



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
SECRETARÍA DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

**“COMPLEJO ESCLEROCÓRNEA-MICROFTALMIA-AFAQUIA:
DESCRIPCIÓN DE UN CASO ASOCIADO A UNA NUEVA VARIANTE
PATOGÉNICA EN *FOXE3* Y REVISIÓN DE LA LITERATURA”**

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE
ESPECIALISTA EN GENÉTICA MÉDICA

PRESENTA:

DRA. TANIA BARRAGÁN AREVALO

TUTOR DE TESIS:
DRA. ESTHER LIEBERMAN HERNÁNDEZ



CIUDAD DE MEXICO. 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

COMPLEJO ESCLEROCÓRNEA-MICROFTALMIA-AFAQUIA: DESCRIPCIÓN DE UN CASO
ASOCIADO A UNA NUEVA VARIANTE PATOGENICA EN *FOXE3* Y REVISIÓN DE LA
LITERATURA



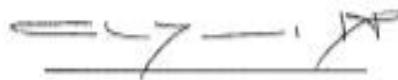
DR. JOSÉ NICOLÁS REYNÉS MANZUR
DIRECTOR DE ENSEÑANZA



DR. MANUEL ENRIQUE FLORES LANDERO
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PRE Y POSGRADO



DRA. VICTORIA DEL CASTILLO RUIZ
PROFESORA TITULAR DEL CURSO DE GENÉTICA MÉDICA



DRA. ESTHER LIEBERMAN HERNÁNDEZ
TUTOR DE TESIS



DR. JUAN CARLOS ZENTENO RUIZ
COTUTOR DE TESIS

ÍNDICE

1. Agradecimientos.....	4
1. Resumen.....	5
2. Antecedentes.....	6
3. Planteamiento del problema.....	10
4. Justificación.....	10
3. Objetivo general y específicos.....	10
4. Material y métodos.....	11
5. Resultados.....	13
6. Discusión.....	14
7. Conclusión.....	15
8. Anexos.....	16
9. Bibliografía.....	29

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Alicia y Miguel por su amor, paciencia, enseñanzas, apoyo y por siempre creer en mí.

A mi hermano Miguel por acompañarme en esta etapa, y después de un día malo hacerme reír.

A mi primo David por todo su apoyo y sus consejos de genética y de la vida, por siempre estar orgulloso de mi.

A Miguel por estar conmigo en la recta final de la residencia, por su cariño y comprensión.

A la Dra. Victoria del Castillo por brindarme la oportunidad de realizar la especialidad en el mejor lugar de América Latina, y por todas sus enseñanzas.

A la Dra. Esther Lieberman por su apoyo en la realización de esta tesis, por la confianza que ha tenido en mi desde el primer año de la residencia, y por sus consejos académicos, personales y culturales.

Al Dr. Juan Carlos Zenteno por despertar mi interés por la biología molecular y genética desde el servicio social, y por apoyarnos con el diagnóstico molecular de varios de nuestros pacientes.

A la Dra. Emiy Yokoyama por sus enseñanzas en microarreglos, por su paciencia y por siempre contagiarme una sonrisa y aprender a ser optimista.

Al Dr. Camilo Villarroel, por todas sus enseñanzas en dismorfología, por hacerme ver a los pacientes con más detalle.

A las Dra. Fernández y Dra. Estandía por sus consejos, y buena vibra siempre.

A todos los que conforman los laboratorios de citogenética, biología molecular y de genética y cáncer por todas sus enseñanzas.

A José y Rehot por su amistad y complicidad.

A Pau, Dim, Luis, Juan, Mariana, Alan y Den por su amistad, por compartir tantos momentos, risas y llantos, sin ustedes este camino no hubiera sido tan ameno.

A los pacientes y a sus familias, por enseñarme lo académico y sobre todo grandes lecciones de vida.

RESUMEN

La esclerocórnea es una condición congénita, no progresiva y no inflamatoria en la que la córnea está vascularizada y presenta algún grado de opacidad con aplanamiento en su curvatura normal. Ocurre más frecuente como una anomalía bilateral y asimétrica, aunque también se han reportado casos unilaterales.¹ La esclerocórnea resulta de un defecto de migración de las células de la cresta neural entre el epitelio y el endotelio corneal originando una arquitectura corneal anormal.² El espectro clínico es amplio, desde defectos corneales mínimos hasta opacidades totales. El desorden puede ocurrir como una anomalía aislada, en asociación con otros defectos oculares, o puede ser parte de una entidad sindrómica con anomalías sistémicas concomitantes.³

FOXE3 es un miembro de la familia forkhead de factores de transcripción que posee un dominio forkhead de unión al DNA de 80 a 100 residuos de aminoácido. La expresión de *FOXE3* está presente desde estadios tempranos del desarrollo del cristalino hasta la diferenciación de tejidos oculares y es esencial para el adecuado desarrollo y maduración del cristalino. Varios estudios han demostrado que variantes homocigotas o heterocigotas compuestas en *FOXE3* como causa del complejo esclerocórnea-microftalmia-afaquia.³⁻⁸

El complejo esclerocórnea-microftalmia-afaquia es un fenotipo ocular severo que resulta de variantes patogénicas en el factor de transcripción de *FOXE3*. Hasta la fecha, pacientes de al menos 14 familias con este desorden ocular poco frecuente han sido descritas.

El objetivo de este trabajo es describir a un paciente mexicano con esclerocórnea total, afaquia y microftalmia bilateral asociada con una nueva variante patogénica en *FOXE3*. Se realizó análisis molecular de *FOXE3*, el análisis genético demostró una nueva variante patogénica homocigota c.291C>G (p.Ile97Met)

La identificación de una nueva variante patogénica en nuestro paciente expande el espectro mutacional en desordenes oculares congénitos relacionados con *FOXE3*. Adicionalmente, realizamos revisión de las características clínicas y genotípicas de todos los pacientes publicados con variantes patogénicas bialélicas en *FOXE3*.

ANTECEDENTES

DESARROLLO OCULAR NORMAL

El ojo es un órgano muy complejo que se origina a partir de diferentes tejidos embrionarios, entre ellos la pared del diencéfalo, el ectodermo superficial y el mesénquima migratoria de la cresta neural craneal. A lo largo del desarrollo ocular tienen lugar dos procesos fundamentales, uno de ellos es una serie continua de señales inductivas que producen el establecimiento inicial de los componentes principales del ojo y el otro proceso consiste en la diferenciación coordinada de estos mismos componentes.

Para que se produzca la visión normal, muchas estructuras intraoculares deben relacionarse correctamente con las estructuras vecinas. La córnea y el cristalino deben volverse transparentes y situarse bien alineados para permitir que la luz llegue de forma adecuada a la retina. Esta a su vez debe configurarse de tal modo que sea capaz de recibir las imágenes visuales y transmitir los patrones de las mismas a los lugares apropiados del encéfalo, por medio de procesos neurales que se extienden desde la retina a lo largo del nervio óptico.⁹

El primer esbozo del sistema ocular se aprecia a partir de la 3^a-4^a semana de gestación con la aparición de las vesículas ópticas y tallos ópticos a partir del prosencéfalo o cerebro primitivo (neuroectodermo). Dichas vesículas, al entrar en contacto con el ectodermo superficial, inducen la formación de las vesículas o cúpulas cristalinas hacia la 4^a- 5^a semana, de donde procederán el cristalino y el epitelio corneal. A su vez, las vesículas ópticas se invaginan adquiriendo forma de cáliz y englobando a las cristalinas. Otra invaginación también se produce en la zona inferior del ojo, por lo que originalmente no será una estructura cerrada. En este punto vemos un “ojo primitivo” con una zona más anterior, donde el desarrollo del ectodermo superficial y las células de la cresta neural dará lugar a la diferenciación de las estructuras más anteriores del ojo (párpados, córnea, iris, malla trabecular, cuerpo ciliar, etc.) y sistema lagrimal; y otra posterior, de procedencia neuroectodérmica, configurada por la cavidad vítrea, una retina de doble capa y el nervio óptico. La apertura inferior (fisura coroidea) permite la invasión del mesénquima, derivado mesodérmico y origen de las estructuras vasculares del ojo, los vasos hialoideos que involucionarán hasta desaparecer durante la vida fetal y los vasos definitivos que permanecerán tras la regresión de los primeros. El cierre de la fisura coroidea acontece sobre la 7^a-8^a semana, aunque un pequeño creciente inferior permanece sin cerrar hasta estadios más avanzados.¹⁰ (Figura 1)

