

ÍNDICE

- RESUMO	Pág. 2
- ABSTRACT	Pág. 3
- INTRODUÇÃO	Pág. 4
- MÉTODOS	Pág. 6
• Caracterização fenotípica de cada caso clínico	Pág. 6
• Cariótipo e sondas sub-teloméricas	Pág. 8
• Análise mutacional do gene <i>FOXL2</i>	Pág. 8
- RESULTADOS	Pág. 9
- DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	Pág. 15
- AGRADECIMENTOS	Pág. 19
- BIBLIOGRAFIA	Pág. 19

SÍNDROME DE BLEFAROFIMOSE-PTOSE-EPICANTUS (BPES)

RESUMO

A síndrome de blefarofimose-ptose-epicantus é um raro transtorno do desenvolvimento, de transmissão autossómica dominante, causada por mutações no gene *FOXL2* ou por deleções génicas totais, translocações cromossómicas envolvendo o *locus* do gene ou perturbando os elementos distantes cis-reguladores do *FOXL2*. Esta síndrome craniofacial de penetrância completa apresenta duas variantes clínicas: Tipo I que associa alterações das pálpebras a insuficiência ovárica, e o tipo II com dismorfismo palpebral isolado. O nosso objectivo foi desvendar o defeito genético subjacente numa *cohort* de doentes portugueses com BPES combinada com a abordagem clínica global destas crianças.

Seis doentes portugueses não aparentados com fenótipo BPES foram submetidos a uma avaliação fenotípica completa dos pontos de vista da genética clínica e oftalmológico, assim como de uma avaliação citogenética e molecular.

Este estudo prevê a identificação das alterações subjacentes ao fenótipo de BPES a nível molecular e/ou citogenético nestes doentes, permitindo o estabelecimento de uma correlação genótipo-fenótipo, aconselhamento genético adequado e diagnóstico pré-natal.

Esta pesquisa foi realizada em concordância com os princípios da Declaração de Helsínquia e com as *guidelines* institucionais definidas pelo comité de ética da Faculdade de Medicina de Coimbra.

PALAVRAS CHAVE: Síndrome BPES; Blefarofimose; Ptose; Epicantus; Telecantus; citogenética; gene *FOXL2*.

ABSTRACT

Blepharophimosis-ptosis-epicanthus syndrome (BPES) is a rare autosomal dominant developmental disorder caused by *FOXL2* mutations, total gene deletions, chromosomal translocations involving the gene locus or disrupting distant regulatory elements surrounding *FOXL2*. This craniofacial syndrome of complete penetrance presents two distinct clinical variants: type I that associates eyelid changes with ovarian insufficiency, and type II with isolated eyelid defects. Our aim was to unravel the underlying genetic defect in a cohort of Portuguese BPES patients combined with comprehensive clinical approach of these children.

Six independent portuguese patients with the BPES phenotype underwent complete evaluation from a clinical genetics, ophthalmological, cytogenetics and molecular standpoints.

This study envisions to the identification of the molecular and cytogenetic changes underlying BPES in this Portuguese cohort of patients, allowing the establishment of genotype-phenotype correlations, appropriate genetic counseling and prenatal diagnosis.

This research was conducted in accordance with the tenets of the Declaration of Helsinki and with the institutional guidelines defined by the ethics committee of the Faculty of Medicine of Coimbra.

KEY WORDS: BPES; blepharofimosis; ptosis; epicanthus; telecanthus; cytogenetics; *FOXL2* gene

INTRODUÇÃO

A síndrome de blefarofimose ptose epicantus inversus (BPES) foi descrita pela primeira vez em 1961 como sendo uma síndrome rara, bem definida, transmitida de forma autossômica dominante [Waardenburg PG, 1961]. O reconhecimento de outro envolvimento sistêmico associado ao fenótipo facial permitiu que esta síndrome fosse delineada em dois tipos: BPES I e BPES II [Zlotogora J *et al*, 1983].

Na BPES tipo I há evidência de uma transmissão unicamente masculina associado a infertilidade nas mulheres afectadas [Lenz W, 1963] consequência de insuficiência ovárica prematura; este é o tipo mais comum, tendo uma penetrância completa. Pelo contrário, o BPES tipo II, apresenta uma transmissão genética autossômica dominante e independente do sexo, afecta mulheres férteis e tem uma penetrância de 96.5% [Zlogotora J *et al*, 1983].

