



**FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA**

**TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO  
GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO  
INTEGRADO EM MEDICINA**

**FILIFE JOÃO SANTOS ESTRELA**

***CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA E GENÓMICA  
DE PACIENTES COM MAC (MICROFTALMIA,  
ANOFTALMIA E COLOBOMA)***

**ARTIGO CIENTÍFICO**

**ÁREA CIENTÍFICA DE BIOMEDICINA: BIOLOGIA MOLECULAR,  
CITOGENÉTICA E GENÓMICA**

**TRABALHO REALIZADO SOB A ORIENTAÇÃO DE:  
PROFESSORA DOUTORA ISABEL MARIA MARQUES CARREIRA**

**FEVEREIRO/2012**

***CARACTERIZAÇÃO CITOGÉNÉTICA E GENÓMICA DE PACIENTES  
COM MAC (MICROFTALMIA, ANOFTALMIA E COLOBOMA)***

**Filipe João Santos Estrela**

Mestrando da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

**Isabel Maria Marques Carreira, Professora Auxiliar com Agregação**

Regente das Unidades Curriculares de Biologia Molecular e Celular I e II da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e Diretora do Laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Laboratório de Citogenética e Genómica,

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal

E-mail: [filipestrela9@gmail.com](mailto:filipestrela9@gmail.com)

# ***CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA E GENÓMICA DE PACIENTES COM MAC (MICROFTALMIA, ANOFTALMIA E COLOBOMA)***

## **RESUMO**

MAC resume um conjunto de malformações congénitas do olho (microftalmia, anoftalmia e coloboma), responsáveis por uma importante percentagem de perturbações visuais nas crianças. Resulta de alterações nos processos da embriogénese e crescimento do olho, sendo comum uma clínica em que ocorram concomitantemente alterações não-oculares, num contexto sindrómico. A grande variabilidade fenotípica associada à não identificação de alterações genómicas em muitos casos afigura-se como barreira a um aconselhamento genético adequado. Embora vários genes tenham já sido identificados como estando na origem da MAC (*SOX2*, *PAX6*, *SHH*, entre outros), transparece uma necessidade em procurar novas explicações genéticas, não só para a MAC, mas também para as interações génicas envolvidas na formação do olho. Foram estudados 5 pacientes com idades compreendidas entre os 2 e 9 anos e diagnóstico de MAC, com vista à pesquisa de novas regiões genómicas possivelmente associadas a esta entidade, recorrendo para tal às técnicas de citogenética convencional, citogenética molecular (FISH) e oligoarray-CGH. Foram encontrados desequilíbrios genómicos significativos em 2 dos 5 pacientes. Nos restantes pacientes, os desequilíbrios genómicos detetados foram considerados variantes benignas e desprovidas de impacto fenotípico. A paciente 1 apresentava uma deleção em 2q21.3 (160Kb), que incluía 1 gene relevante: *RAB3GAPI*. A paciente 2 revelou uma deleção em 12p13.32p13.33 (cerca de 3.9Mb), de onde sobressaíram os genes *TULP3*, *KDM5A*, *WNT5B*, *PRMT8*, *CACNA2D4* e *IQSEC3*, acompanhada por uma duplicação em 15q26.2q26.3 (cerca de 5Mb), de onde se destacaram os genes *ADAMTS17* e *ALDH1A3*. Na paciente 1, embora seja conhecida a associação do *RAB3GAPI* com MAC, salienta-se a necessidade verificada em prosseguir o

estudo da mesma com sequenciação e melhor caracterização clínica, visto poder tratar-se de um primeiro caso em que alterações do *RAB3GAP1* originam um possível *Martsolf Syndrome*, apoiando a noção de um hipotético “*Warburg-Martsolf Syndrome*”.

**PALAVRAS-CHAVE:** MAC, Microftalmia, Anoftalmia, Coloboma, Olho, Embriogénese, Gene, Deleção, Duplicação, Oligoarray-CGH.

