casos en los que un fenotipo corneal característico no coincide con el genotipo esperado; casos con un fenotipo corneal característico pero con un patrón de herencia distinto al descrito en la literatura; o casos en los que el fenotipo corneal no corresponda a las variantes descritas en la literatura mundial y por lo tanto se desconoce su etiología genética.<sup>77-80</sup> El reconocimiento de las causas genéticas de estas formas atípicas es de gran importancia pues podrían contribuir a la identificación de nuevos genes de distrofia corneal, a la caracterización de mecanismos de mutación novedosos o a la definición de nuevos tipos de la enfermedad.

En este trabajo se presentan los resultados de un estudio clínico y genético en un grupo de sujetos Mexicanos con DCA y de algunos casos con distrofias corneales, que aunque no se consideran atípicas, son de presentación infrecuente y no existen reportes de su estudio en nuestro país. El grupo incluyó un caso de distrofia corneal unilateral de tipo *lattice*, un caso de distrofia corneal superficial de Thiel-Behnke, 2 casos familiares no relacionados de una forma sumamente infrecuente conocida como distrofia gelatinosa en forma de gota, un caso familiar de una distrofia endotelial semejante a distrofia de Fuchs y un caso familiar de distrofia corneal con fenotipo compatible con síndrome de Meretoja. A continuación se discuten los aspectos sobresalientes de los resultados clínicos y genéticos en cada caso.

En el paciente con diagnóstico de distrofia corneal en *lattice* unilateral se identificó que la enfermedad era resultado de la mutación P.His626Arg en *TGFBI*. Esta mutación, que sustituye un residuo de histidina por uno de arginina en la proteína, ha sido descrita previamente en pacientes con distrofia tipo *lattice* de diversas

poblaciones<sup>81</sup> e incluso es la mutación más frecuente en pacientes Vietnamitas con esta enfermedad.<sup>82</sup> En dos estudios previos realizados en pacientes Mexicanos se observó que virtualmente todos los sujetos con fenotipo *lattice* presentaban la mutación p.His626Arg.<sup>83,84</sup> Aunque se requieren mayores estudios, estos datos pueden indicar la presencia de un efecto fundador de esta mutación en pacientes con distrofia corneal de *lattice* de nuestro país.<sup>83</sup> Alternativamente, la alta frecuencia de esta mutación pudiera deberse a eventos mutacionales múltiples e independientes. El análisis comparativo de marcadores polimórficos ligados al gen *TGFBI* entre sujetos no relacionados y que portan esta mutación, permitirá identificar el origen de la frecuencia elevada de esta mutación en nuestros pacientes con esta variante de distrofia corneal estromal. Por otra parte, es importante señalar que esta misma mutación se ha identificado en sujetos con fenotipos notablemente asimétricos (mayor afectación en una córnea) de la distrofia corneal, tanto en nuestra población<sup>83</sup> como en otros grupos étnicos.<sup>13,15,82</sup> Estas observaciones indican que la mutación p.His626Arg en *TGFBI* puede resultar en un fenotipo variable o asimétrico o incluso unilateral como en el caso del paciente incluido en este trabajo. Aún cuando se desconoce por qué esta variante patogénica se asocia a una gran variabilidad en la expresión clínica, se ha sugerido que la coexistencia de otras variantes en *TGFBI* o en otros genes modulan el fenotipo final expresado.<sup>85,86</sup> Dada esta correlación genotipo-fenotipo, la búsqueda de la mutación His626Arg de *TGFBI* está justificada en un paciente en el que se observa una distrofia estromal de presentación asimétrica o unilateral.

En la familia estudiada en este trabajo, existió limitación para el acceso a la evaluación clínica y genética de otros familiares posiblemente afectados, debido a su negativa a

participar en el estudio.

En lo referente al estudio del caso con diagnóstico de Distrofia de Thiel-Behnke, el estudio genético permitió la identificación de la mutación causal p.Arg555Gln en *TGFBI*. Debido a las características fenotípicas corneales, este paciente recibió inicialmente un diagnóstico clínico de distrofia corneal de Reis-Bücklers, entidad relacionada clínicamente y que también se origina por mutaciones heterocigotas en el gen *TGFBI*.<sup>24</sup> Debido a la dificultad para el diagnóstico clínico diferencial entre ambas entidades y a las limitaciones de obtención del tejido corneal para realizar el diagnóstico histopatológico, la identificación de esta mutación permitió establecer el diagnóstico correcto de distrofia de Thiel-Behnke, enfermedad mucho menos frecuente a nivel global y particularmente en nuestro medio. La mutación consistió en el reemplazo de un residuo de arginina por uno de glutamina en la posición 555 de la proteína *TGFBI*. Es importante subrayar que mutaciones en este mismo residuo pero con el aminoácido triptófano como reemplazo son una causa relativamente frecuente de la distrofia corneal granular tipo I,<sup>87,88</sup> fenotípicamente distinta a la de Thiel-Behnke. Esto indica la importancia que tiene el aminoácido reemplazante en la modulación del fenotipo final de la distrofia, lo cual se relaciona directamente con las diferencias en el plegamiento/agregación de la proteína mutante de acuerdo al residuo(s) presente(s) en el sitio de la mutación.<sup>89</sup> La distrofia corneal de Reis-Bücklers y la de Thiel-Behnke se caracterizan por exhibir opacidades geográficas y lesiones corneales con morfología de “panal de abejas” en las capas anteriores de la córnea. A la fecha, la mayoría de los pacientes con diagnóstico clínico de Reis-Bücklers han presentado la mutación R124L en *TGFBI* mientras que aquellos clasificados como Thiel-Behnke presentan típicamente la mutación p.Arg555Gln, como en el caso de nuestro

paciente. Debido a la excelente correlación genotipo fenotipo entre la mutación Arg555Gln y la distrofia de Thiel-Behnke, el consenso actual es que el estudio genético debe ser utilizado para diferenciar ambos tipos de distrofias corneales, conocidas anteriormente como distrofias de la membrana de Bowman.<sup>90</sup>