ESCLEROCÓRNEA

La esclerocórnea es una condición congénita, no progresiva y no inflamatoria en la que la córnea está vascularizada y presenta algún grado de opacidad con aplanamiento en su curvatura normal. Ocurre más frecuente como una anomalía bilateral y asimétrica, aunque también se han reportado casos unilaterales. ¹ La esclerocórnea resulta de un defecto de migración de las células de la cresta neural entre el epitelio y el endotelio corneal originando una arquitectura corneal anormal. ² El espectro clínico es amplio, desde defectos corneales mínimos hasta opacidades totales. El desorden puede ocurrir como una anomalía aislada, en asociación con otros defectos oculares, o puede ser parte de una entidad sindrómica con anomalías sistémicas concomitantes. ³

Aunque la mayoría de los casos de esclerocórnea ocurren de manera esporádica, se han descrito formas familiares con tipo de herencia autosómica recesiva y autosómica dominante. ⁴⁻⁸

La esclerocórnea puede originarse por variantes patogénicas en muchos genes, incluidos *FOXE3*, *SOX2*, *RAX*, *GJA8* y *PXDN*. ¹¹

FOXE3

Localizado en el cromosoma 1p33, codifica un factor de transcripción altamente expresado durante el desarrollo ocular. ²

El gen *FOXE3* codifica un factor de transcripción de 319 aminoácidos con un dominio de unión al DNA, el dominio forkhead, localizado del aminoácido 71 al 165. ¹² *FOXE3* se expresa específicamente durante el desarrollo del cristalino en humanos, ratones y zebrafish. ¹³⁻¹⁵ Participa en la formación de la vesícula óptica y permite el mantenimiento de las células del cristalino en estado proliferativo, lo que previene la diferenciación temprana a células fibrosas. ¹³⁻¹⁶ *FOXE3* es uno de los genes principales que actúa en conjunto con *PAX6* ¹⁷, recientemente Khan ¹⁸ demostró que *FOXE3* actúa a través de una vía transcripcional río abajo llamada *DNAJB1*, la cual tiene un rol crucial en el desarrollo y mantenimiento de la transparencia del cristalino. Las variantes homocigotas en *Foxe3* fueron identificadas por primera vez en ratones *dyl/dyl* mostrando microftalmia asociada con alteraciones en el segmento anterior análogo a anomalía de Peters y catarata en el humano. ¹³ La mutación bialélica identificada en este modelo murino *dyl* está localizada en *Foxe3* dominio forkhead y previene la unión de la proteína *Foxe3* al DNA. ¹² En humanos, las mutaciones en *FOXE3* en un inicio se describieron con un patrón autosómico dominante con disgenesia del segmento anterior. ¹²⁻¹⁴ Posteriormente, las mutaciones bialélicas se asociaron con afaquia congénita ³ y microftalmia. ⁴ Adicionalmente Kuang demostró que mutaciones específicas localizadas en una región particular del dominio forkhead (aminoácido 137-164) pueden ser responsables de formas familiares de dilatación de la aorta torácica. ¹⁹

SOX2

Localizado en el cromosoma 3q26, es responsable de aproximadamente 10-20% de casos de anoftalmia y microftalmia bilateral.²⁰⁻²¹ SOX2 codifica para un factor de transcripción con una función primordial en el desarrollo embrionario en numerosos tejidos, incluyendo el ojo. SOX2 trabaja de manera cooperativa con PAX6 para regular otros genes que promueven el desarrollo del cristalino.²² Se han descrito diversas mutaciones dominantes de este gen en sujetos con anoftalmia o microftalmia incluyendo deleciones completas del gen, mutaciones puntuales y deleciones parciales.²³⁻²⁶ Una deleción de 20 bases en el extremo 5' del gen es una de las mutaciones más frecuentemente identificadas.²⁴⁻²⁵ El "síndrome anoftalmia SOX2" abarca esclerocórnea, cataratas, persistencia hiperplásica del vítreo primario y displasia del disco óptico y características no oculares como retraso mental, anomalías neurológicas, dismorfias faciales, problemas en el crecimiento post-natal, patologías esofágicas y anomalías en genitales masculinos.²⁶⁻²⁷

RAX

Localizado en 18q21.32, es otro gen esencial para el desarrollo ocular, posiblemente por su función en el establecimiento y la proliferación de células progenitoras de la retina.²⁸ En torno al 2% de los sujetos con anoftalmia o microftalmia portan mutaciones en RAX, las mutaciones en el gen RAX siguen un patrón de herencia autosómico recesivo.²⁹⁻³⁰

GJA8

Localizado en 1q21.2. Las uniones gap están formadas por dos hemicanales que interactúan y forman canales entre las células vecinas. Cada hemicanal contiene 6 subunidades de conexinas. GJA8 es una conexina del cristalino, las uniones gap mantienen el balance de iones y de agua así como la transparencia y propiedades ópticas del cristalino.³¹

PXDN

Localizado en 2p25.3, este gen codifica una peroxidasa y es secretado dentro de la matriz extracelular. Está involucrado en la formación de la matriz extracelular. Las variantes patogénicas en este gen causan opacidad corneal y otras alteraciones oculares como microftalmia y disgenesia del segmento anterior dentro de las cuales se incluye esclerocórnea.³²

MICROFTALMIA

La microftalmia se define como un defecto en el cual el tamaño total del globo ocular es más pequeño de lo normal, considerándose una longitud axial menor a dos desviaciones estándar, en relación con lo normal para el grupo de edad de referencia, lo que equivale a una longitud axial menor de 19.2 mm al año de edad, y menor de 20.0 mm en el adulto.³³

La prevalencia de microftalmia es de alrededor de 2.2 a 19.8 casos por 100,000 recién nacidos vivos. Otros autores determinan la incidencia conjunta de microftalmia/anoftalmia en aproximadamente 2/10,000 recién nacidos vivos.³⁴

La microftalmia puede ser de dos tipos, simple cuando el tamaño del globo ocular es más pequeño de lo normal sin presentar ninguna otra alteración y es también referida como microftalmia pura o nanofthalmos. Esta clase es esporádica en 75% de los casos y en el otro 25% puede transmitirse de manera autosómica dominante o recesiva, aunque es más frecuente esta última. El otro tipo es la microftalmia compleja en donde la disminución del globo ocular se acompaña de otros defectos oculares y/o sistémicos. Los defectos oculares pueden ser: disgenesias del segmento anterior, alteraciones del cristalino, coloboma coriorretiniano, displasia retiniana y persistencia de vítreo primario hiperplásico.³³

AFAQUIA

Es la ausencia congénita del cristalino.¹⁰

ANIRIDIA

Se define como la ausencia congénita del iris.¹⁰

GLAUCOMA EN DISGENESIA DE SEGMENTO ANTERIOR

El glaucoma es la complicación más grave de los pacientes con disgenesia del segmento anterior y se desarrolla en el 50%, en los cuales puede causar ceguera permanente en el transcurso de los años. El bloqueo del canal de Schlemm el cual es solo uno de los muchos factores que resultan en glaucoma, ocasiona aumento en la presión intraocular, originando muerte de las células ganglionares de la retina y ceguera si no se trata.³⁵

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La alteración o la interrupción de alguno de los numerosos procesos implicados en el desarrollo temprano del ojo en el humano originan un amplio espectro de malformaciones oculares congénitas. Aunque las malformaciones oculares pueden ocurrir como parte de síndromes genéticos complejos, con frecuencia se observan de manera aislada indicando la disrupción de un proceso de desarrollo exclusivo del ojo.

Por otra parte, el grado de discapacidad visual de estas anomalías es variable y depende de la gravedad. La etiología de estas malformaciones es compleja y puede incluir factores ambientales, genéticos o una combinación de ambos. Las causas ambientales pueden corresponder a agentes teratógenos químicos, biológicos o físicos, que interrumpen el desarrollo ocular normal. Los factores genéticos asociados a malformaciones pueden ser de tres tipos: multifactoriales, cromosómicos y monogénicos.

Se considera que la etiología más frecuente de las malformaciones oculares congénitas es la multifactorial, en la que la combinación de numerosas variantes en diversos genes con factores de tipo ambiental es sinérgica para originar la malformación. Las alteraciones multifactoriales y cromosómicas, por lo general, tienen un bajo riesgo de heredarse en la descendencia. La etiología monogénica (también llamada mendeliana) hace referencia a enfermedades causadas por una mutación en un solo gen. En estos casos existe alto riesgo de repetición en los familiares de un afectado. Las malformaciones oculares de etiología monogénica se transmiten a la descendencia con patrones autosómicos dominantes, autosómicos recesivos, ligados al X recesivos o ligados al X dominantes.