# ***CYTOGENETIC AND GENOMIC CHARACTERIZATION OF PATIENTS WITH MAC (MICROPTHALMIA, ANOPHTHALMIA AND COLOBOMA)***

## **ABSTRACT**

MAC consists of a group of congenital malformations (microphthalmia, anophthalmia and coloboma) responsible for an important number of visual impairment cases in children. MAC results from defects occurring during the embryological development stages and growth of the eye. It is also common the simultaneous presence of non-ocular signs and/or symptoms. The large phenotypic variability, associated with the incapability of identifying genomic aberrations in many cases, makes genetic counseling difficult. Although several genes have already been identified as causative of MAC (*SOX2*, *PAX6*, *SHH*, amongst others), the need to find improved genetic explanations for the genesis of MAC and the genetic interactions that underlie the eye's embryogenesis, is ever so present. Five patients with MAC and with ages between 2 and 9 were studied using conventional cytogenetic techniques, FISH and oligoarray-CGH, with the aim to search for novel genomic regions possibly correlated to that pathological entity. We found relevant genomic imbalances in 2 of our patients. The other 3 patients had genomic imbalances, but those were normal variations without phenotypic impact. Patient 1 presented a deletion at 2q21.3 (160Kb), which included 1 relevant gene: *RAB3GAP1*. Patient 2 revealed a deletion at 12p13.32p13.33 (around 3.9Mb), within which our attention was drawn to the genes *TULP3*, *KDM5A*, *WNT5B*, *PRMT8*, *CACNA2D4* and *IQSEC3*. This patient also had a duplication of 15q26.2q26.3 (around 5Mb), within which the genes *ADAMTS17* and *ALDH1A3* stood out. It is of interest to continue the study of patient 1 with genetic sequencing and clinical characterization, since there is a possibility that this patient could be the first one to be reported with a *RAB3GAP1* mutation causing a *Martsolf Syndrome*, therefore supporting the concept of a hypothetical "Warburg-Martsolf Syndrome".

**KEYWORDS:** MAC, Microphthalmia, Anophthalmia, Coloboma, Eye, Embryogenesis, Gene, Deletion, Duplication, Oligoarray-CGH

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ADPM** – atraso de desenvolvimento psicomotor