Esta síndrome é composta por um fenótipo característico, reunindo a nível facial/palpebral quatro características major: *Blefarofimose e ptose*, com redução da fenda palpebral nos sentidos horizontal e vertical respectivamente. Os indivíduos com *ptose*, adoptam uma postura compensatória com a cabeça inclinada para trás, contracção do músculo frontal e elevação do queixo; *Epicantus inversus*, descrita como sendo uma pequena prega na pele que surge a partir da pálpebra inferior e corre para dentro e para cima, que melhora ligeiramente com a idade; *Telecantus*, que corresponde a um afastamento da distância do canto interno de ambos os olhos da linha média, permanecendo a distância interpupilar inalterada. Estão igualmente descritos na literatura num número limitado de casos, a ocorrência de microftalmia, anoftalmia, microcórnea, hipermetropia e estrabismo, entre outros [Oley C, 1988].

Entre os achados fenotípicos mais relevantes desta síndrome há que destacar os ligados à *infertilidade feminina*; foram relatados casos de mulheres afectadas com ciclos menstruais irregulares [Oley C, 1988] e casos de insuficiência ovárica primária (IOP) [Townes PL, 1979]. A IOP é definida com o início da menopausa antes dos 40 anos de idade e é diagnosticada pela observação de amenorreia secundária, baixo nível de estrogéneos circulantes e elevadas concentrações séricas de gonadotrofinas. [Prueitt R L, 2001]

A manifestação dos dois tipos desta síndrome, ocorre devido a alterações no gene *FOXL2*, identificado em 2001 [Crisponi L, 2001]. Este gene está localizado no cromossoma 3q23 e parece estar implicado na função ovárica [Crisponi L *et al*, 2001]. Existe uma base de dados que pode ser consultada via online, com informações relativas a mutações em humanos do gene *FOXL2*, e as suas variantes associadas a BPES e a IOP [Beysen D, 2004].

Estudos revelam uma correlação genótipo-fenótipo, sendo que mutações em *FOXL2* resultando em proteínas truncadas parecem estar associadas a um fenótipo de BPES tipo I e mutações particulares resultante na síntese de proteínas *FOXL2* alongadas, como as expansões de poli-Ala [De Baere, 2003], parecem causar BPES tipo II; acrescenta-se ainda que a haploinsuficiência deste gene, que codifica o "*forkhead transcription factor*" está na origem de ambos tipos de BPES [Crisponi *et al*, 2001; De Baere *et al*, 2001]. As alterações genéticas correspondem em 81% a mutações intragénicas, os rearranjos genéticos compreendendo deleções intragénicas de *FOXL2* ocorrem em 12% dos casos, deleções localizadas fora da unidade de transcrição observam-se em 5% dos casos e os 2% restantes correspondem a rearranjos cromossómicos [Beysen *et al*, 2005, 2008]. Há ainda evidência de variabilidade fenotípica intra e interfamiliar causadas pela mesma mutação, facto importante no aconselhamento genético em idade fértil, na medida em que permite considerar a

severidade das manifestações num descendente afectado [De Baere *et al*, 2003] e avaliar a probabilidade de a mulher ser infértil [Jones CA, 1984]. Contudo, os testes moleculares devem ser usados com precaução como avaliadores isolados do risco de IOP [De Baere *et al*, 2003].

O tratamento baseia-se na correcção de erros refractivos associada a uma intervenção cirúrgica precoce, permitindo uma optimização da performance visual e melhoria anatomo-funcional, devendo ser realizada de preferência entre os 3 a 5 anos de idade, uma vez que diminui a discriminação social na escola, ainda que os resultados sejam mais favoráveis em adultos [Johnson CC, 1956, 1964].

Neste artigo propomo-nos a relatar pela primeira vez, um estudo realizado a famílias portuguesas com ambos tipos de BPES, caracterizar as alterações no gene *FOXL2*, correlacionar genótipo-fenótipo e com isto, avaliar factos e apresentar resultados de uma população ainda não estudada, comparando-os com os resultados da literatura Internacional.

MÉTODOS

1) CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE CADA CASO CLÍNICO

Os doentes foram observados no Centro de Excelência de Doenças Hereditárias Oculares do Serviço de Oftalmologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra. Tratam-se de propósitos de ambos sexos que apresentam um fenótipo compatível com Síndrome de