JUSTIFICACIÓN

El conocer el genotipo del paciente permite brindar un asesoramiento genético de certeza, identificación de portadores, determinar riesgos de recurrencia y la posibilidad de ofrecer diagnóstico genético prenatal.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar las variantes patogénicas del gen *FOXE3* condicionantes del complejo esclerocórnea-afaquia-aniridia en un paciente de origen mexicano.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Caracterización de variantes patogénicas en *FOXE3*

Identificar portadores

MATERIAL Y MÉTODO

a) Descripción de la población de estudio

Se incluyó un paciente mexicano con diagnóstico clínico de esclerocórnea, afaquia y microftalmia bilateral. Se realizó exploración detallada en lámpara de hendidura, agudeza visual y medición de presión intraocular. Se realizó ultrasonido ocular y ultrabiomicroscopía. Se aisló DNA genómico de leucocitos, y se realizó análisis molecular del gen *FOXE3*. Para el análisis de segregación, las variantes patogénicas se estudiaron en DNA parental por secuenciación Sanger.

Se trata de un paciente masculino de 6 años de edad con esclerocórnea bilateral total, afaquia y microftalmia bilateral.

Antecedentes heredofamiliares: Madre de 19 años, padre de 20 años al momento del embarazo, ambos aparentemente sanos, originarios de El Triunfo, Ayahualco, Veracruz (población con 1935 habitantes, endogamia positiva) Los padres son primos en tercer grado (consanguinidad positiva)

Producto de la gesta III/IV, GI aborto espontaneo del primer trimestre, GII femenino de 9 años sana, G IV masculino de 1 año sano (Figura 2)

Antecedentes prenatales: GIII: Se percata del embarazo a las 4 semanas de gestación, no conto con control prenatal, niega sangrados, amenaza de aborto o parto pretérmino, toxicomanías, teratógenos. Presentó infecciones vaginales durante el último trimestre sin ningún tipo de tratamiento. Se obtiene producto único vivo vía vaginal a las 40 SDG, peso 3,650 gr, talla desconoce.

Desarrollo psicomotor: sonrisa social 3 meses, sostén cefálico 3 meses, sedestación independiente 6 meses, bipedestación independiente 12 meses, ambulación independiente 15 meses. Lenguaje: balbuceo 8 meses, bisílabos 12 meses. Actualmente cursa 1° de primaria, 3 veces a la semana en escuela regular y 2 veces a la semana a escuela Braille. Conoce el abecedario completo y números en Braille

Padecimiento actual: Al nacimiento se diagnosticó catarata bilateral, posteriormente acudió al servicio de Genética del Instituto Nacional de Pediatría, en conjunto con oftalmología se realizó el diagnóstico de esclerocórnea, microftalmia, afaquia. En 2012 se realizó exploración oftalmológica bajo anestesia encontrando en ojo derecho buftalmos, estructuras poco diferenciadas, edema corneal importante, presión intraocular de 32 mmHg, en ojo izquierdo estructuras poco diferenciadas, edema corneal 3 cruces, no se aprecia iris, presión intraocular 32 mmHg. Por las cifras de presión intraocular se inició manejo con dorzolamida y timolol, al no lograr el control de la presión intraocular en ambos ojos en enero de 2013 se realizó trabeculectomía en ojo derecho y en febrero de 2013 se realizó colocación de válvula de Ahmed en ojo izquierdo. En 2016 se realizó una nueva exploración oftalmológica bajo anestesia en donde se evidenció el ojo izquierdo como ojo ptísico con cuerpo de implante valvular en ojo izquierdo extruido, por lo que se procede a

retirar el tubo valvular y se colocó conformador ocular. Actualmente se encuentra en tratamiento con latanoprost.

La ptisis bulbi es un diagnóstico histopatológico de un estadio final de una enfermedad ocular caracterizado por atrofia, y desorganización de los componentes intraoculares. Ojo ptísico es un diagnóstico clínico que se usa para describir un ojo no funcional (sin percepción de la luz), hipotónico y desfigurado.³⁶

Exploración física Peso: 18 kg (percentil 25) Talla: 114 cm (percentil 50) Normocéfalo, pabellones auriculares de adecuada implantación y conformación, frente estrecha, cejas curvas, fisuras palpebrales horizontales, pestañas largas, ojo derecho con esclerocórnea, ojo izquierdo con prótesis ocular, puente nasal regular, dorso recto, filtrum marcado, labios delgados, cavidad oral paladar íntegro, úvula central, cuello cilíndrico, cardiopulmonar sin compromiso, abdomen blando, depresible, sin megalias, genitales masculinos ambos testículos en bolsas escrotales, meato en punta, extremidades íntegras, con adecuado tono y fuerza (Figura 3)

Actualmente, su agudeza visual corregida es movimiento de manos en la mano derecha y no percepción de luz en el ojo izquierdo. Realiza ortoducciones completas en ojo derecho. En la exploración física, en el ojo derecho se observan bordes palpebrales íntegros, fondo de saco interior formado, con hiperemia conjuntival 2 cruces y un vaso circunferencial perilímbico en cuadrante temporal inferior, opacidad corneal generalizada, heterogénea, sin respeto del limbo al menos en sector inferior central, y nasal. Hiperpigmentación aparente en sector temporal, además se observa aplanamiento en la curvatura de la córnea. (Figuras. 4, 5); en biomicroscopía, el segmento anterior no fue valorable. El ojo izquierdo tiene ptisis bulbi (Figura 6), PIO de 13 mmHg en el ojo derecho y 3 mmHg en el ojo izquierdo. En UBM el ojo derecho presenta córnea con grosor heterogéneo más delgado en el centro, se observa ausencia de iris (aniridia) y ausencia de cristalino (afaquia) y vítreo anteriorizado (Figura 7). En el USG ocular modo B el ojo derecho aparenta áfaco, vítreo con moderadas opacidades, hialoides posterior parcialmente desprendida, retina y coroides aplicadas y la excavación del nervio óptico es mediana. La longitud axial del globo ocular es de 19.94 mm, lo que corrobora microftalmia (Figura 8)

b) Estudio molecular

El estudio molecular se realizó en el departamento de Oftalmogenética del Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana.

Una vez aceptada su participación, al paciente y a sus padres se les extrajo una muestra de 4mL de sangre periférica por medio de punción venosa para la extracción del ADN genómico. La extracción de ADN genómico se realizó según el protocolo automatizado para el QIAcube (Qiagen, Hilden, Germany) utilizando el kit "QIAamp DNA Mini" (Qiagen, Hilden, Germany). Una vez obtenido el ADN genómico, éste se cuantificó en un equipo Nanodrop.

Inicialmente se realizó la amplificación por PCR de toda la región codificante del gen *FOXE3*, la reacción se llevó a cabo utilizando el Kit “KAPA2G Fast HotStart Ready Mix” (Kapabiosystems, USA), cada reacción de 25 µL contiene 12.5 µL de 2X KAPA2G Fast HotStart Ready Mix, 50 ng de ADN genómico, 0.5 µM de cada oligonucleótido sentido y antisentido. La reacción consta de los siguientes pasos: una desnaturalización inicial a 95°C por 3 minutos, seguido de una desnaturalización a 95°C por 15 segundos, una alineación a la temperatura media (T_m) por 15 segundos y una extensión a 72°C por 30 segundos repetido por 30-35 ciclos, terminando con una extensión final a 72°C por 7 minutos. Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 1.5%, la banda correspondiente al amplificado (pb) de los exones se cortó para la recuperación del ADN amplificado utilizando el kit “Minielute” (Qiagen, Hilden, Germany).

La secuenciación directa automatizada de los amplicones de PCR se realizó con el kit de secuenciación “BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit” (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Cada reacción de secuenciación de 20 µL contiene 4 µL de Ready Reaction Premix, 2 µL de BigDye Sequencing Buffer, 3.2 pmol de oligonucleótido y 10 ng de ADN amplificado. La reacción sigue los siguientes pasos: iniciar una desnaturalización a 95°C por 30 segundos, alineación a 50°C por 15 segundos y terminación a 60°C por 4 min repetido por 25 ciclos. Estos productos se limpiaron utilizando columnas de sephadex g-50. Para la genotipificación se utilizó un secuenciador ABI Prism 3130 (Applied Biosystems). Las secuencias obtenidas se compararon de forma manual con las reportada en Ensembl. Además, se realizó un análisis in silico de los cambios que se encontraron a través de los programas bioinformáticos SIFT (<http://sift.jcvi.org/>) y PolyPhen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) los cuales predicen los cambios y daños ocurridos en la funcionalidad de la proteína.

RESULTADOS

El análisis de *FOXE3* del DNA del paciente demostró una variante homocigota de tipo transversión c.291C>G, una variante patogénica que predice una sustitución de p.Ile97Met (Figura 9). Esta variante no ha sido identificada previamente como causante de enfermedad, y no está publicada en bases de datos públicas como ExAC, 1000 Genomes o Exome Variant Server. p.Ile97Met reemplaza un aminoácido altamente conservado en diferentes especies desde invertebrados hasta mamíferos (Figura 10)

Se realizó análisis in silico en herramientas para la predicción de la variante encontrada en el probando, en Polyphen se predice que es probablemente dañina con una puntuación de 0.999, sensibilidad de 0.14 y especificidad de 0.99. (Figura 11), en MutationTaster se predice que la variante es causante de enfermedad (Figura 12). Se demostró que ambos padres son portadores heterocigotos de la variante missense p.Ile97Met.