**AN** – anoftalmia

**BM** – biomicroscopia

**CGH** – *Comparative Genomic Hybridization*

**CMD-A1** – distrofia muscular congénita tipo A1

**CNVs** – *copy number variations*

**CO** – coloboma

**Cy3** – *cyanine 3-dUTP*

**Cy5** – *cyanine 5-dUTP*

**DECIPHER** – *Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources*

**del** – deleção

**der** – cromossoma derivado

**DNA** – DNA genómico

**dup** – duplicação

**EDTA** – ácido etilenodiaminotetracético

**EPR** – epitélio pigmentar retiniano

**ERG** – eletrorretinografia

**FC** – fundoscopia

**FISH** – *Fluorescence in situ Hybridization*

**GTG** - *G-banding with trypsin-Giemsa*

**Hh** – via de sinalização celular *Hedgehog*

**ISCN** – *International System for Human Cytogenetic Nomenclature*

**Kb** – kilobases

**MAC** – microftalmia, anoftalmia, coloboma

**MI** – microftalmia

**MS** – síndrome *Martsof*

**OMIM** - *Online Mendelian Inheritance in Man*

**OS** – síndrome *overgrowth*

**p** – braço curto do cromossoma

**pb** – pares de bases

**PEV** – potenciais visuais evocados

**PNR** – pacientes não relacionados

**q** – braço longo do cromossoma

**RMN-CE** – ressonância magnética crânio-encefálica

**SNPs** – *single nucleotide polymorphisms*

**ter** – terminal

**UCSC** – *University of California Santa Cruz*

**WMLS** – síndrome *Weill-Marchesani-like*

**WMS1** – síndrome *Warburg Micro 1*

# ÍNDICE

<b>Introdução</b>	1
<b>Materiais e Métodos</b>	4
<i>Casos</i>	4
<i>Obtenção de DNA genómico</i>	4
<i>Cariograma</i>	5
<i>Oligoarray-CGH</i>	5
<i>FISH</i>	6
<b>Resultados</b>	7
<i>Análise Citogenética</i>	8
<i>Análise por oligoarray-CGH</i>	8
<i>Análise por FISH</i>	9
<b>Discussão</b>	10
<b>Anexos</b>	18
<b>Agradecimentos</b>	21
<b>Referências</b>	22

## INTRODUÇÃO

A Microftalmia (MI), a Anoftalmia (AN) e o Coloboma (CO) – MAC no seu conjunto – são um conjunto de malformações congénitas do olho responsáveis por uma importante percentagem de anomalias visuais nas crianças. A prevalência de MI/AN em Portugal (2005-2009) rondou os 7.3/100.000 nados-vivos, segundo dados da *EUROCAT* (<http://www.eurocat-network.eu/ACCESSPREVALENCEDATA/PrevalenceTables>). Existe, contudo, grande variabilidade mundial, com valores de prevalência desde os 19/100.000 nados-vivos, na Escócia (Morrison et al., 2002), aos 59/100.000 nados-vivos, em Estrasburgo (Stoll et al., 1992). Não são encontradas diferenças na distribuição por sexo (Källén et al., 1996).

A MAC resulta de anomalias na embriogénese e crescimento do olho. A degenerescência ou falha na formação das vesículas ópticas está na base da AN (Verma e Fitzpatrick, 2007). Já um desenvolvimento anómalo do globo ocular (p.ex. produção anormal de fatores de crescimento, baixa pressão intraocular, dimensões reduzidas do cálice óptico) traduz-se em MI. O não encerramento da fissura óptica ectodérmica, embora não reúna consenso, parece ser a causa do fenótipo colobomatoso (Warburg, 1993).

Clinicamente, a AN define-se como ausência de tecido ocular (tipicamente bilateral). Considera-se MI quando o comprimento axial total (segmentos anterior e posterior) do olho for inferior a dois desvios padrão do comprimento adequado à idade (< 21mm, no adulto (Bardakjian et al., 1993)), tendo a complexidade fenotípica da MI levado à organização da mesma em 2 grandes grupos: total e parcial. Embora a presença duma fenda no quadrante ínfero-nasal da íris seja a manifestação mais comum, a clínica do CO pode chegar à cegueira por acometimento corio-retiniano ou do nervo óptico, quando a agressão à embriogénese ocular ocorrer precocemente (Gregory-Evans et al., 2004). O CO ocorre frequentemente no contexto de MI (Warburg, 1993).

Embora surjam isoladamente, é comum a associação a manifestações extraoculares, num contexto sindrómico em cerca 1/3 dos casos (Verma e Fitzpatrick, 2007). Entre as manifestações extraoculares mais comuns apontam-se anomalias craniofaciais (p.ex. fenda palatina), defeitos do tubo neural, atrasos de desenvolvimento psico-motor (ADPM), problemas cardíacos, atresias esofágicas e malformações génito-urinárias (Källén et al., 1996; Williamson et al., 2006; Makhoul et al., 2007)

A etiologia da MAC é complexa e ainda não muito bem esclarecida. São reconhecidas causas genéticas (alterações génicas e cromossómicas), mas também ambientais (na gravidez – infeções, défices de vitamina A, exposição a radiação ou talidomida), embora estas últimas tenham muito pouca representatividade na população atingida. Várias alterações cromossómicas e génicas (deleções, duplicações, translocações; mutações *de novo*) estão reportadas na literatura, servindo como exemplo as mutações associadas à MI e AN verificadas nos genes *SOX2*, *PAX6*, *OTX2*, *RAX* e *CHX10* (Verma e Fitzpatrick, 2007) e as relacionadas com o CO nos genes *SHH*, *PAX6*, *CHX10* e *MAF1* (Gregory-Evans et al., 2004). São pois genes que, direta ou indiretamente, intervêm na embriogénese e desenvolvimento oculares.