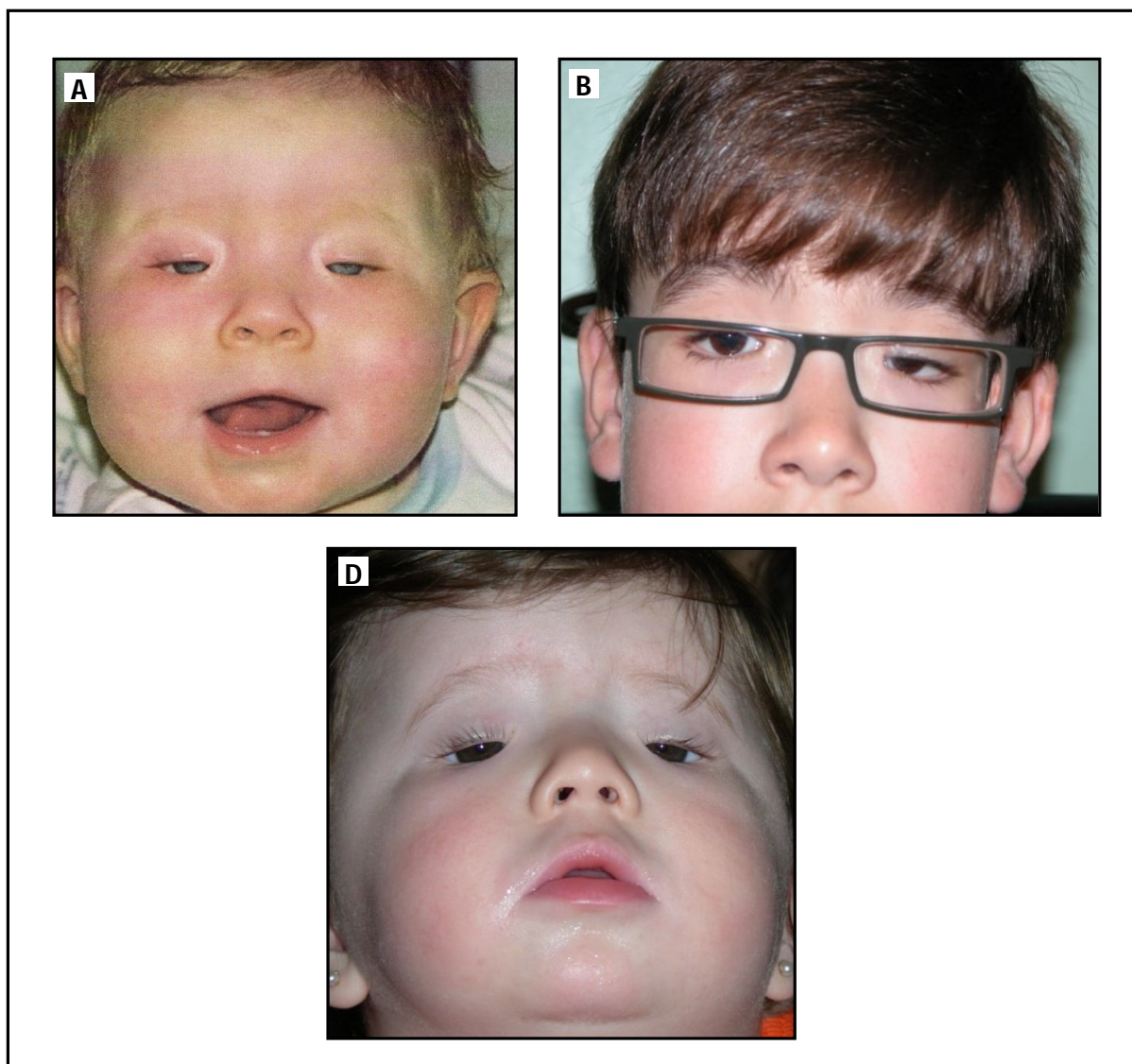


FIGURA 1 – Fotografia de 3 dos doentes, com fenótipo típico de BPES.

Blefarofimose, ptose, epicantus inversus, cujas principais características estão descritas na tabela I.

Todos os doentes foram submetidos a um exame oftalmológico completo que incluiu a determinação da acuidade visual, refração após cicloplegia, exame externo com avaliação de postura compensatória da cabeça, avaliação dos movimentos oculares, estudo sensório-motor, biomicroscopia do segmento anterior e fundoscopia. Foram feitas duas colheitas de

sangue periférico para dois tubos, um com heparina para testes citogenéticos e outro com EDTA para extracção de ADN.

Tratando-se de menores, as respectivas famílias dos propósitos deram consentimento escrito informado, de acordo com a Declaração de Helsínquia e *guidelines* institucionais definidas pelo comité ético dos Hospitais da Universidade de Coimbra.

2) CARIÓTIPO E SONDAS SUB-TELOMÈRICAS

Foram realizados estudos citogenéticos em cromossomas derivados de células sanguíneas periféricas. As preparações cromossómicas e respectivas bandas GTG, CBG e Ag-NOR foram obtidas de acordo com as técnicas *standard* (Rooney e Czepulkowski, 1992). Os estudos citogenéticos foram realizados no Laboratório de Citogenética da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

3) ANÁLISE MUTACIONAL DO GENE *FOXL2*

Foi amplificado o exão codificante do gene *FOXL2*, incluindo as sequências flanqueadoras intrónicas, do ADN genómico que foi isolado usando cromatografia fina (Qiagen). Levou-se a cabo uma amplificação por PCR usando ADN polimerase *Herculase* e um *perfect match PCR enhancer* (Stratagene) num termociclador PTC-100 (MJ Research). O passo inicial consistiu na desnaturação de DNA a 98 °C durante 3 minutos, seguido de 40 ciclos de amplificação (1min a 98 °C; 1min a 50 °C; 1min/kb a 72 °C) e uma extensão final a 72 °C, durante 10min. Os produtos da PCR foram sequenciados usando o kit rápido de reacção – *dGTP BigDye Terminator (PE Applied Biosystems)* – num sequenciador automático

ABI 377 Prism (*PE Applied Biosystems*) e os dados foram analisados usando o *ABI Prism Sequencing Analysis 3.0* e o programa *Sequencher 4.1 (Gene codes)*.