DISCUSIÓN

COMPLEJO ESCLEROCÓRNEA-MICROFTALMIA-AFAQUIA

La esclerocórnea es una condición congénita heterogénea de baja prevalencia caracterizada por esclerización corneal parcial o total. Usualmente se presenta como una entidad bilateral, esporádica y no sindrómica. En humanos, las variantes patogénicas en genes como *RAX* y *SOX2*,⁹ pueden provocar esclerocórnea con un grado variable de malformaciones oculares adicionales. Las variantes patogénicas bialélicas en *FOXE3* son una causa identificada de un complejo malformativo ocular caracterizado por esclerocórnea, afaquia congénita bilateral, aniridia, microftalmia y coloboma de retina.³⁻⁸ *FOXE3* es un miembro de la familia forkhead de factores de transcripción que posee un dominio forkehead de unión al DNA de 80 a 100 residuos de aminoácidos. La expresión de *FOXE3* está presente desde estadios tempranos del desarrollo del cristalino hasta la diferenciación de tejidos oculares y es esencial para el adecuado desarrollo y maduración del cristalino. Varios estudios han demostrado que variantes homocigotas o heterocigotas compuestas en *FOXE3* como causa del complejo esclerocórnea-microftalmia-afaquia.³⁻⁸

Valleix et al³ identificó una mutación homocigota en *FOXE3* c.720C>A (p.C240*) en una familia de Madagascar con 3 hijos afectados con esclerocórnea, afaquia bilateral, microftalmia, aplasia congénita del segmento anterior y displasia de retina. Iseri et al⁴ estudió 2 familias consanguíneas no relacionadas de Pakistán incluyendo la segregación familiar con microftalmia, afaquia, esclerocórnea, y glaucoma, en donde se identificó una sustitución homocigota c.244 A>G (p.Met 82Val) en *FOXE3*; la segunda familia presentó corneas opacas, aniridia, microftalmia y afaquia congénita en la cual se demostró una variante homocigota frameshift c.21_24del (p.Met71IlefsX216) en *FOXE3*. En una familia pakistani endogámica segregó con afaquia congénita primaria y esclerocórnea, Anjum et al (2010) demostraron una variante homocigota c.720C>A (p.C240*) en *FOXE3*.⁵ Nuestro grupo reportó dos familias consanguíneas, una de Pakistán, y otra de México que presentaba varios miembros de la familia con esclerocórnea total, microftalmia, afaquia y coloboma de disco óptico. Se identificaron las variantes homocigotas p.C240* y p.Tyr98His en *FOXE3* en la familia pakistani y en la mexicana respectivamente.⁷ Recientemente, Pantoja et al realizó un estudio epidemiológico en un pequeño poblado de donde es originaria la familia mexicana estudiada por Ali et al⁷ e identificó la variante fundadora p.Tyr98His en 17 pacientes con complejo esclerocórnea-afaquia-microftalmia.³⁷

A continuación, se presenta una tabla de los casos reportados en la literatura de variantes patogénicas en *FOXE3* (Tabla 1)

CONCLUSIÓN

Nuestro paciente presentó un nuevo cambio homocigoto p.Ile97Met, el cual fue clasificado como patogénico de acuerdo con los criterios del Colegio Americano de Genética Médica y Genómica.³⁸ (Tabla 2) La identificación de esta nueva variante patogénica expande el espectro mutacional de *FOXE3*. Nuestro resultado y los publicados previamente de pacientes portadores de variantes patogénicas recesivas en *FOXE3* apoyan la secuenciación de este gen como primera opción diagnóstica en casos de fenotipos oculares severos que incluyan al menos esclerocórnea total/opacidades corneales, microftalmia bilateral, y/o afaquia.

El resultado permitió ofrecer asesoramiento genético de certeza a los padres del paciente. Se brindó asesoramiento genético como una entidad autosómica recesiva con un riesgo de recurrencia de 25% de descendencia afectada, 50% portadores y 25% sanos.

Se plantea la posibilidad de realizar estudio molecular a los hermanos del paciente para identificación de portadores, una vez que sean mayores de edad.

ANEXOS

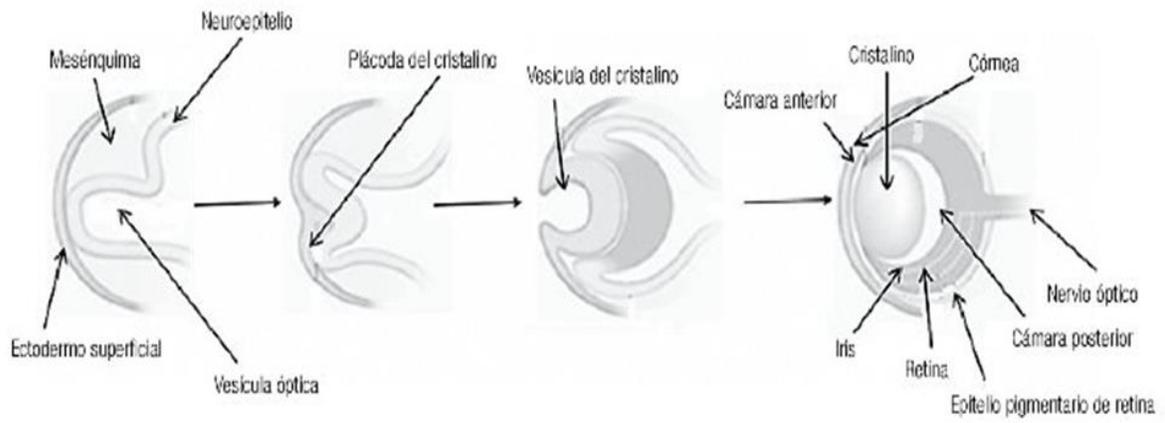


Figura 1. Desarrollo ocular normal

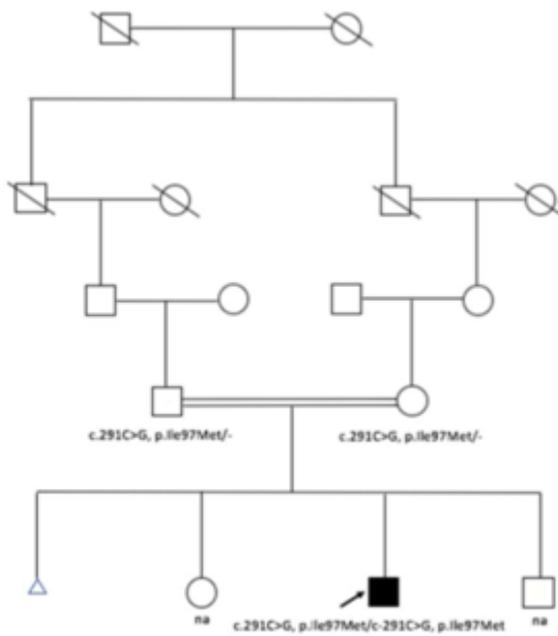


Figura 2. Árbol genealógico de 5 generaciones en donde se observa consanguinidad. Se indica el genotipo del probando y de sus padres.



Figura 3. Foto clínica del paciente, no presenta alteraciones extraoculares.



Figura 4. Foto clínica de ojo derecho en donde se observan bordes palpebrales íntegros, fondo de saco interior formado, con hiperemia conjuntival 2 cruces y un vaso circunferencial perilímbo en cuadrante temporal inferior, opacidad corneal generalizada, heterogénea, sin respeto del limbo al menos en sector inferior central, y nasal. Hiperpigmentación aparente en sector temporal.



Figura 5. Foto clínica de ojo derecho, se aprecia aplanamiento de la curvatura de la córnea.