Estudos recentes sugerem novos genes ou então novas mutações em genes já reportados (Zhou et al., 2008). O *SOX2* é responsável por 10-20% dos casos de MI/AN (Fantes et al., 2003), sendo que uma mutação “*frameshift*” c.70del20 é a causa de 21% das mutações nesse gene (Reis et al., 2010). Já as mutações do *PAX6* são mais relevantes no CO, nomeadamente as “*missense*” com acometimento corio-retiniano (Gregory-Evans et al., 2004).

Apesar da multiplicidade de genes já reportada, a grande variabilidade fenotípica associada à não identificação de alterações genómicas em muitos casos de MAC apresentam-se como barreiras a um aconselhamento genético adequado. Releva-se assim a necessidade em procurar novas mutações e novos genes ou regiões genómicas que não só melhor

caracterizem a MAC, como também melhor esclareçam as interações génicas envolvidas na formação do olho.

Assim, este projeto teve por objetivo a realização de um estudo em 5 casos de MAC, visando a pesquisa de novas regiões genómicas possivelmente associadas a esta entidade, recorrendo para tal às técnicas de citogenética convencional, citogenética molecular (FISH) e oligoarray-CGH.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### ***Casos***

Foram estudados 5 pacientes que são acompanhados no serviço de Oftalmologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra. Todos são de nacionalidade Portuguesa, sendo 4 do sexo feminino e 1 do sexo masculino. As informações clínicas respetivas foram obtidas através da consulta dos processos clínicos hospitalares.

Para além da recolha dos fenótipos microftálmicos, anoftálmicos e/ou colobomatosos, foi prestada especial atenção à existência concomitante de outras anomalias oculares (p.ex. microcórnea) e extraoculares, visto ser frequente a ocorrência destas últimas em simultâneo com a MI (Lesnik Oberstein et al., 2006), AN (Makhoul et al., 2007) ou CO (Sanlaville e Verloes, 2007), num contexto sindrómico ou não. Toda essa informação, conjuntamente com os dados dos exames físico e oftalmológico, encontra-se organizada na Tabela I.

### ***Obtenção de DNA genómico (DNA)***

Foram colhidas amostras de sangue venoso periférico em EDTA e obtidos os consentimentos informados dos progenitores legais dos pacientes para a realização de estudos de carácter genético. O DNA foi extraído de acordo com as instruções do fabricante (*Jetquick blood and cell culture DNA MIDIPREP - Genomed GmbH, Löhne, Alemanha*), quantificado e o seu grau de pureza determinado (*NanoDrop1000 – Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA*).

### ***Cariograma***

Foi analisado o cariógrama com bandas GTG de alta resolução em 15 metafases, a partir das amostras de sangue periférico de todos os pacientes, respeitando as normas estabelecidas na *International System for Human Cytogenetic Nomenclature* (ISCN) (Shaffer et al., 2009) e de acordo com os protocolos estabelecidos no laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

### ***Oligoarray-CGH***

O *DNA* foi submetido a análise por oligoarray-CGH com slides de 4x180 K (*Agilent Technologies*, Santa Clara, Califórnia, EUA). Foram utilizadas lâminas com cerca de 180 000 sondas de 60 pares de bases cada e com um espaçamento médio de 17 Kb entre sondas.