O trabalho de sequenciação do gene *FOXL2* foi realizado em colaboração com os laboratórios de Genética Humana da Universidade de Ghent, Bélgica, após estabelecimento de protocolo de colaboração de investigação científica.

RESULTADOS

A tabela I descreve de forma sumariada os principais achados fenotípicos resultantes do exame oftalmológico dos doentes; a tabela II associa aspectos fenotípicos aos resultados citogenéticos e moleculares.

Dos 6 doentes analisados neste estudo com fenótipo característico de BPES, foram detectadas 5 mutações, duas delas no mesmo indivíduo (B); É importante referir o aparecimento de 5 mutações *de novo* nos indivíduos estudados, dado que em nenhum dos casos há fenótipo familiar de BPES. Apenas do indivíduo (B), foi detectada uma mutação que segrega de forma autossómica dominante na respectiva família.

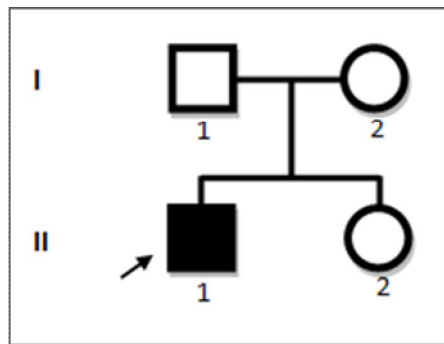


FIGURA 2 – Heredograma de A.

ID	AV OD	AV OE	BPES	REF	PAC	AL	BIO	FO
A	0,7	0,8	Típico B,P,EI,T	+7,5 ODE	Elev. queixo, hiperacção frontal, sem função EPS	Ortoforico pos cir endo refrac	N	N
B	1,0	0,7	Típico, B, P, EI, T	+1,25x90 OD OE -5,00+0,75x90 OE	Elev. queixo, hiperacção frontal, sem função EPS	Endotropia não alt, hipotropia	N	N
C	1,0	1,0	Leve, P, EI	emetropia	Elev. queixo	Ortofórico	N	N
D	CSM*	CSM*	Típico, B, P, EI, T	+2,00 ODE	Elev. queixo, hiperacção frontal, sem função EPS	Ortofórico	N	N
E	0,8	0,8	Típico, B, P, EI, T	emetropia	Elev. queixo, hiperacção frontal, sem função EPS	Ortofórico	N	N
F	0,8	0,8	Típico, B, P, EI, T	+3,00 ODE	Elev. queixo, hiperacção frontal, sem função EPS	Ortofórico	N	N

TABELA I – Exame oftalmológico dos propósitos. AV – acuidade visual; OD – olho direito; OE – olho esquerdo; REF – refração; PAC – postura anómala da cabeça; AL – alinhamento; BIO – avaliação segmento anterior; FO – fundo ocular; CSM - central, steady, maintained OU; ODE – ambos olhos; B – blefarofimose; P – ptose; EI – epicanthus inverso; T – telecanthus; EPS – elevador da pálpebra superior; N – normal.

ID	ESTATUS	IDADE	FACIES	SISTÉMICO	CITOGENÉTICA	MUTAÇÃO	PROTEÍNA	HEREDITARIEDADE
A	Aff	8	Típico	N	-	c.672_701dup	p.A224_A234dup	De novo
B	Aff	10	Típico	-	-	c.233C>T c.191C>T	p.Ser78Phe p.Ala64Gly	AD
C	Aff	9	Leve	-	-	Sem mutações. Sem deleções parciais ou totais.	-	De novo
D	Aff	4	Típico	Pequena estatura, atraso leve.	Rearranjo complexo *			De novo
E	Aff	8	Típico	-	-	c.528C>A	p.Cys176X	De novo
F	Aff	10	Típico	-	-	c.855_871dup17	p.His291fs	De novo

* 46,XX,ins(15;14)(q24;q11.2q13.1)t(3;15)(q23;q24).ish der(3)t(3;15)(wcp15+),der(15)ins(15;14)t(3;15)(wcp3+,wcp14+)

TABELA II – Achados fenotípicos e respectivas alterações moleculares e citogenéticas. ID – identificação; Aff – afectado; N – normal; dup – duplicação; fs – *frameshift*; AD – autossómica dominante.