Las dos familias con distrofia gelatinosa en forma de gota analizadas en este estudio representan los primeros casos con diagnóstico genético de la enfermedad en nuestro país. Esta anomalía es una de las distrofias corneales menos frecuentes<sup>91</sup> y tiene una herencia de tipo autosómico recesivo, a diferencia de la herencia dominante de la mayoría de las distrofias corneales. Por esta razón, el análisis del árbol genealógico de los afectados es un elemento de gran importancia en la sospecha diagnóstica de la enfermedad y que además permite identificar el factor de riesgo que implica la ocurrencia de matrimonios consanguíneos o endogámicos en las familias de los afectados.

En la primera familia con distrofia gelatinosa en forma de gota incluida en este estudio se identificó también una mutación nueva en *TACSTD2* que correspondió a la variante patogénica p.Leu235Ilefs\*141. Este cambio se originó por la mutación c.703\_704delCT a nivel del DNA y debido a que corresponde a una delección de dos bases predice un corrimiento en el marco de lectura y la introducción de una señal de paro 141 codones más adelante. Al igual que en la familia descrita anteriormente, la mutación cumplió con los criterios de segregación familiar, predicción de efecto patogénico en la proteína, ausencia en bases de polimorfismos benignos y patogenicidad solo en estado homocigoto. La familia afectada es originaria de la población de Arandas, Jalisco con un número de habitantes estimado de 77, 116, lo que sugiere un efecto fundador de la mutación y ocurrencia de matrimonios consanguíneos.

En la segunda familia estudiada, el análisis genético permitió identificar una mutación homocigota sin sentido (p.E111\*) en *TACSTD2*. Esta mutación introduce un codón de paro prematuro, tal como ocurre en virtualmente todas las mutaciones de *TACSTD2* descritas en sujetos con la enfermedad.<sup>92</sup> La mutación p.E111\* corresponde a una mutación nueva (no descrita con anterioridad en la enfermedad) y cumple con los criterios para ser considerada patogénica en esta familia, incluyendo segregación familiar, ausencia en bases de datos de polimorfismos, predicción de efecto severo en la proteína y causalidad de enfermedad solo en estado homocigoto. Es importante señalar que en la actualidad se han descrito menos de 30 mutaciones patogénicas en este gen, por lo que nuestro estudio permite ampliar el espectro mutacional de *TACSTD2* en la enfermedad. A nuestro conocimiento, no existen publicaciones de mutaciones de *TACSTD2* en pacientes de Latinoamérica. Un aspecto de importancia que debe mencionarse es que la identificación de la mutación causal permite realizar estudios diagnósticos a edades tempranas y establecer si los familiares desarrollarán la enfermedad o no de acuerdo al estado de cigosidad de la mutación. De manera similar, la detección de la mutación abre la posibilidad de llevar a cabo estudios poblacionales para determinar la tasa de portadores e inclusive permite ofrecer asesoramiento premarital para establecer si una pareja es portadora y por lo tanto tiene riesgo de procrear hijos con la enfermedad. En particular, esta familia afectada es originaria de la población de San Antonino Monteverde, Oaxaca con un número estimado de 6,650 habitantes. En poblaciones pequeñas como ésta, la posibilidad de que exista una elevada tasa de portadores por un efecto de mutación fundadora, y por tanto aparición de nuevos casos, es considerablemente elevada.<sup>93</sup>

A pesar que en algunos miembros de estas familias se realizó un tratamiento

quirúrgico, es importante señalar que la recurrencia de esta enfermedad posterior al trasplante de córnea es hasta del 97% en los primeros 4 años.<sup>94</sup> Controversialmente, se ha reportado que el trasplante de superficie ocular y el implante de queratoprótesis son tratamientos de primera línea para rehabilitación visual en estos pacientes.

El caso familiar con fenotipo compatible con Distrofia Corneal Endotelial de Fuchs (DCEF) presentó un patrón de transmisión compatible con herencia autosómica recesiva. La DCEF es una enfermedad que en la mayoría de los casos se presenta de manera esporádica (no hereditaria) y si bien se han descrito algunas formas familiares, el patrón de herencia en tales casos es invariablemente autosómico dominante.<sup>95,96</sup> A la fecha, se conocen al menos 5 genes cuyas mutaciones resultan en formas dominantes de DCEF.<sup>97,98</sup> El hecho de que en esta familia la alteración se transmitiera de manera recesiva implicó su clasificación como un caso de distrofia corneal atípica, ya que en la literatura no existen reportes de este tipo de transmisión hereditaria en casos familiares con la enfermedad. En esta familia, debido al tipo de herencia y al antecedente de consanguinidad entre los padres de los afectados se estableció inicialmente un abordaje de mapeo de homocigosidad para tratar de identificar el gen responsable de la enfermedad.<sup>99,100</sup> Esta técnica consiste en genotipificar marcadores polimórficos (SNPs) distribuidos en todo el genoma de sujetos afectados e identificar regiones de más de 3 Mb en las cuales tales marcadores sean homocigotos. El fundamento es que en tales regiones puede encontrarse incluido el locus de un gen que porte mutaciones en estado homocigoto y que sea responsable del padecimiento.<sup>101</sup> El estudio de homocigosidad en DNA de afectados de esta familia demostró regiones de homocigosidad en los cromosomas, 4, 1, 9, 11 y 6, entre otras. Sin embargo, el análisis de los genes contenidos dentro de tales regiones no permitió