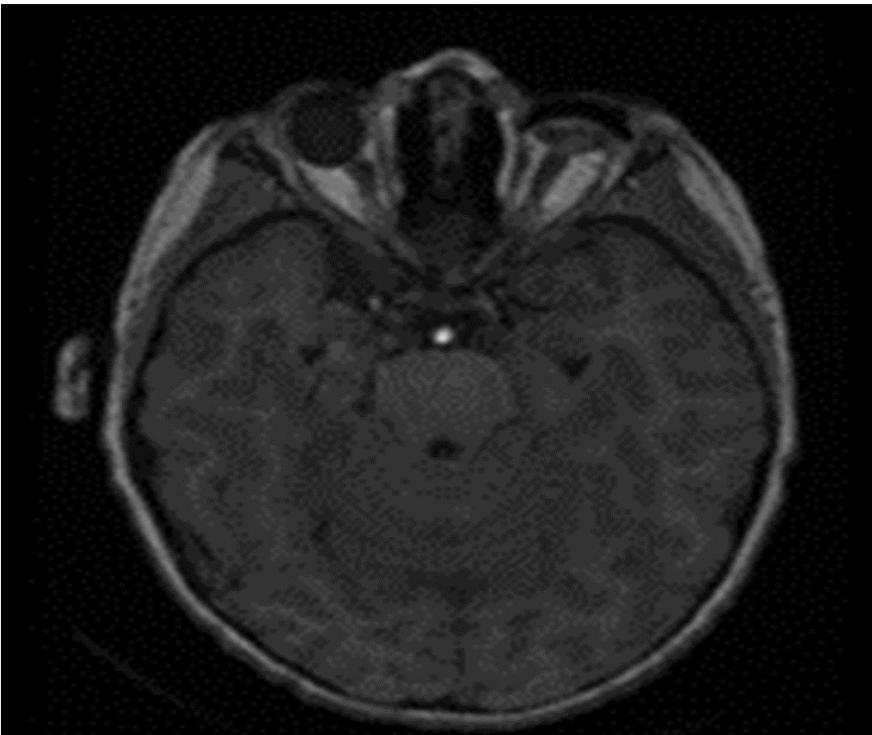


Figura 6. Resonancia magnética cerebral en donde se aprecia ojo ptisico izquierdo



Figura 7. UBM con córnea con grosor heterogéneo más delgado en el centro, se observa ausencia de iris (aniridia) y ausencia de cristalino (afaquia) y vítreo anteriorizado

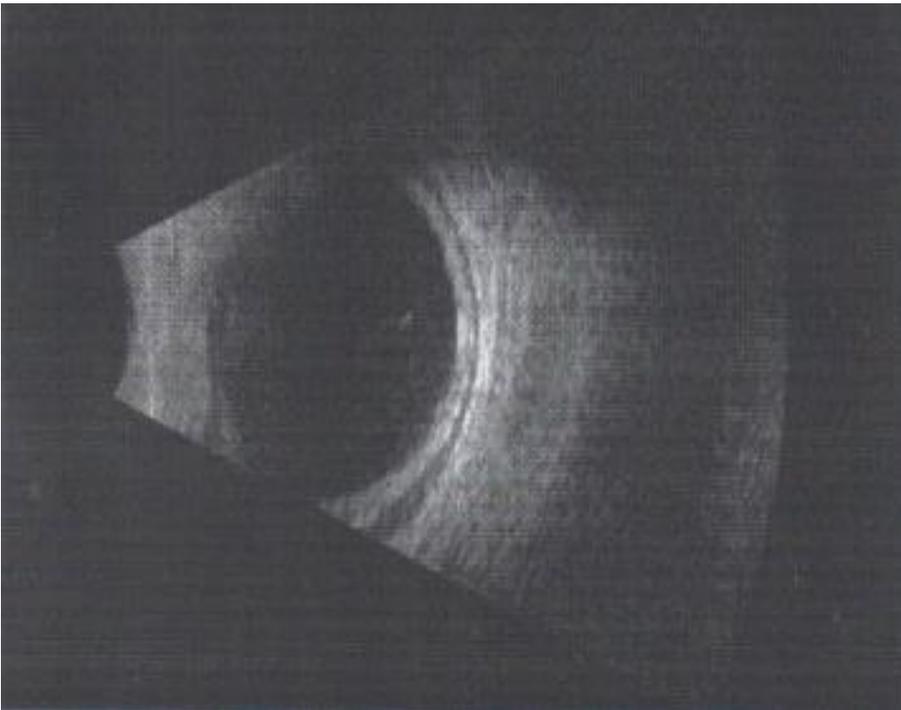


Figura 8. USG modo B de ojo derecho aparenta áfaco, vítreo con moderadas opacidades, hialoides posterior parcialmente desprendida, retina y coroides aplicadas y la excavación del nervio óptico es mediana. La longitud axial del globo ocular es de 19.94 mm

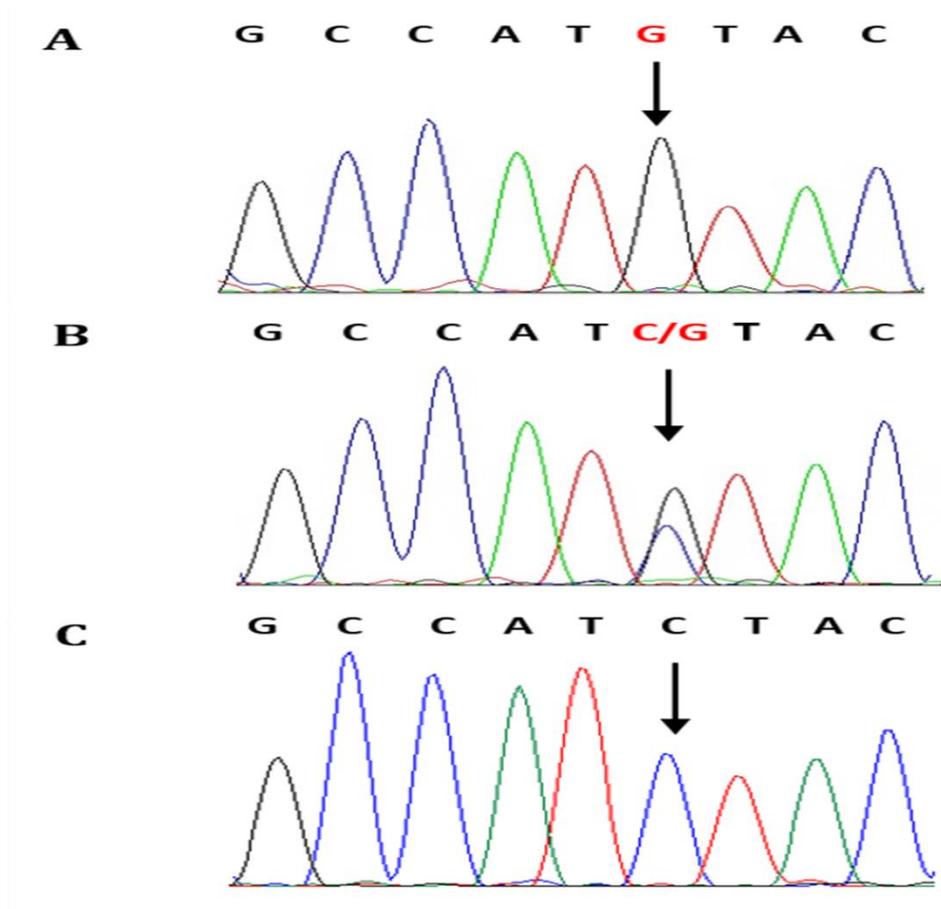


Figura 9. Electroferograma del exón 1 de *FOXE3*

- A) Variante c.291C>G homocigota (probando)
- B) Variante c.291C>G heterocigota (padres portadores)
- C) Control

conservation protein level for non-synonymous changes	species	match	gene	aa alignment
	Human			97 HAPGRRLTLAAIYRFITERFAFYR
	mutated	all conserved		97 HAPGRRLTLAAIYRFITERFAFY
	Ptroglydytes	no homologue		
	Mmulatta	no homologue		
	Fcatus	no homologue		
	Mmusculus	all identical	ENSMUSG00000044518	90 HAPGRRLTLAAIYRFITERFAFY
	Ggallus	no homologue		
	Trubripes	all identical	ENSTRUG00000010676	79 KLTLLGGIYKFITERFPFY
	Drerio	all identical	ENSDARG00000079266	66 NSPDRKLTLLGGIYKFITERFPFY
	Dmelanogaster	all identical	FBgn0004898	35 HSPQRLLPLSEIYRFIMDQFPFY
	Celegans	no homologue		
	Xtropicalis	all identical	ENSXETG00000024889	92 RKLTLGGIYKFITERFPFY

Figura 10. Análisis filogenético de la proteína isoleucina en la posición 97, se puede observar que está altamente conservada en diferentes especies desde invertebrados hasta mamíferos.