A - Indivíduo do sexo masculino com 8 anos de idade, primeiro descendente de pais saudáveis, apresenta fenótipo característico de BPES (blefarofimose, ptose, epicantus inversus e telecantus). Após o estudo citogenético e avaliação oftalmológica, detectou-se uma mutação *de novo* no gene *FOXL2* que resultou numa duplicação do cDNA desde a base 672 até à 701, levando à síntese de uma proteína *FOXL2* alongada e disfuncional, com uma região de aminoácidos duplicada.

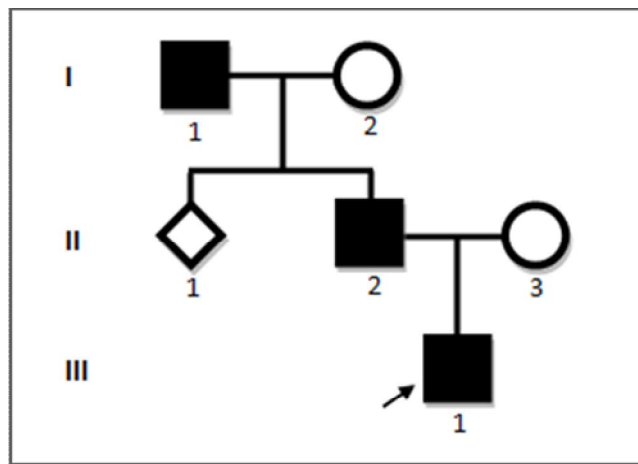


FIGURA 3 – Heredograma de B.

B - Doente do sexo masculino, de 10 anos de idade, terceira geração de indivíduos afectados (o pai e o avô paterno), consequência de uma mutação segregada de forma autossómica dominante e responsável pela clínica de BPES (blefarofimose, ptose, epicantus inversus e telecantus). O estudo molecular permitiu detectar duas mutações nunca identificadas nem relatadas até a data. Tratam-se de mutações "*missense*" resultantes de uma transição na base 191 e na base 233, resultando na substituição de uma alanina por uma glicina na posição 64 e de uma serina por uma fenilalanina na posição 78, respectivamente.

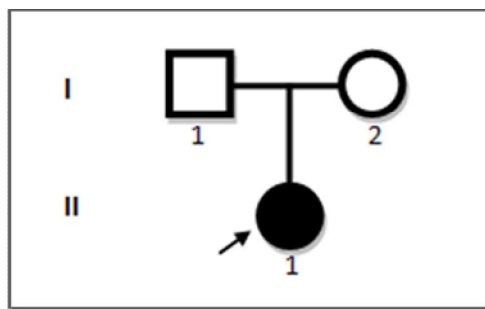


FIGURA 4 – Heredograma de C.

C - Doente do sexo feminino, com 9 anos de idade, descende de progenitores saudáveis e sem história familiar. Apresenta expressão fenotípica leve (com ptose e epicanthus inversus) sugestivo de BPES. Após o estudo molecular e citogenético não se evidenciou qualquer tipo de mutação nem deleção total ou parcial do gene *FOXL2*.

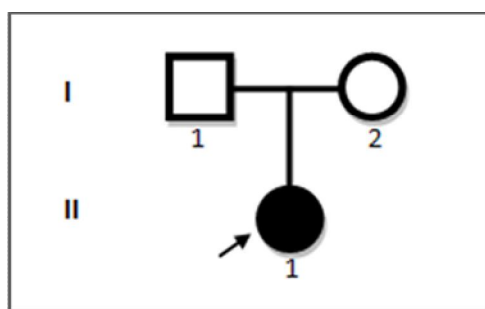


FIGURA 5 – Heredograma de D.

D - Doente de 4 anos de idade, do sexo feminino, filha de pais saudáveis apresenta clinicamente fenótipo muito sugestivo de BPES. O estudo citogenético revelou um rearranjo complexo *de novo*, $46,XX,ins(15;14)(q24;q11.2q13.1)t(3;15)(q23;q24).ishder(3)t(3;15)(wcp15+), der(15)ins(15;14) t(3;15)(wcp3+,wcp14+)$ do gene *FOXL2* (tabela 2).

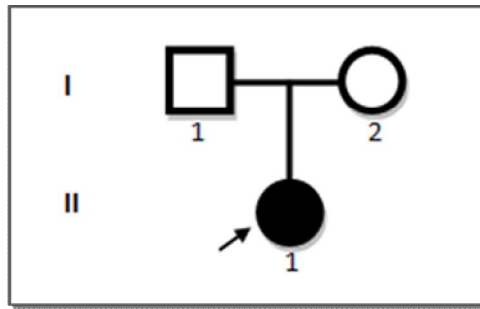


FIGURA 6 – Heredograma de E.