identificar un gen candidato. Importantemente, ninguno de los genes descritos para formas dominantes de DCEF mapeó dentro de las regiones identificadas. Este resultado puede tener varias explicaciones entre las que se destacaría la probable ocurrencia de heterocigosidad compuesta (dos mutaciones heterocigotas distintas en el mismo gen) que puede presentarse aún con el antecedente de consanguinidad de la familia.<sup>102</sup> Por esta razón, se decidió realizar secuenciación de DNA de siguiente generación (secuenciación de exoma completo) en muestras de 3 afectados y comparar las variantes homocigotas o en heterocigosidad compuesta que compartían los enfermos. De manera inesperada, los cambios compartidos en los afectados no cumplieron con el criterio de segregación ya que se presentaron también en estado homocigoto en la madre y/o en alguno de los hermanos sin la enfermedad. De este modo, no se logró identificar una variante que pudiera ser adscrita irrefutablemente como causal de la enfermedad y la familia permanece sin diagnóstico genético. Una posibilidad para explicar este resultado es que la mutación causal resida en regiones no exónicas (que son regiones no analizadas durante la secuenciación de exoma) como pueden ser las regiones promotoras o intrónicas profundas. Aunque poco reconocido hasta hace algunos años, la disponibilidad de estudios de secuenciación de genoma completo ha demostrado que el mecanismo de producción de enfermedades por mutaciones en regiones no codificantes es más frecuente de lo anticipado.<sup>103,104</sup> De hecho, recientemente se identificó que un tipo de distrofia corneal cuya causa genética había permanecido elusiva por más de 25 años se debe a mutaciones en una región promotora localizada varias megabases río arriba del gen *OVOL2*.<sup>105</sup> Considerando lo anterior, nuestro grupo de estudio iniciará una línea de investigación de análisis de genoma completo en esta familia para evaluar la posibilidad de que esta forma recesiva y aparentemente novedosa de DCEF se deba a mutaciones en alguna

región promotora.

Finalmente, en el caso familiar compatible con diagnóstico clínico de Síndrome Meretoja, se realizó el análisis molecular de *Gelsolina*, único gen causal conocido para la enfermedad.<sup>106,107</sup> Este gen fue secuenciado en su totalidad sin lograr la identificación de la mutación responsable. Una explicación a estos resultados, aunque poco probable, es que la mutación en *Gelsolina* en esta familia se localice en regiones no codificantes, lo cual no ha ocurrido en ningún paciente con síndrome de Meretoja descrito en la literatura. En un afectado de esta familia se analizó además el gen de *Transtiretina*, cuyas mutaciones originan una forma de amiloidosis familiar autosómica dominante que puede cursar con afectación ocular por deposición de amiloide en ojo.<sup>108-109</sup> El estudio también fue negativo para variantes patogénicas en este gen. De este modo, en esta familia no se concretó un diagnóstico genético y serán necesarios estudios de secuenciación de siguiente generación para intentar identificar la mutación responsable.

#### **14. CONCLUSIONES**

Nuestro estudio permitió la identificación de las bases moleculares de dos formas de distrofia corneal atípica debida a mutaciones en el gen *TGFBI* y permitió además la descripción por primera vez de las características moleculares de la distrofia gelatinosa en forma de gota en pacientes de nuestro país. Por otra parte, aunque no se logró la identificación de la causa molecular de dos casos familiares de distrofias corneales atípicas, los avances realizados en la presente investigación en el estudio de estas genealogías facilitarán análisis genéticos futuros en ambos casos. Los resultados en estas dos familias, aunque preliminares, fortalecen la posibilidad de que se trate de

enfermedades novedosas, causadas por genes no asociados aún a enfermedades humanas o bien que resulten de mecanismos genéticos poco usuales.

## 15. APÉNDICES

### Apéndice 1

#### CONSENTIMIENTO INFORMADO

#### PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN MÉDICA\*

**Título del protocolo:** Análisis genómico en pacientes con distrofias corneales atípicas.

Investigador principal: Jesús Cabral Macías

Lugar donde se realizará el estudio: Instituto de oftalmología “Fundación Conde de Valenciana” I.A.P.

Nombre del paciente: \_\_\_\_\_

A usted se le está invitando a participar en este estudio de investigación médica. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad de preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto.

Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, del cual se le entregará una copia firmada y fechada.

#### 1. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.

- Este estudio permitirá conocer la causa de su enfermedad ocular, con lo cual se realiza el diagnóstico definitivo de la enfermedad y permite en un futuro su prevención y/o tratamiento.

## **2. OBJETIVO DEL ESTUDIO**

A usted se le está invitando a participar en un estudio de investigación que tiene como objetivo realizar el diagnóstico molecular definitivo de su padecimiento ocular.

## **3. PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO**

En caso de aceptar participar en el estudio se le realizarán algunas preguntas sobre usted, sus hábitos, antecedentes médicos y se realiza la toma de 4 ml de sangre periférica mediante punción venosa para posterior obtención de ADN genómico y secuenciación genómica.

## **4. MOLESTIAS O RIESGOS ASOCIADOS CON EL ESTUDIO**

Debido a la punción venosa pueden presentarse efectos secundarios asociados como hemorragia, dolor, hematomas y hasta infección que puede conducir en raros casos a la muerte.

En caso de que usted desarrolle algún efecto adverso secundario o requiera otro tipo de atención favor de comunicarse con el investigador principal Dr. Jesús Cabral Macías.