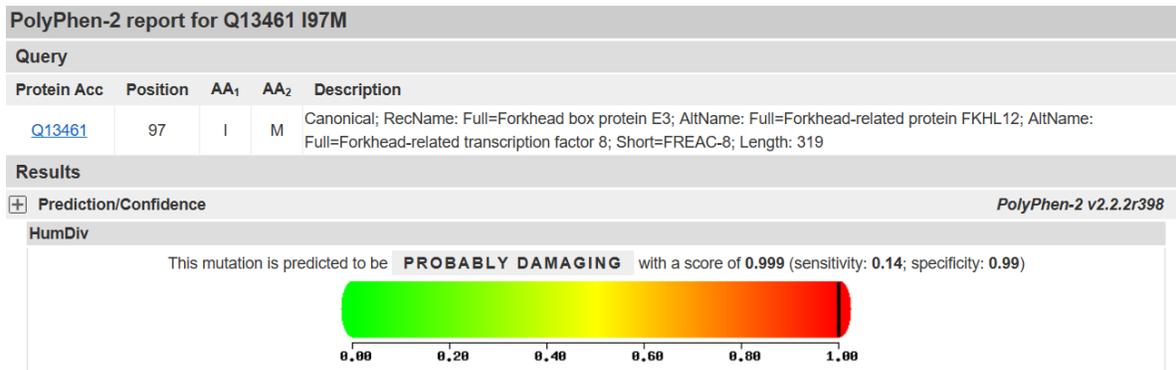


Figura 11. Análisis in silico en PolyPhen

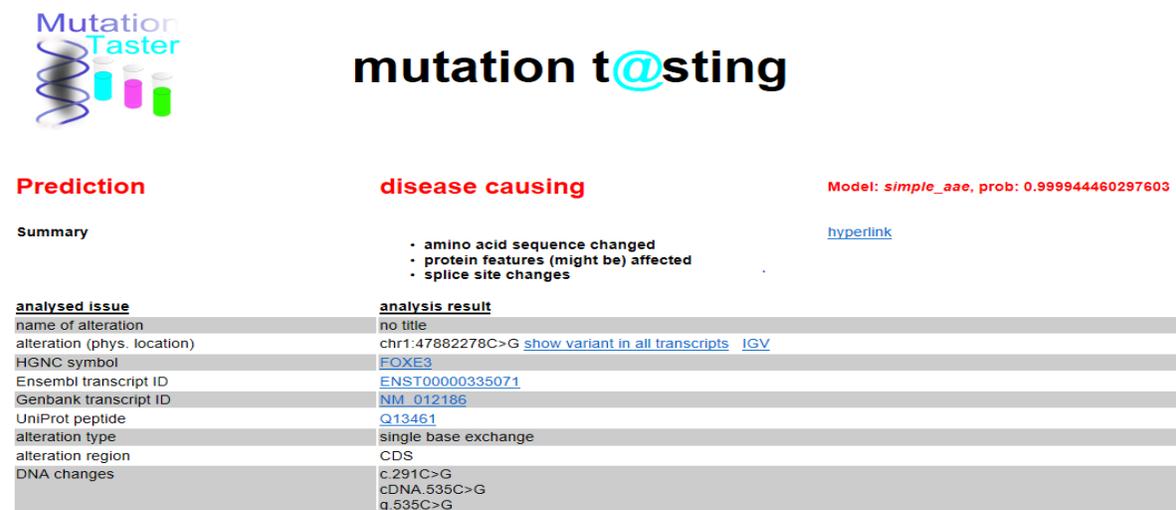


Figura 12. Análisis in silico en Mutation Taster

TABLA 1

Publicación	Pacientes	Mutaciones bialélicas	Fenotipo ocular	Fenotipo extraocular	Padre	Madre
Chacón-Camacho⁴⁶ (2018)	Paciente 1	c.[291C>G];[291C>G] p.[(Ile97Met)];[(Ile97Met)]	Complejo esclerocórnea, microftalmia, afaquia		c.[291C>G];[=]	c.[291C>G];[=]
Chen³⁹ (2017)	Familia 1 (5 pacientes)	c.[307G>A];[307G>A] p.[(Glu103Lys)];[(Glu103Lys)]	Catarata congénita		c.[307G>A];[=]	c.[307G>A];[=]
Saboo⁴⁰ (2016)	Familia 1 (3 pacientes)	c.[472G>C];[472G>C] p.[(Gly158Arg)];[(Gly158Arg)]	Microftalmia bilateral con afaquia, esclerocórnea y estafiloma anterior		c.[472G>C];[=]	c.[472G>C];[=]
Ullah⁸ (2016)	Familia MA115 (2 pacientes)	c.[21_24del];[21_24del] p.[(Met7IlefsTer216)]; [(Met7IlefsTer216)]	Microftalmia bilateral con afaquia y opacidad corneal		c.[21_24del];[=]	c.[21_24del];[=]
	Familia MA119 (3 pacientes)	c.[21_24del];[21_24del] p.[(Met7IlefsTer216)]; [(Met7IlefsTer216)]	Microftalmia bilateral con afaquia y opacidad corneal		Datos no disponibles, asintomático	c.[21_24del];[=]
	Familia MA143 (3 pacientes)	c.[289A>G];[289A>G] p.[(Ile97Val)];[(Ile97Val)]	Microftalmia bilateral con afaquia y opacidad corneal		c.[289A>G];[=]	c.[289A>G];[=]
Khan¹⁸ (2016)	Familia PKCC139 (4 pacientes)	c.[720C>A];[720C>A] p.[(Cys240Ter)];[(Cys240Ter)]	Anomalia de Peters y glaucoma		c.[720C>A];[=]	c.[720C>A];[=]
	Familia PKCC009 (5 pacientes)	c.[351C>G];[351C>G] p.[(Asn117Lys)];[(Asn117Lys)]	Catarata congénita		c.[351C>G];[=]	c.[351C>G];[=]
	Familia PKCC039 (7 pacientes)	c.[307G>A];[307G>A] p.[(Glu103Lys)];[(Glu103Lys)]	Catarata congénita		c.[307G>A];[=]	c.[307G>A];[=]

Islam⁴¹ (2015)	Paciente 1	c.[358C>G];[(358C>G)] p.[(Arg120Gly)];[(Arg120Gly)]	Afaquia primaria, opacidad corneal, adhesión iridocorneal, desprendimiento o de retina, microftalmia glaucoma		Datos no disponibles, asintomático	c.[358C>G];[=]
	Paciente 2	c.[21_24del];[21_24del] p.[(Met71IlefsTer216)]; [(Met71IlefsTer216)]	Afaquia bilateral con opacidad corneal congénita, adhesión iridocorneal, desprendimiento o de retina, glaucoma, perforación corneal		c.[21_24del];[=]	c.[21_24del];[=]
	Paciente 3	c.[269G>T];[705delC] p.[(Arg90Leu)]; [(Glu236SerfsTer71)]	Afaquia primaria bilateral con opacidad corneal congénita y glaucoma		c.[705delC];[=]	c.[269G>T];[=]
García-Montalvo⁴² (2014)	Paciente 1	c.[292T>C];[(292T>C)] p.[(Tyr98His)];[(Try98His)]	Microftalmia bilateral con esclerocórnea		Datos no disponibles, asintomático	Datos no disponibles, asintomático
Chassaing⁴³ (2014)	Paciente 28	c.[685_686insTCCGGAGC]; [(685_686insTCCGGAGC)] p.[(Ala230ArgfsTer3)]; [(Ala230ArgfsTer3)]	Microftalmia bilateral con esclerocórnea	Retraso global del neurodesarrollo	Datos no disponibles, asintomático	c.[685_686insTCCGGAGC];[=]

	Familia 1 (Paciente 29 y hermano)	c.[720C>A];[(720C>A)] p.[(Cys240Ter)];[(Cys240Ter)]	Microftalmia bilateral con esclerocórnea	Síndrome de ovario poliquístico	Datos no disponibles, asintomático	Datos no disponibles, asintomático
Pantoja-Meléndez³⁷(2013)	17 pacientes	c.[292T>C];[292T>C] p.[(Tyr98His)];[(Tyr98His)]	Microftalmia bilateral, esclerocórnea, afaquia, coloboma de disco óptico		c.[292T>C];[=]	c.[292T>C];[=]
Jiménez⁴⁴(2011)	Paciente 1	c.[720C>A];[(720C>A)] p.[(Cys240Ter)];[(Cys240Ter)]	Microftalmia bilateral	Malformación de Arnold-Chiari	Datos no disponibles, asintomático	Datos no disponibles, asintomático
Reis⁶(2010)	Paciente 1	c.[244A>G];[705delC] p.[(Met82Val)];[(Glu236SfsTer71)]	Microftalmia bilateral severa y esclerocórnea	Dilatación de pelvis renal	c.[705delC];[=]	c.[244A>G];[=]
	Paciente 2	c.[557delT];[557delT] p.[(Phe186SerfsTer38)];[(Phe186SerfsTer38)]	Microftalmia bilateral, esclerocórnea, afaquia, iris displásico, probable glaucoma		c.[557delT];[=]	c.[557delT];[=]
	Paciente 3	c.[720C>A];[(720C>A)] p.[(Cys240Ter)];[(Cys240Ter)]	Microftalmia bilateral, afaquia, opacidad corneal, glaucoma, drusas de disco óptico, coloboma de disco óptico	Autismo	Datos no disponibles, asintomático	Datos no disponibles, asintomático
	Paciente 4	c.[720C>A];[720C>A] p.[(Cys240Ter)];[(Cys240Ter)]	Microftalmia bilateral, esclerocórnea, coloboma, ectasia corneal y glaucoma	Malformación de Arnold-Chiari, hernia umbilical	c.[720C>A];[=]	c.[720C>A];[=]