E - Doente do sexo feminino, de 8 anos de idade, descendente de uma família sem antecedentes de BPES, apresentava facies típica compatível com a síndrome em estudo. Após a análise molecular, foi detectada uma mutação “*nonsense*” *de novo* resultante de uma transversão (substituição de uma citosina por uma adenina) na posição 528 resultando num codão de *Stop*.

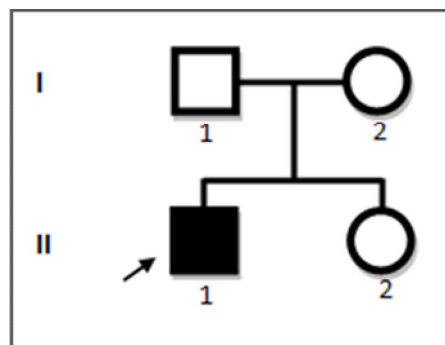


FIGURA 7 – Heredograma de F.

F - Indivíduo do sexo masculino, de 10 anos de idade, primeiro descendente de progenitores saudáveis e irmão de um indivíduo do sexo feminino também saudável. É o primeiro membro da família com características clínicas compatíveis com BPES. O estudo molecular efectuado detectou uma duplicação a nível do cDNA do segmento compreendido entre as bases 855 e 871, resultando numa alteração do ponto de leitura com conseqüente tradução de uma proteína alterada e disfuncional.

Na Figura 8 são apresentadas as alterações moleculares detectadas neste estudo.

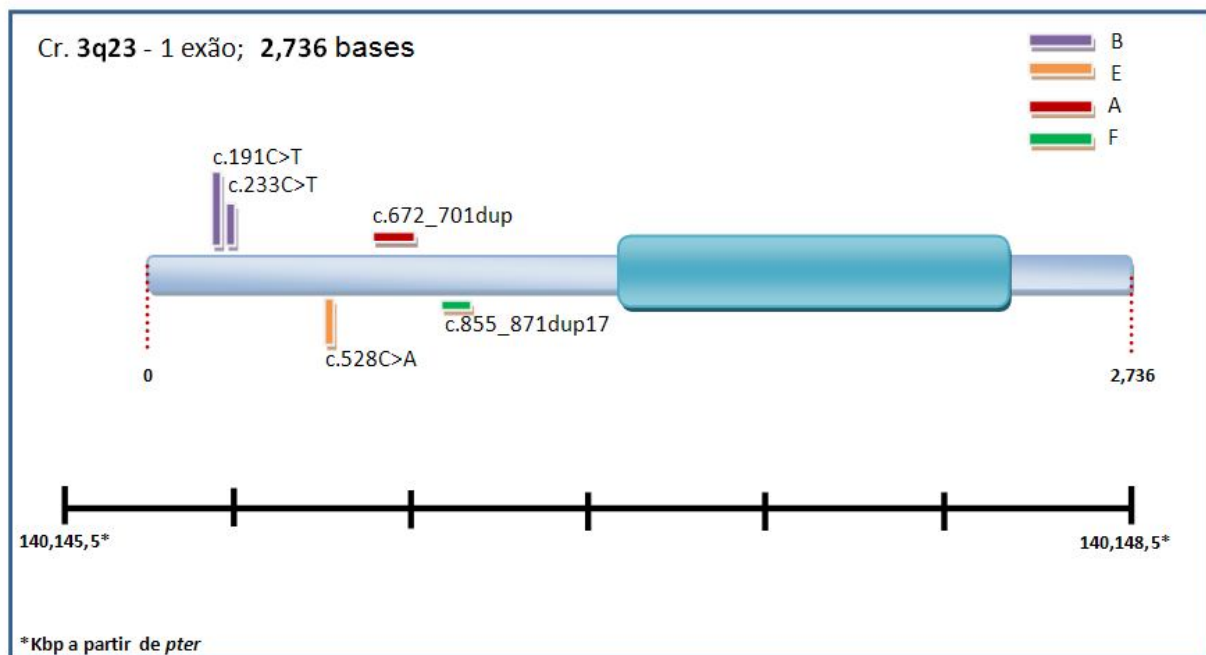


FIGURA 8 – Esquema do gene *FOXL2* – domínio *forkhead* – e localização das mutações identificadas nos respectivos propósitos.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Desde 2001 estão identificadas alterações do gene *FOXL2* que resultam em proteínas disfuncionais e que se associam aos fenótipos de BPES tipo I e tipo II [Crisponi *et al.* 2001]. Em Portugal, o estudo e correlação genótipo-fenótipo nunca foi realizado e é através da interpretação dos resultados do mesmo que nos é permitido concluir determinados aspectos importantes para o delineamento e compreensão da BPES e determinar qual a atitude a ser tomada perante casos de BPES confirmados pela citogenética e estudo molecular.