## **5. BENEFICIOS QUE PUEDE OBTENER DEL ESTUDIO**

Con este estudio conocerá de manera acertada el diagnóstico de su enfermedad, además si se encuentra un cambio genético que explique sus síntomas, se le hará saber mediante un asesoramiento genético.

Este estudio permitirá que en un futuro otros pacientes puedan beneficiarse del conocimiento obtenido mediante prevención y/o tratamiento con terapia génica.

## **6.- ACLARACIONES:**

1. Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria

- En el proceso del estudio usted podrá solicitar información sobre cualquier pregunta y/o aclaración de cualquier duda acerca de los procedimientos riesgos y beneficios. Si requiere

ampliar información sobre su participación en el estudio puede comunicarse al Comité de Ética en Investigación, al teléfono 54421700 ext. 3212 con la Lic. Edith Romero Chávez

- Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee, aun cuando el investigador responsable no se lo solicite, pudiendo manifestar o no, las razones de su decisión, la cual será respetada en su integridad. Sin que esto cree perjuicios para continuar su cuidado y tratamiento.
- La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada paciente, será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores.
- El investigador tiene la obligación de proporcionarle información actualizada sobre los avances del estudio.
- En caso de que usted desarrolle algún efecto adverso secundario no previsto, tiene derecho a una indemnización, siempre que estos efectos sean consecuencia de su participación en el estudio.
- No recibirá pago por su participación
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación a participar en este estudio.

Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar la

Carta de Consentimiento Informado que forma parte de este documento.

## **7. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO**

Yo, \_\_\_\_\_ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación. Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

**Firma del participante o del padre o tutor**

**Fecha**

**No. Teléfono**

**Testigo 1**

**Nombre**

**Parentesco**

**Fecha**

Domicilio \_\_\_\_\_

No. Telefónico: \_\_\_\_\_

**Testigo 2**

**Nombre**

**Parentesco**

**Fecha**

Domicilio \_\_\_\_\_

No. Telefónico: \_\_\_\_\_

**Esta parte debe ser completada por el Investigador (o su representante):**

He explicado al Sr(a). \_\_\_\_\_ la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a

ella.

Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

**Firma del investigador**

**No. Telefónico**

**Fecha**

**\* Este Consentimiento Informado ha sido aprobado por unanimidad en el Comité de Ética en Investigación de nuestro Instituto, con fundamento en los Artículos 20, 21, 22 del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud.**

## **16. BIBLIOGRAFÍA**

1. Warburg M, Møller HU. Dystrophy: a revised definition. *J Med Genet.* Dec; 1989 26(12):769–71.
2. Weiss JS, Møller HU, Aldave AJ, Seitz B, Bredrup C, Kivelä T, Munier FL, Rapuano CJ, Nischal KK, Kim EK, MD, Sutphin J, Busin M, Labbé A, Kenyon KR, Kinoshita S, and Lisch W. IC3D Classification of Corneal Dystrophies—Edition 2 *Cornea* 2015;34:117–159
3. Stone EM, Mathers WD, Rosenwasser GO, Holland EJ, Folberg R, Krachmer JH, et al. Three autosomal dominant corneal dystrophies map to chromosome 5q. *Nat Genet.* 1994;6:47–51.
4. Brenda J Wilson. Stuart G Nicholls The Human Genome Project, and recent advances in personalized genomics. *Risk Management and Healthcare Policy.* 2015;8 9–20
5. Kannabiran C, Klintworth GK. TGFBI gene mutations in corneal dystrophies. *Hum Mutat.* 2006;27:615–25.
6. Munier FL, Korvatska E, Djemai A, Le Paslier D, Zografos L, Pescia G, Schorderet DF. 1997. Keratoepithelin mutations in four 5q31-linked corneal dystrophies. *Nat Genet* 15:247–251.

7. Mashima Y, Imamura Y, Konishi M, Nagasawa A, Yamada M, Oguchi Y, Kudoh J, Shimizu N. 1997. Homogeneity of keratoepithelin codon 124 mutations in Japanese patients with either of two types of corneal stromal dystrophy. *Am J Hum Genet* 61:1448–1450.
8. Pampukha VM, Drozhyna GI, Livshits LA. 2004. TGFBI gene mutation analysis in families with hereditary corneal dystrophies from Ukraine. *Ophthalmologica* 218:411–414.
9. Gupta SK, Hodge WG, Damji KF, Guernsey DL, Neumann PE. 1998. Lattice corneal dystrophy type 1 in a Canadian kindred is associated with the Arg124→Cys mutation in the keratoepithelin gene. *Am J Ophthalmol* 125:547–549.
10. Endo S, Nguyen TH, Fujiki K, Hotta Y, Nakayasu K, Yamaguchi T, Ishida N, Kanai A. 1999. Leu518Pro mutation of the beta ig-h3 gene causes lattice corneal dystrophy type I. *Am J Ophthalmol* 128:104–106.
11. Warren JF, Abbott RL, Yoon MK, Crawford JB, Spencer WH, Margolis TP. 2003. A new mutation (Leu569Arg) within exon 13 of the TGFBI (BIGH3) gene causes lattice corneal dystrophy type I. *Am J Ophthalmol* 136:872–878.
12. Tian X, Fujiki K, Wang W, Murakami A, Xie P, Kanai A, Liu Z. 2005. Novel mutation (V505D) of the TGFBI gene found in a Chinese family with lattice corneal dystrophy, type I. *Jpn J Ophthalmol* 49:84–88.
13. Dighiero P, Niel F, Ellies P, et al. Histologic phenotype-genotype correlation of corneal dystrophies associated with eight distinct mutations in the TGFBI gene. *Ophthalmology*. 2001;108 (4):818–823.
14. Chiou AG, Beuermann RW, Kaufman SC, et al. Confocal microscopy in lattice corneal dystrophy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* . 1999;237:697–701.4. Fuchs E. Dystrophia epithelialis corneae. *Graefes. Arch. Clin. Exp. Ophthalmol*. 1910:478–508.