Sumariamente, e para cada caso, foram respeitados os passos que se seguem, de acordo com o protocolo do fabricante (*Agilent Oligonucleotide Array-Based CGH for Genomic DNA Analysis*, versão 6.2.1 de Fevereiro de 2010). O *DNA* foi preparado de acordo com o método direto descrito no protocolo, sem o recurso à digestão por enzimas de restrição e com quantidades de *DNA* superiores a 500ng. O *DNA* de cada paciente foi marcado, simultaneamente e em separado, com os fluorocromos *Cyanine 3*-dUTP (Cy3; verde) e *Cyanine 5*-dUTP (Cy5; vermelho). A purificação do *DNA* marcado foi realizada utilizando colunas de filtragem *Amicon 30kDa* e a marcação quantificada com recurso a um espectrofotómetro *NanoDrop1000* (*Thermo Scientific*, Waltham, Massachusetts, EUA). Como controlo, recorreram-se a amostras de *DNA* de outros pacientes não relacionados para proceder a hibridização em *loop*, na qual cada paciente marcado com os dois fluorocromos é cruzado com outros dois pacientes não relacionados e marcados de modo inverso, tal como se representa em esquema na Figura 1. Após hibridização e lavagem, as lâminas foram examinadas com o recurso ao *Agilent C scanner*, processadas com o *Agilent Feature*

Extraction Software (versão 10.7) e analisadas no Agilent Genomic Workbench Software (versão 6.5) para detecção de desequilíbrios genómicos.