De um modo geral, é importante tentar estabelecer uma correlação genótipo-fenótipo, mas curiosamente, apesar de alterações no gene *FOXL2* estarem relacionadas com fenótipo palpebral, é impossível correlacionar directamente de uma forma exacta, o tipo de

mutações com as manifestações clínicas oculares. Um estudo identificou uma alteração genética em FOXL2 associada a BPES mais síndrome de Duane, por isso a análise isolada das variações genéticas deve ser realizada com precaução [Vincent AL, 2005]. Por outro lado, mutações relativas a duplicações, regra geral não implicam alterações da fertilidade (BPES tipo II) e que contrariamente, codões de *stop* podem estar associadas a insuficiência ovárica prematura (IOP) (BPES tipo I), situação que ocorre com a doente E, de 8 anos de idade. Neste caso, a análise molecular permitiu suspeitar tratar-se de um caso de BPES tipo I, sendo de particular importância informar os progenitores acerca deste facto, de forma a se poder reencaminhar a doente para serviços especializados de ginecologia e endocrinologia, para proporcionar um *follow up* adequado. A identificação atempada deste sub-tipo de BPES permite colocar à disposição da doente alternativas específicas de preservação de fertilidade, como a criopreservação do ovário. Caso se trate de BPES tipo II, que não cursa com infertilidade feminina, os progenitores, devem ter também à sua disposição o aconselhamento genético, caso seja de sua vontade ter mais descendentes, para saber quais as probabilidades de terem mais um filho afectado. Para os indivíduos afectados, embora que *“de novo”*, devem também ter conhecimento da probabilidade de transmitirem a afecção ao seus descendentes, dado o carácter de transmissão hereditária ser autossómica dominante, deixando em aberto a possibilidade de recorrer a diagnóstico pré-implantatório ou pré-natal.

Assim sendo e de uma forma mais específica, este estudo foi importante na medida em que foram identificadas, duas mutações nunca anteriormente relatadas noutros estudos (c.233C>T e c.191C>T). A coexistência de duas mutações num mesmo indivíduo exige a

análise segregacional para excluir uma possibilidade de doença autossómica recessiva, se estas alterações genéticas estiverem em *trans*.

Num dos doentes (C), apesar de ter manifestações leves da síndrome em questão, não foram encontradas quaisquer tipos de alterações a nível do gene *FOXL2*, o que nos permite afirmar que não se trata de um caso de BPES, apesar do fenótipo sugestivo.

Existem estudos que afirmam que certas alterações genéticas tem maior predisposição de se encontrem associadas a outro tipo de manifestações extra-oculares, como por exemplo atraso psicomotor, microcefalia e características esqueléticas subtis. Neste estudo, foi encontrado um caso (D) de rearranjo complexo que pode estar também ele associado a este tipo de manifestações extra-oculares, exigindo uma avaliação multidisciplinar adequada. Um estudo em *microarray* CGH poderá esclarecer de forma definitiva se existe perda de material genético caracteristicamente associado a estes achados.

Como conclusão pode-se reter a ideia de que a síndrome de Blefarofimose, ptose e epicanthus inversus, é uma afectação autossómica dominante e que nos 6 indivíduos estudados 66,7% se tratavam de mutações *de novo*, facto que é concordante com a bibliografia analisada [Jones and Collin, 1984] que admite que em 50% dos casos as mutações são *de novo*.

De salientar que 5 dos doentes deste estudo foram submetidos a cirurgia precoce (plastias palpebrais), ainda que na literatura seja referido que são claramente mais favoráveis se realizadas em idade mais avançada. Em todos os casos houve melhoria da situação clínica, com atenuação da postura compensatória já referida (queixo elevado, com contracção do músculo frontal e de cabeça inclinada para trás), aspecto essencial que

contorna directamente vários problemas destas crianças, nomeadamente a ambliopia de privação e aspectos relacionados com a discriminação por parte dos colegas na escola.

A longo prazo, considera-se que a detecção precoce desta síndrome, pode por um lado comprometer e até mesmo “rotular” um doente como portador de uma afecção rara, pouco conhecida pela população em geral, tornando-se facilmente alvo de preconceitos. Por outro lado, conhecendo-se a forma de expressão fenotípica desde já bem estabelecida com quatro características *major* (blefarofimose, ptose, epicanthus inversus e telecantus) e características desta síndrome, é possível tranquilizar a família com factos objectivos, disponibilizar a terapêutica cirúrgica e seguimento especializado que não só melhoram a situação actual como também permitem fazer uma projecção a longo prazo das consequências tendo em vista minimizá-las o máximo possível, sejam elas a insuficiência ovárica precoce (IOP), diagnóstico pré-natal e diagnóstico pré-implantatório.