15. Stewart H, Black GC, Donnai D, Bonshek RE, McCarthy J, Morgan S, Dixon MJ, Ridgway AA. 1999a. A mutation within exon 14 of the TGFBI (BIGH3) gene on chromosome 5q31 causes an asymmetric, late-onset form of lattice corneal dystrophy. *Ophthalmology* 106:964–970.
16. Schmitt-Bernard CF, Guittard C, Arnaud B, Demaille J, Argiles A, Claustres M, Tuffery-Giraud S. 2000b. BIGH3 exon 14 mutations lead to intermediate type I/IIIA of lattice corneal dystrophies. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:1302–1308.
17. Afshari N, Bahadur RP, Klintworth GK. 2004. Discovery of novel homozygous mutation in the TGFBI (BIGH3) gene (V624M) in a patient with unilateral lattice corneal dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:E-abstract 1517.
18. Behnke H, Thiel HJ. A previously unrecognized form of subepithelial corneal dystrophy inherited as an autosomal dominant. *Ger Med Mon.* 1967;12:285.
19. Zhao XC, Nakamura H, Subramanyam S, Stock LE, Gillette TE, Yoshikawa S, et al. Spontaneous and inheritable R555Q mutation in the TGFBI/BIGH3 gene in two unrelated families exhibiting Bowman's layer corneal dystrophy. *Ophthalmology.* 2007;114:e39–46.
20. Munier FL, Frueh BE, Othenin-Girard P, Uffer S, Cousin P, Wang MX, et al. BIGH3 mutation spectrum in corneal dystrophies. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43:949–54.
21. Ridgway AE, Moller HU. Genetics of granular dystrophy. *Ophthalmology.* 1992;99:1753.
22. Chen YJ, Chen JT, Lu DW, Tai MC. In vivo corneal confocal microscopic findings and gene analysis of three patients with Thiel-Behnke corneal dystrophy. *Br J Ophthalmol.* 2010;94:262–4.
23. Mashima Y, Yamada M, Oguchi Y. Autosomal dominant inherited corneal dystrophies associated with TGFBI mutation. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi.* 2001;105:659–72.
24. Kuchle M, Green WR, Völcker HE, Barraquer J. Reevaluation of corneal dystrophies of Bowman's layer and the anterior stroma (Reis-Bücklers and Thiel-Behnke types): a light and electron microscopic study of eight corneas and a review of the literature. *Cornea.* 1995 Jul;14(4):333-54

25. Reis W. Familiäre, fleckige Hornhauterkrankung. Dtsch Med Wochenschr. 1917;43:575 [in German].
26. Bücklers M. Ueber eine weitere familiäre Hornhautdystrophie (Reis). Klin Monatsbl Augenheilkd. 1949;114:386–97 [in German].
27. Albert DM, Jakobiec FA. Principles and Practice of Ophthalmology, vol. 2. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders; 1994. p. 709–10.
28. Kamoi M, Mashima Y, Kawashima M, Tsubota K. Electrolysis for corneal opacities in a young patient with superficial variant of granular corneal dystrophy (Reis-Bücklers corneal dystrophy). Am J Ophthalmol. 2005;139:1139–40.
29. Hieda O, Kawasaki S, Wakimasu K, Yamasaki K, Inatomi T, Kinoshita S. Clinical Outcomes of Phototherapeutic Keratectomy in Eyes With Thiel-Behnke Corneal Dystrophy. Am J Ophthalmol. 2013;155:66–72.
30. Klintworth GK. The molecular genetics of the corneal dystrophies—current status. Front Biosci. 2003;8:687–713.
31. Nakaizumi K. A rare case of corneal dystrophy. Acta Soc Ophthalmol Jpn. 1914;18:949–950.
32. Klintworth GK, Valnickova Z, Kielar RA, et al. Familial subepithelial corneal amyloidosis—a lactoferrin-related amyloidosis. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1997;38:2756–2763.
33. Ren Z, Lin PY, Klintworth GK, et al. Allelic and locus heterogeneity in autosomal recessive gelatinous drop-like corneal dystrophy. Hum Genet. 2002;110:568–577.
34. Weber FL, Babel J. Gelatinous drop-like dystrophy. A form of primary corneal amyloidosis. Arch Ophthalmol. 1980;98:144–148.
35. Mondino BJ, Rabb MF, Sugar J, et al. Primary familial amyloidosis of the cornea. Am J Ophthalmol. 1981;92:732–736.