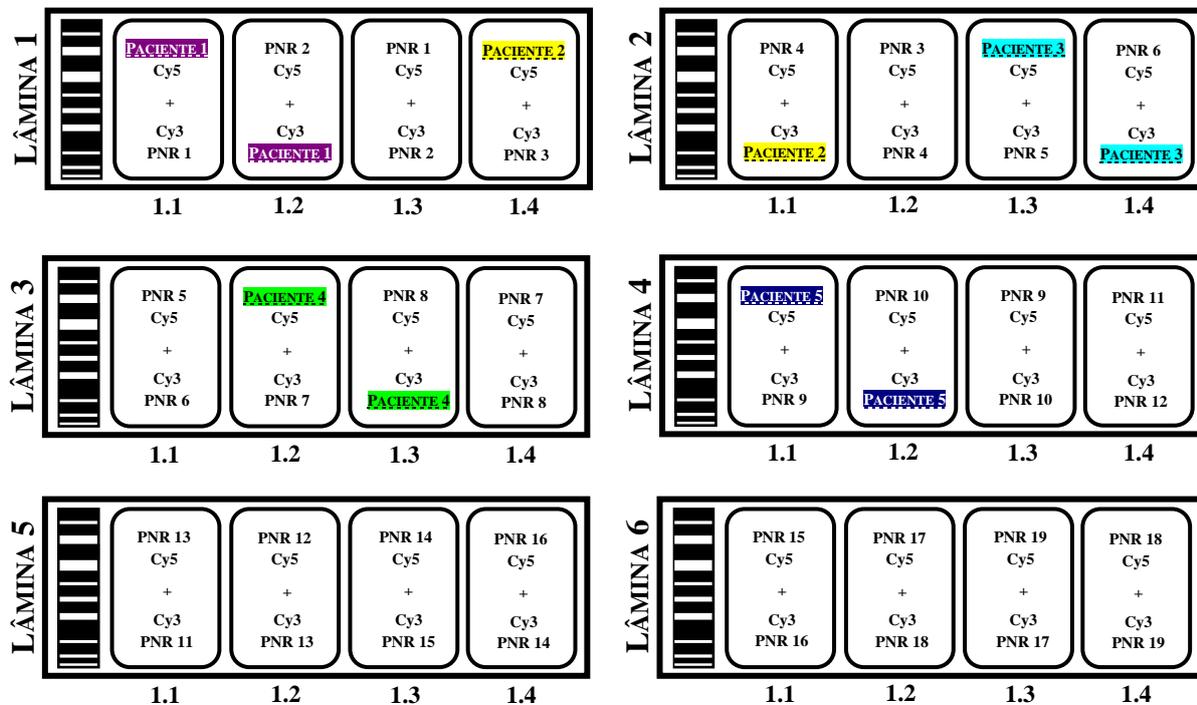


Fig. 1. Esquema representativo das combinações de amostras criadas para hibridização em *loop*, recorrendo a amostras de pacientes não relacionados (PNR), isto é, sem fenótipo MAC. As lâminas encontravam-se identificadas por códigos de barras próprios, aqui substituídos pela designação “Lâmina” seguida por um número. A numeração de cada área de 1.1 a 1.4 serviu pois como “coordenada” para a posterior localização dos nossos pacientes aquando da análise dos dados.

## FISH

A análise por FISH foi realizada com o recurso ao sistema *ToTelVysion* (*Vysis/Abbott Molecular*, Downers Grove, Illinois, EUA). Este sistema permite uma análise das regiões subteloméricas de todos os cromossomas num único ensaio de hibridização, recorrendo para tal a um painel com 15 misturas de sondas específicas e de controlo. Cada mistura encontra-se marcada com 3 fluorocromos, emitindo 4 sinais em cores diferentes (*SpectrumOrange* – vermelho; *SpectrumGreen* – verde; *SpectrumAqua* – azul; combinação do *SpectrumOrange* com o *SpectrumGreen* – amarelo).

## RESULTADOS

TABELA I. Características clínicas e exames físico e oftalmológico dos pacientes em estudo.

	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3	Paciente 4	Paciente 5	
<b>Idade (anos)</b>	2	4	2	7	9	
<b>Sexo</b>	♀	♀	♀	♀	♂	
<b>Microftalmia</b>	+ (B)	-	+ (OD)	+ (B) Grave	+ (OE)	
<b>Anoftalmia</b>	-	-	-	-	-	
<b>Coloboma</b>	-	+ (B)	+ (OD)* <sup>3</sup>	+ (B)	+ (B)	
<b>Outras alterações oculares</b>	Córnea	Microcórnea (B)	-	Microcórnea (OD)	Microcórnea (B)	
	Cristalino	Afaquia (catarata B operada)	Luxação inferior OD	Catarata (OD)	-	
	Leucomas	+ OE - às 10h	-	-	-	
	Estrabismo	-	+ OE (endotropia)	-	+ Grave	+ OE (endotropia)
	Nistagmo	-	+ Manifesto horizontal	-	+ Bloqueio em convergência	+ Manifesto horizontal
	Acuidade Visual	Fixa e segue ODE	Binocular (6m) 4/10 Perto (difícil) 20/200	OE (6m) 7/10	Fixa com OE	Fixa com OD
<b>Exames oftalmológicos</b>	BM	Sinéquias anteriores periféricas (B)	Coloboma inferior íris (B)	Coloboma inferior íris (OD)	Coloboma infero-nasal íris (B)	
FC	-Atrofia discreta difusa do EPR -E/D 0.2-0.3 -Disco rosado	-Coloboma corio-retiniano (B)* <sup>1</sup> -Retina periférica assente	Coloboma corio-retiniano (OD)* <sup>4</sup>	Coloboma corio-retiniano (B)* <sup>4</sup>	Coloboma corio-retiniano (B)* <sup>5</sup>	
<b>Alterações não-oculares</b>	Fácies	- Hipotelorismo	- Discreto hipertelorismo - Lábio superior fino - Filtro mal definido	-	-	
	ADPM	+ Grave	+ Discreto* <sup>2</sup>	+ Ligeiro	-	
	MC	+	-	-	-	
	Hipotonia axial	+	-	-	-	
	Refluxo VU	+	-	-	-	
	Outras alterações	+	-	Persistência canal arterial	-	Rins poliústicos

+ = alteração presente; - = sem alteração; ADPM = atraso de desenvolvimento psico-motor; B = bilateral; BM = biomicroscopia; D = direito; E = esquerdo; EPR = epitélio pigmentar retiniano; FC = fundoscopia; MC = microcefalia; OD = olho direito; OE = olho esquerdo; ODE = olho direito e esquerdo; VU= vesico-ureteral.