Assim, é de inegável importância a realização de estudo molecular em doentes com fenótipo sugestivo/característico de BPES, uma vez que através dele é-nos permitido actuar de forma activa e responsável, melhorando significativamente a integração social e familiar mas tendo sempre como primeira consideração o bem estar do doente. Em última análise procura-se, mesmo que com várias condicionantes associadas à síndrome, atingir o melhor estado de saúde do doente, que foi como sabemos desde sempre a pedra angular da actuação médica e de grosso modo, de todos os profissionais de saúde.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer com o meu profundo e mais sincero reconhecimento:

- às famílias dos casos aqui apresentados, pela confiança depositada e por partilharem o mesmo entusiasmo pela investigação.
- à Dra. Helena por se ter mostrado tão acessível.
- ao Professor Doutor Eduardo Silva por não ter sido só um orientador, mas um amigo, brilhante e sempre disposto a ajudar.

BIBLIOGRAFIA

- Beysen D, Vandesompele J, Messiaen L, *et al* (2004) The Human *FOXL2* Mutation Database. *Hum Mutat* 24:189-193.
- Beysen D, Raes J, Leroy BP, *et al* (2005) Deletions involving long-range conserved nongenic sequences upstream and downstream of *FOXL2* as a novel disease-causing mechanism in blepharophimosis syndrome. *Am J Hum Genet* 77(2):205–218.
- Beysen D, De Jaegere S, Amor D, *et al* (2008) Identification of 34 Novel and 56 Known *FOXL2* Mutations in patients with blepharophimosis syndrome, *Hum Mutat*, #1023, 29:E205-E219 (Online).

- Beysen D, Moumné L, Veitia R, *et al* (2008) Missense mutations in the forkhead domain of *FOXL2* lead to subcellular mislocalization, protein aggregation and impaired transactivation, *Hum Mol Genet* 17;13: 2030–2038.
- Crisponi L, Deiana M, Loi A, *et al* (2001) The putative forkhead transcription factor *FOXL2* is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nat Genet* 27: 159-166.
- De Baere E, Dixon MJ, Small KW, *et al* (2001) Spectrum of *FOXL2* gene mutations in Blepharophimosis-Ptosis-Epicanthus Inversus (BPES) families demonstrates a genotype-phenotype correlation. *Hum Mol Genet* 10;15: 1591- 1600.
- De Baere E, Beysen D, Oley C, *et al* (2003), *FOXL2* and BPES: Mutational Hotspots, Phenotypic Variability, and Revision of the Genotype-Phenotype Correlation, *Hum Genet* 72:478–487
- Johnson CC.(1956) Operations for epicanthus and blepharophimosis. *Am J Ophthalmol* 41:71-9.
- Johnson CC, (1964), Surgical repair of the syndrome of epicanthus inversus, blepharophimosis and ptosis. *Arch Ophthalmol* 71:510-6.

- Jones CA, Collin JR, (1984), Blepharophimosis and its association with female infertility. *Br J Ophthalmol* 68:533–534.
- Nallathambi J, Moumne L, De Baere E, *et al* (2007) A novel polyalanine expansion in FOXL2: the first evidence for a recessive form of the blepharophimosis syndrome (BPES) associated with ovarian dysfunction, *Hum Genet* 121:107–112.
- Oley C, Baraitser M, (1988) Blepharophimosis, ptosis, epicanthus inversus syndrome (BPES syndrome), *J Med Genet* 25: 47-51.
- Prueitt RL, Zinn AR, (2001) A fork in the road to fertility, *Nat Genet* 27: 132-134.
- Temple I K, Baraitser M, (1989) Pitfalls in counselling of the blepharophimosis, ptosis, epicanthus inversus syndrome (BPES), *J Med Genet* 26: 517-519.
- Townes PL, Muechler EK, (1979) Blepharofimosis, ptosis, epicanthus inversus and primary amenorrhea. *Arch Ophthalmol* 97:1664-6.
- Udar N, Yellore V, Chalukya M, *et al* (2003) Comparative Analysis of the FOXL2 Gene and Characterization of Mutations in BPES Patients, *Hum Mutat* 22:222-228.
- Uhlenhaut N H, Treier M, (2006) FOXL2 function in ovarian development. *Mol Genet Metab* 88:225–234.

- Vincent, A. L.; Watkins, W. J.; Sloan, B. H.; Shelling, A. N. (2005) Blepharophimosis and bilateral Duane syndrome associated with a *FOXL2* mutation. Clin Genet 68: 520-523.
- Waardenburg PG, Franceschetti A, Klein D, (1961) Genetics and Ophthalmology. Oxford, Blackwell, pp. 415-441.
- Zlotogora J, Sagi M, Cohen T, (1983) The Blepharophimosis, Ptosis, and Epicanthus Inversus Syndrome: Delineation of Two Types. Am J Hum Genet 35:1020-1027.