36. Fujita S, Sameshima M, Hirashima S, et al. Light and electron microscopic study of gelatinous drop-like corneal dystrophy with deeper stromal involvement. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*. 1988;92:1744–1757.
37. Ide T, Nishida K, Maeda N, et al. A spectrum of clinical manifestations of gelatinous drop-like corneal dystrophy in Japan. *Am J Ophthalmol*. 2004;137:1081–1084.
38. Shinozaki K, Yoshino K, Yamagami H, et al. Histo-chemical examination of recurrent cornea gelatinous drop-like dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1996;37(suppl):S1020.
39. Calabrese G, Crescenzi C, Morizio E, et al. Assignment of TACSTD1 (alias TROP1, M4S1) to human chromosome 2p21 and refinement of mapping of TACSTD2 (alias TROP2, M1S1) to human chromosome 1p32 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*. 2001;92:164–165.
40. Tsujikawa M, Kurahashai H, Tanaka T, et al. Identification of the gene responsible for gelatinous corneal dystrophy. *Nat Genet*. 1999;21: 420–423.
41. Fuchs E. Dystrophia epithelialis corneae. *Graefes. Arch. Clin. Exp. Ophthalmol*. 1910:478–508.
42. Waring GO 3rd, Bourne WM, Edelhauser HF, Kenyon KR. The corneal endothelium. Normal and pathologic structure and function. *Ophthalmology*. Jun; 1982 89(6):531–90.
43. Schmedt T, Silva MM, Ziaei A, Jurkunas U. Molecular bases of corneal endothelial dystrophies. *Exp Eye Res*. Feb; 2012 95(1):24–34.
44. Peh, G.S.; Beuerman, R.W.; Colman, A.; Tan, D.T.; Mehta, J.S. Human corneal endothelial cell expansion for corneal endothelium transplantation: An overview. *Transplantation* 2011, 91, 811-819.
45. Bonanno, J.A. Identity and regulation of ion transport mechanisms in the corneal endothelium. *Prog. Retin. Eye Res*. 2003, 22, 69–94.
46. Sundin OH, Jun A, Broman KW, et al. Linkage of late-onset Fuchs corneal dystrophy to a novel locus at 13p11.23. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47:140–145.

47. Krachmer JH, Purcell JJ Jr, Young CW, Bucher KD. Corneal endothelial dystrophy. A study of 64 families. *Arch Ophthalmol*. Nov; 1978 96(11):2036–9.
48. Zoega GM, Fujisawa A, Sasaki H, Kubota A, Sasaki K, Kitagawa K, Jonasson F. Prevalence and risk factors for cornea guttata in the Reykjavik Eye Study. *Ophthalmology*. Apr; 2006 113(4):565– 9.
49. Higa A, Sakai H, Sawaguchi S, Iwase A, Tomidokoro A, Amano S, Araie M. Prevalence of and risk factors for cornea guttata in a population-based study in a southwestern island of Japan: the Kumejima study. *Arch Ophthalmol*. Mar; 2011 129(3):332–6.
50. Darlington JK, Adrean SD, Schwab IR. Trends of penetrating keratoplasty in the United States from 1980 to 2004. *Ophthalmology*. Dec; 2006 113(12):2171–5.
51. Hemadevi, B.; Srinivasan, M.; Arunkumar, J.; Prajna, N.V.; Sundaresan, P. Genetic analysis of patients with Fuchs endothelial corneal dystrophy in India. *BMC Ophthalmol*. 2010, 10, 3.
52. Eghrari, A.O.; Gottsch, J.D. Fuchs' corneal dystrophy. *Expert Rev. Ophthalmol*. 2010, 5, 147–159.
53. Riazuddin, S.A.; Parker, D.S.; McGlumphy, E.J.; Oh, E.C.; Iliff, B.W.; Schmedt, T.; Jurkunas, U.; Schleif, R.; Katsanis, N.; Gottsch, J.D. Mutations in LOXHD1, a recessive-deafness locus, cause dominant late-onset Fuchs corneal dystrophy. *Am. J. Hum. Genet*. 2012, 90, 533–953.
54. Sundin OH, Jun AS, Broman KW, et al. Linkage of late-onset Fuchs corneal dystrophy to a novel locus at 13pTel-13q12. 13. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006; 47:140–5.
55. Sundin OH, Broman KW, Chang HH, et al. A common locus for late-onset Fuchs corneal dystrophy maps to 18q21.2–q21. 32. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006; 47:3919–26.
56. Riazuddin SA, Eghrari AO, Al-Saif A, et al. Linkage of a mild late-onset phenotype of Fuchs corneal dystrophy to a novel locus at 5q33.1–q35. 2. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009; 50:5667– 71.
57. Elhalis, H.; Azizi, B.; Jurkunas, U.V. Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Ocul. Surf*. 2010, 8, 173–184.

58. Zhang C, Bell WR, Sundin OH, De La Cruz Z, Stark WJ, Green WR, Gottsch JD. Immunohistochemistry and electron microscopy of early-onset fuchs corneal dystrophy in three cases with the same L450W *COL8A2* mutation. *Trans Am Ophthalmol Soc* 2006;104:85-97.
59. Benson MD. Inherited amyloidosis. *J Med Genet* 1991;28: 73–8.
60. Meretoja J. Familial systemic paramyloidosis with lattice dystrophy of the cornea, progressive cranial neuropathy, skin changes and various internal symptoms. A previously unrecognized heritable syndrome. *Ann Clin Res* 1969;1:314–24.
61. Kiuru S. Gelsolin-related familial amyloidosis, Finnish type (FAF), and its variants found worldwide. *Amyloid* 1998;5: 55–66.
62. Stewart HS, Parveen R, Ridgway AE, et al. Late onset lattice corneal dystrophy with systemic familial amyloidosis, amyloidosis V, in an English family. *Br J Ophthalmol* 2000;84:390–4.
63. Rothstein A, Auran JD, Wittpenn JR, et al. Confocal microscopy in Meretoja syndrome. *Cornea* 2002;21:364–7.
64. Solari HP, Ventura MP, Anteckka E, et al. Danish type gelsolin-related amyloidosis in a Brazilian family: case reports. *Arq Bras Oftalmol* 2011;74:286–8.
65. Chaponnier C, Janmey PA, Yin HL. The actin filament-severing domain of plasma gelsolin. *J Cell Biol* 1986;103:1473–81.
66. Maury CP, Nurmiäho-Lassila EL. Creation of amyloid fibrils from mutant Asn187 gelsolin peptides. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;183:227–31.
67. Kivela T, Tarkkanen A, McLean I, et al. Immunohistochemical analysis of lattice corneal dystrophies types I and II. *Br J Ophthalmol* 1993;77:799–804.
68. Rosenberg ME, Tervo TM, Gallar J, et al. Corneal morphology and sensitivity in lattice dystrophy type II (familial amyloidosis, Finnish type). *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:634–41.