	Paciente 5	c.[720C>A];[720C>A] p.[(Cys240Ter)];[(Cys240Ter)]	Microftalmia bilateral, esclerocórnea, coloboma, ectasia corneal y glaucoma	Hipertriosis	c.[720C>A];[=]	c.[720C>A];[=]
Anjum⁵ (2010)	Familia 1 (5 pacientes)	c.[720C>A];[720C>A] p.[(Cys240Ter)];[(Cys240Ter)]	Afaquia primaria bilateral		c.[720C>A];[=]	c.[720C>A];[=]
Ali⁷ (2010)	Familia MEP54 (7 pacientes)	c.[292T>C];[292T>C] p.[(Tyr98His)];[(Tyr98His)]	Microftalmia, afaquia, esclerocórnea		Datos no disponibles, asintomático	Datos no disponibles, asintomático
	Familia mexicana (9 pacientes)	c.[720C>A];[720C>A] p.[(Cys240Ter)];[(Cys240Ter)]	Microftalmia, afaquia, esclerocórnea y coloboma de disco óptico		c.[720C>A];[=]	c.[720C>A];[=]
Iseri⁴ (2009)	Familia 1 (6 pacientes)	c.[244A>G];[244A>G] p.[(Met82Val)];[(Met82Val)]	4/6 con complejo microftalmia y/o afaquia con esclerocórnea 2/6 disgenesia del segmento anterior y glaucoma		c.[244A>G];[=]	c.[244A>G];[=]
	Familia 2 (3 pacientes)	c.[21_24del];[21_24del] p.[(Met71IlefsTer216)];[(Met71IlefsTer216)]	Complejo microftalmia, afaquia primaria y esclerocórnea	Retraso global del neurodesarrollo	c.[21_24del];[=]	c.[21_24del];[=]
Valleix³ (2006)	Hermanos (3 pacientes)	c.[720C>A];[720C>A] p.[(Cys240Ter)];[(Cys240Ter)]	Afaquia bilateral, aniridia, microftalmia y displasia de retina		c.[720C>A];[=]	c.[720C>A];[=]

Plaisancie 45(2017)	Paciente 1	c.[244A>G];[269G>T] p.[(Met82Val)];[(Arg90Leu)]	Microftalmia izquierda con esclerocórnea y anomalía de Peters derecha		c.[244A>G];[=]	c.[269G>T];[=]
	Paciente 2	c.[310C>T];[232G>A] p.[(Arg104Cys)];[(Ala78Thr)]	Microftalmia unilateral con esclerocórnea bilateral		c.[310C>T];[=]	c.[232G>A];[=]
	Paciente 3	c.[345G>A];[472G>C] p.[(Trp115Ter)];[(Gly158Arg)]	Complejo microftalmia bilateral con esclerocórnea	Retraso global del neurodesarrollo	c.[345G>A];[=]	c.[472G>C];[=]
	Familia 1 (2 hermanas)	c.[244A>G];[244A>G] p.[(Met82Val)];[(Met82Val)]	Complejo microftalmia bilateral con esclerocórnea	Defecto septal ventricular	c.[244A>G];[=]	c.[244A>G];[=]
	Familia 2 (2 hermanas)	c.[232G>A];[232G>A] p.[(Ala78Thr)];[(Ala78Thr)]	Complejo microftalmia bilateral con anomalía de Peters		c.[232G>A];[=]	c.[232G>A];[=]

TABLA 2. Criterios para clasificación de variantes patogénicas

EVIDENCIA DE PATOGENICIDAD	CATEGORÍA
Muy fuerte	<p>PVSI Variante nula (sin sentido, cambio en el marco de lectura, canónica, ± 1 o 2 en el sitio de splicing, inicio de codón, deleción de uno o varios exones) en un gen en donde la pérdida de función es un mecanismo conocido de enfermedad.</p>
Fuerte	<p>PS1 El mismo cambio de aminoácido ha sido previamente establecido como variante patogénica sin importar el cambio del nucleótido.</p> <p>PS2 De novo (maternidad y paternidad confirmada) en un paciente con una enfermedad y sin historia familiar</p> <p>PS3 Estudios funcionales bien establecidos in vitro o in vivo apoyan el efecto dañino en el gen o el producto del gen</p> <p>PS4 La prevalencia de la variante en individuos afectados está significativamente aumentada en comparación con la prevalencia en los controles</p>
Moderada	<p>PM1 Localizada en un hot spot mutacional y/o en un dominio funcional crítico o bien establecido (sitio de activación de una enzima) sin ser una variante benigna.</p> <p>PM2 Ausente en controles (o en frecuencia extremadamente baja si es recesiva) en Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project, o Exome Aggregation Consortium.</p> <p>PM3 Para enfermedades recesivas, detectadas en trans con una variante patogénica.</p>

	<p>PM4 Cambios en la longitud de la proteína como resultados de deleciones/inserciones en una región no repetida o variantes de paro.</p> <p>PM5 Nuevas variantes missense con cambio en un residuo de aminoácido en donde otro cambio missense se ha determinado como patogénico previamente</p> <p>PM6 Se asume como un cambio de novo, pero sin confirmación de paternidad y maternidad.</p>
<p>De soporte</p>	<p>PP1 Cosegregación de la enfermedad en varios miembros de la familia afectados en un gen que se conoce como causante de la enfermedad.</p> <p>PP2 Variante missense en un gen que tiene una tasa baja de variantes missense benignas y en el cual las variantes missense son un mecanismo común de enfermedad</p> <p>PP3 Múltiples líneas de evidencia computacional apoyan el efecto deletéreo del gen o producto del gen (conservación, evolutivo, impacto de splicing)</p> <p>PP4 El fenotipo del paciente o la historia familiar es altamente específica para una enfermedad con etiología genética única.</p> <p>PP5 Fuentes confiables reportan la variante como patogénica, pero la evidencia no está disponible en laboratorio para realizar una evaluación independiente.</p>

BIBLIOGRAFÍA

1. Nischal KK. Congenital corneal opacities -a surgical approach to nomenclature and classification. *Eye*. 2007; 21:1326–1337.
2. Medina-Martínez O, Jamrich M. Foxe view of lens development and disease. *Development* 2007; 134:1455–1463.
3. Valleix S, Niel F, Nedelec B, et al. Homozygous nonsense mutation in the *FOXE3* gene cause of congenital primary aphakia in humans. *Am J Hum Genet*. 2006; 79:358–364.
4. Iseri SU, Osborne RJ, Farral M, et al. Seeing clearly: the dominant and recessive nature of *FOXE3* in eye developmental anomalies. *Hum Mut*.2009;30:1378–1386.
5. Anjum I, Eiberg H, Baig SM, et al. A mutation in the *FOXE3* gene causes congenital primary aphakia in an autosomal recessive consanguineous Pakistani family. *Mol Vis*. 2010; 16:549–555.
6. Reis LM, Tyler RC, Schneider A, et al. *FOXE3* plays a significant role in autosomal recessive microphthalmia. *Am J Med Genet A*. 2010;152A: 582–590.
7. Ali M, Buentello-Volante B, McKibbin M, et al. Homozygous *FOXE3* mutations cause nonsyndromic, bilateral, total sclerocornea, aphakia, microphthalmia and optic coloboma. *Mol Vis*. 2010; 16:1162–1168.
8. Ullah E, Nadeem Saqib MA, Sajid S, et al. Genetic analysis of consanguineous families presenting with congenital ocular defects. *Exp Eye Res*. 2016; 146:163–171.
9. Carlson, Bruce. “Embriología humana y biología del desarrollo”. 5ta edición. Barcelona; Elsevier, 2014 pp: 300
10. Moore K, Persaud T. *Embriología Clínica* (9ª ed.). Ed. Elsevier; 2013.
11. Williamson KA, FitzPatrick DR. The genetic architecture of microphthalmia, anophthalmia and coloboma. *Eur J Med Genet*. 2014; 57:369– 380.
12. Ormestad M, Blixt A, Churchill A, Martinsson T, Enerbäck S, Carlsson P. Foxe3 haploinsufficiency in mice: a model for Peters' anomaly. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002;43:1350–135
13. Blixt A, Mahlapuu M, Aitola M, Pelto-Huikko M, Enerbäck S, Carlsson P. A forkhead gene, FoxE3, is essential for lens epithelial proliferation and closure of the lens vesicle. *Genes Dev*. 2000;14: 245–254.