69. Meretoja J. Comparative histopathological and clinical findings in eyes with lattice corneal dystrophy of two different types. *Ophthalmologica* 1972;165:15–37.
70. Kiuru S, Seppalainen AM. Neuropathy in familial amyloidosis, Finnish type (FAF): electrophysiological studies. *Muscle Nerve* 1994;17:299–304.
71. Lin ZN, Chen J, Cui HP Characteristics of corneal dystrophies: a review from clinical, histological and genetic perspectives. *Int J Ophthalmol*. 2016 Jun 18;9(6):904-13
72. Schorderet D. Corneal Dystrophies: Overview and Summary. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2015;134:73-8
73. Sacchetti M, Macchi I, Tiezzi A, La Cava M, Massaro-Giordano G, Lambiase A. Pathophysiology of Corneal Dystrophies: From Cellular Genetic Alteration to Clinical Findings. *J Cell Physiol*. 2016 Feb;231(2):261-9
74. Oliver VF, Vincent AL. The Genetics and Pathophysiology of IC3D Category 1 Corneal Dystrophies: A Review. *Asia Pac J Ophthalmol (Phila)*. 2016 Jul-Aug;5(4):272-81
75. Han KE, Choi SI, Kim TI, Maeng YS, Stulting RD, Ji YW, Kim EK. Pathogenesis and treatments of TGFBI corneal dystrophies. *Prog Retin Eye Res*. 2016 Jan;50:67-88
76. Nischal KK. Genetics of Congenital Corneal Opacification--Impact on Diagnosis and Treatment. *Cornea*. 2015 Oct;34 Suppl 10:S24-34.
77. Hammar B, Björck E, Lind H, Lagerstedt K, Dellby A, Fagerholm P. Dystrophia Helsinglandica: a new type of hereditary corneal recurrent erosions with late subepithelial fibrosis. *Acta Ophthalmol*. 2009 Sep;87(6):659-65.
78. Tsujikawa M, Maeda N, Tsujikawa K, Hori Y, Inoue T, Nishida K. Chromosomal sharing in atypical cases of gelatinous drop-like corneal dystrophy. *Jpn J Ophthalmol*. 2010 Sep;54(5):494-8
78. Zhao SJ, Zhu YN, Shentu XC, Miao Q. Chinese family with atypical granular corneal dystrophy

type I caused by the typical R555W mutation in TGFBI. *Int J Ophthalmol.* 2013 Aug 18;6(4):458-62

79. Smedowski A, Wylegala E, Wojcik L, Tarnawska D. Atypical regressive corneal endothelial cysts in long-term confocal follow-up: a case report. *Medicine (Baltimore).* 2015 Mar;94(9):e564

80. Dangra KL, Das M, Periasamy S, Prajna NV. Bilateral Atypical Granular Corneal Dystrophy Associated with Unilateral Keratoconus in a Male Child. *Middle East Afr J Ophthalmol.* 2016 Jul-Sep;23(3):262-4

81. Yang J, Han X, Huang D, Yu L, Zhu Y, Tong Y, Zhu B, Li C, Weng M, Ma X. Analysis of TGFBI gene mutations in Chinese patients with corneal dystrophies and review of the literature. *Mol Vis.* 2010 Jun 30;16:1186-93

82. Chau HM, Ha NT, Cung LX, Thanh TK, Fujiki K, Murakami A, Kanai A. H626R and R124C mutations of the TGFBI (BIGH3) gene caused lattice corneal dystrophy in Vietnamese people. *Br J Ophthalmol.* 2003 Jun;87(6):686-9

83. Zenteno JC, Correa-Gomez V, Santacruz-Valdez C, Suarez-Sanchez R, Villanueva-Mendoza C. Clinical and genetic features of TGFBI-linked corneal dystrophies in Mexican population: description of novel mutations and novel genotype-phenotype correlations. *Exp Eye Res.* 2009 Aug;89(2):172-7

84. Gonzalez-Rodriguez J, Ramirez-Miranda A, Hernandez-Da Mota SE, Zenteno JC. TGFBI, CHST6, and GSN gene analysis in Mexican patients with stromal corneal dystrophies. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2014 Aug;252(8):1267-72.

85. Lai K, Reidy J, Bert B, Milman T. Spheroidal degeneration in H626R TGFBI variant lattice dystrophy: a multimodality analysis. *Cornea.* 2014 Jul;33(7):726-32

86. Kattan JM, Serna-Ojeda JC, Sharma A, Kim EK, Ramirez-Miranda A, Cruz-Aguilar M, Cervantes AE, Frausto RF, Zenteno JC, Graue-Hernandez EO, Aldave AJ. Vortex Pattern of Corneal Deposits in Granular Corneal Dystrophy Associated With the p.(Arg555Trp) Mutation in TGFBI. *Cornea.* 2017 Feb;36(2):210-21

87. Kannabiran C, Klintworth GK. TGFBI gene mutations in corneal dystrophies. *Hum Mutat.* 2006 Jul;27(7):615-25
88. Lakshminarayanan R, Chaurasia SS, Anandalakshmi V, Chai SM, Murugan E, Vithana EN, Beuerman RW, Mehta JS. Clinical and genetic aspects of the TGFBI-associated corneal dystrophies. *Ocul Surf.* 2014 Oct;12(4):234-51
89. Courtney DG, Poulsen ET, Kennedy S, Moore JE, Atkinson SD, Maurizi E, Nesbit MA, Moore CB, Enghild JJ. Protein Composition of TGFBI-R124C- and TGFBI-R555W-Associated Aggregates Suggests Multiple Mechanisms Leading to Lattice and Granular Corneal Dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015 Jul;56(8):4653-61
90. Hou YC, Wang JJ, Hsiao CH, Chen WL, Hu FR. Phenotype-genotype correlations in patients with TGFBI-linked corneal dystrophies in Taiwan. *Mol Vis.* 2012;18:362-71.
91. Kawasaki S, Kinoshita S. Clinical and basic aspects of gelatinous drop-like corneal dystrophy. *Dev Ophthalmol.* 2011;48:97-115.
92. Cabral-Macias J, Zenteno JC, Ramirez-Miranda A, Navas A, Bermudez-Magner JA, Boullosa-Graña VM, Graue-Hernandez EO, Buentello-Volante B. Familial Gelatinous Drop-Like Corneal Dystrophy Caused by a Novel Nonsense TACSTD2 Mutation. *Cornea.* 2016 Jul;35(7):987-90.
93. Pantoja-Melendez C, Ali M, Zenteno JC. An epidemiological investigation of a Forkhead box protein E3 founder mutation underlying the high frequency of sclerocornea, aphakia, and microphthalmia in a Mexican village. *Mol Vis.* 2013 Aug 27;19:1866-70
94. Fujiki K, Nakayasu K, Kanai A. Corneal dystrophies in Japan. *J Hum Genet.* 2001;46:431-435.
95. Hamill CE, Schmedt T, Jurkunas U. Fuchs endothelial cornea dystrophy: a review of the genetics behind disease development. *Semin Ophthalmol.* 2013 Sep-Nov;28(5-6):281-6
96. Aldave AJ, Han J, Frausto RF. Genetics of the corneal endothelial dystrophies: an evidence-based review. *Clin Genet.* 2013 Aug;84(2):109-19

97. Vedana G, Villarreal G Jr, Jun AS. Fuchs endothelial corneal dystrophy: current perspectives. *Clin Ophthalmol*. 2016 Feb 18;10:321-30
98. Zhang J, Patel DV. The pathophysiology of Fuchs' endothelial dystrophy--a review of molecular and cellular insights. *Exp Eye Res*. 2015 Jan;130:97-10
99. Littink KW, den Hollander AI, Cremers FP, Collin RW. The power of homozygosity mapping: discovery of new genetic defects in patients with retinal dystrophy. *Adv Exp Med Biol*. 2012;723:345-51
100. Chacon-Camacho OF, Buentello-Volante B, Velázquez-Montoya R, Ayala-Ramirez R, Zenteno JC. Homozygosity mapping identifies a GALK1 mutation as the cause of autosomal recessive congenital cataracts in 4 adult sibs. *Gene*. 2014 Jan 25;534(2):218-21
101. Seelow D, Schuelke M, Hildebrandt F, Nürnberg P. HomozygosityMapper--an interactive approach to homozygosity mapping. *Nucleic Acids Res*. 2009 Jul;37(Web Server issue):W593-9.
102. Chacon-Camacho OF, Jitskii S, Buentello-Volante B, Quevedo-Martinez J, Zenteno JC. Exome sequencing identifies RDH12 compound heterozygous mutations in a family with severe retinitis pigmentosa. *Gene*. 2013 Oct 10;528(2):178-82
103. Scacheri CA, Scacheri PC. Mutations in the noncoding genome. *Curr Opin Pediatr*. 2015 Dec;27(6):659-64.
104. Small KW, DeLuca AP, Whitmore SS, Rosenberg T, Silva-Garcia R, Udar N, Puech B, Garcia CA, Rice TA, Fishman GA, Héon E, Folk JC, Streb LM, Haas CM, Wiley LA, Scheetz TE, Fingert JH, Mullins RF, Tucker BA, Stone EM. North Carolina Macular Dystrophy Is Caused by Dysregulation of the Retinal Transcription Factor PRDM13. *Ophthalmology*. 2016 Jan;123(1):9-18
105. Davidson AE, Liskova P, Evans CJ, Dudakova L, Nosková L, Pontikos N, Hartmannová H, Hodaňová K, Stránecký V, Kozmík Z, Levis HJ, Idigo N, Sasai N, Maher GJ, Bellingham J, Veli N, Ebenezer ND, Cheetham ME, Daniels JT, Thaug CM, Jirsova K, Plagnol V, Filipec M, Knoch S, Tuft

SJ, Hardcastle AJ. Autosomal-Dominant Corneal Endothelial Dystrophies CHED1 and PPCD1 Are Allelic Disorders Caused by Non-coding Mutations in the Promoter of OVOL2. *Am J Hum Genet.* 2016 Jan 7;98(1):75-89

106. Kiuru-Enari S, Haltia M. Hereditary gelsolin amyloidosis. *Handb Clin Neurol.* 2013;115:659-81

107. Nikoskinen T, Schmidt EK, Strbian D, Kiuru-Enari S, Atula S. Natural course of Finnish gelsolin amyloidosis. *Ann Med.* 2015;47(6):506-11

108. Liu T, Zhang B, Jin X, Wang W, Lee J, Li J, Yuan H, Cheng X. Ophthalmic manifestations in a Chinese family with familial amyloid polyneuropathy due to a TTR Gly83Arg mutation. *Eye (Lond).* 2014 Jan;28(1):26-33.

109. Sekijima Y. Transthyretin (ATTR) amyloidosis: clinical spectrum, molecular pathogenesis and disease-modifying treatments. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2015 Sep;86(9):1036-43.