14. Semina EV, Brownell I, Mintz-Hittner HA, Murray JC, Jamrich M. Mutations in the human forkhead transcription factor FOXE3 associated with anterior segment ocular dysgenesis and cataracts. *Hum Mol Genet.* 2001;10:231–236.
15. Shi X, Luo Y, Howley S, et al. Zebrafish foxe3: roles in ocular lens morphogenesis through interaction with pitx3. *Mech Dev.* 2006;123: 761–782.
16. Landgren H, Blixt A, Carlsson P. Persistent FoxE3 expression blocks cytoskeletal remodeling and organelle degradation during lens fiber differentiation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49:4269–4277
17. Dimanlig PV, Faber SC, Auerbach W, Makarenkova HP, Lang RA. The upstream ectoderm enhancer in Pax6 has an important role in lens induction. *Development.* 2001;128:4415–4424.
18. Khan SY, Vasanth S, Kabir F, et al. FOXE3 contributes to Peters anomaly through transcriptional regulation of an autophagy-associated protein termed DNAJB1. *Nat Commun.* 2016;7:10953.
19. Kuang SQ, Medina-Martinez O, Guo DC, et al. FOXE3 mutations predispose to thoracic aortic aneurysms and dissections. *J Clin Invest.* 2016;126:948–961
20. Schneider A, Bardakjian T, Reis LM, Tyler RC, Semina EV. Novel SOX2 mutations and genotype-phenotype correlation in anophthalmia and microphthalmia. *Am J Med Genet A* 2009; 149:2706-2715.
21. Inoue M, Kamachi Y, Matsunami H, Imada K, Uchikawa M, Kondoh H. PAX6 and SOX2-dependent regulation of the Sox2 enhancer N-3 involved in embryonic visual system development. *Genes Cells* 2007; 12:1049-1061.
22. Fantes J, Ragge NK, Lynch S, McGill NI, Collin JR, Howard-Peebles PN, Hayward C, Vivian AJ, Williamson K, Van Heyningen V, FitzPatrick DR. Mutations in SOX2 cause anophthalmia. *Nat Genet* 2003; 33:461-463.
23. Zenteno JC, Gascon-Guzman G, Tovilla-Canales JL. Bilateral anophthalmia and brain malformations caused by a 20-bp deletion in the SOX2 gene. *Clin Genet* 2005; 68:564-566.
24. Zenteno JC, Perez-Cano HJ, Aguinaga M. Anophthalmia-esophageal atresia syndrome caused by an SOX2 gene deletion in monozygotic twin brothers with markedly discordant phenotypes. *Am J Med Genet A* 2006; 140:1899-1903.

25. Reis LM, Tyler RC, Schneider A, Bardakjian T, Semina EV. Examination of SOX2 in variable ocular conditions identifies a recurrent deletion in microphthalmia and lack of mutations in other phenotypes. *Mol Vis.* 2010; 28:768-773.
26. Ragge NK, Lorenz B, Schneider A, Bushby K, de Sanctis L, de Sanctis U, Salt A, Collin JR, Vivian AJ, Free SL, Thompson P, Williamson KA, Sisodiya SM, van Heyningen V, Fitzpatrick DR. SOX2 anophthalmia syndrome. *Am J Med Genet A* 2005, 135:1-7.
27. Williamson KA, Hever AM, Rainger J, Rogers RC, Magee A, Fiedler Z, Keng WT, Sharkey FH, McGill N, Hill CJ, Schneider A, Messina M, Turnpenny PD, Fantes JA, van Heyningen V, FitzPatrick DR. Mutations in SOX2 cause anophthalmia-esophageal-genital (AEG) syndrome. *Hum Mol Genet* 2006; 15:1413-1422.
28. Bailey TJ, El-Hodiri H, Zhang L, Shah R, Mathers PH, Jamrich M. Regulation of vertebrate eye development by Rx genes. *Int J Dev Biol* 2004; 48: 761-770.
29. Lequeux L, Rio M, Vigouroux A, Titeux M, Etchevers H, Malecaze F, Chassaing N, Calvas P. Confirmation of RAX gene involvement in human anophthalmia. *Clin Genet* 2008; 74:392-395.
30. Gonzalez-Rodriguez J, Pelcastre EL, Tovilla-Canales JL, Garcia-Ortiz JE, Amato-Almanza M, Villanueva-Mendoza C, Espinosa-Mattar Z, Zenteno JC. Mutational screening of CHX10, GDF6, OTX2, RAX and SOX2 genes in 50 unrelated microphthalmia-anophthalmia-coloboma (MAC) spectrum cases. *Br J Ophthalmol* 2010; 94:1100-1104.
31. Nielsen, P. A., Baruch, A., Shestopalov, V. I., Giepmans, B. N. G., Dunia, I., Benedetti, E. L., Kumar, N. M. Lens connexins alpha-3-Cx46 and alpha-8-Cx50 interact with zonula occludens protein-1 (ZO-1). *Molec. Biol. Cell* 14: 2470-2481, 2003.
32. Cheong, S.-S., Hentschel, L., Davidson, A. E., Gerrelli, D., Davie, R., Rizzo, R., Pontikos, N., Plagnol, V., Moore, A. T., Sowden, J. C., Michaelides, M., Snead, M., Tuft, S. J., Hardcastle, A. J. Mutations in CPAMD8 cause a unique form of autosomal-recessive anterior segment dysgenesis. *Am. J. Hum. Genet.* 99: 1338-1352, 2016.
33. Bardakjian TM, Schneider A. The genetics of anophthalmia and microphthalmia. *Curr Opin Ophthalmol* 2011; 22:309-313.
34. Morrison, D.; FitzPatrick, D.; Hanson, I.; Williamson, K.; Van Heyningen, V.; Fleck, B.; Jones, I.; Chalmers, J.; Campbell, H. "National study of microphthalmia, anophthalmia, and coloboma (MAC) in Scotland:

- investigation of genetic aetiology." *Journal of Medical Genetics*. 2002; 39: 16-22
35. Munemasa Y, Kitaoka Y. Molecular mechanisms of retinal ganglion cell degeneration in glaucoma and future prospects for cell body and axonal protection. *Front Cell Neurosci*. 2012;6(January):60. <https://doi.org/10.3389/fncel.2012.00060>.
 36. Stefani FH. Phthisis bulbi—an intraocular floride proliferative reaction. *Dev Ophthalmol*. 1985;10:78–160.
 37. Pantoja-Meléndez CA, 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; 19:1866–1870.
 38. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of medical genetics and Genomics and the association for molecular pathology. *Genet Med*. 2015;17 :405–424
 39. Chen J, Wang Q, Cabrera PE, et al. Molecular Genetic Analysis of Pakistani Families With Autosomal Recessive Congenital Cataracts by Homozygosity Screening. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2017;58: 2207–2217.
 40. Saboo US, Penke D, Mahindrakar A, et al. Exome sequencing reveals novel homozygous FOXE3 mutation in microphthalmos with staphylomatous malformation. *Ophthalmic Genet*. 2017;38:295–297
 41. Islam L, Kelberman D, Williamson L, et al. Functional analysis of FOXE3 mutations causing dominant and recessive ocular anterior segment disease. *Hum Mutat*. 2015;36:296–300.
 42. Garcia-Montalvo IA, Pelcastre-Luna E, Nelson-Mora J, et al. Mutational screening of FOXE3, GDF3, ATOH7, and ALDH1A3 in congenital ocular malformations. Possible contribution of the FOXE3 p.VAL201MET variant to the risk of severe eye malformations. *Ophthalmic Genet* 2014;35:190–192.
 43. Chassaing N, Causse A, Vigouroux A, et al. Molecular findings and clinical data in a cohort of 150 patients with anophthalmia/microphthalmia. *Clin Genet*. 2014;86:326–334
 44. Jimenez NL, Flannick J, Yahyavi M, et al. Targeted ‘next-generation’ sequencing in anophthalmia and microphthalmia patients confirms SOX2, OTX2 and FOXE3 mutations. *BMC Med Genet* 2011;12:172.

45. Plaisancié J, Ragge NK, Dollfus H, et al. FOXE3 mutations: genotype-phenotype correlations. *Clin Genet*. 2018;93:837–845
46. Quiroz-Casian N, Chacón-Camacho OF, Barragán-Arévalo T, Nava-Valdez J, Lieberman E, Salgado-Medina A, Navas A, Graue-Hernandez EO, Zenteno JC. Sclerocornea-Microphthalmia-Aphakia Complex: Description of Two Additional Cases Associated With Novel FOXE3 Mutations and Review of the Literature. *Cornea*. 2018 Sep;37(9):1178-1181