\*<sup>1</sup> Atingimento parcial da área macular, partindo do disco óptico; \*<sup>2</sup> Motricidade fina, marcha de base alargada; \*<sup>3</sup> Usa prótese de parede fina; \*<sup>4</sup> Atinge mácula no OD; \*<sup>5</sup> OE – envolve disco e centro da mácula; OD – mácula parcialmente atingida, sem envolvimento do disco.

### *Análise Citogenética*

Não foram detetadas quaisquer anomalias cromossômicas numéricas ou estruturais na análise dos cariogramas dos 5 casos em estudo (ver Tabela II).

### *Análise por oligoarray-CGH*

A análise por oligoarray-CGH mostrou que todos os pacientes apresentavam regiões com alteração de dosagem genômica. Assim, tendo em conta os objetivos deste estudo, foram escolhidos os desequilíbrios relevantes com base na riqueza da região alterada em *copy number variations* (CNVs) – por interpretação dos resultados obtidos na análise de oligoarray-CGH e consulta da base de dados *Database of Genomic Variants* (<http://projects.tcag.ca/variation/>) – e na existência ou não de genes envolvidos em processos fisiológicos e/ou patológicos do olho – através da consulta da base de dados *UCSC Human Genome Browser* (<http://genome.ucsc.edu>) (Kent et al., 2002), em 13 de Janeiro de 2012.

À luz dos critérios acima referidos, foram somente encontrados desequilíbrios genômicos significativos nos pacientes 1 e 2 (ver Anexos I, II e III). O tipo, localização, dimensão estimada e extensão daqueles é apresentado na Tabela II.

TABELA II. Alterações encontradas nos pacientes

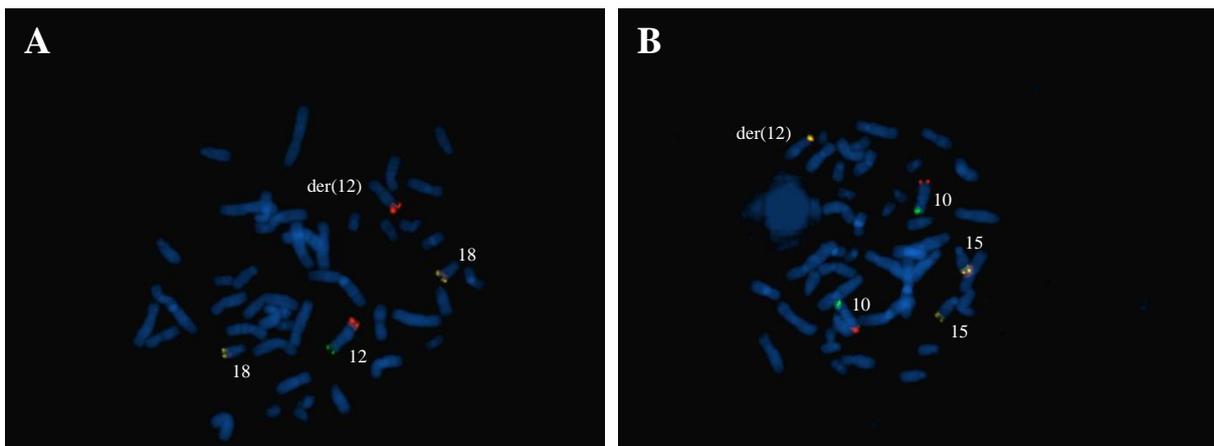
	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3	Paciente 4	Paciente 5		
<b>Cariograma</b>	46,XX	46,XX	46,XX	46,XX	46,XY		
<b>Análise FISH</b>	SN	(ver Figura 3)	SN	SN	SN		
<b>Alterações oligoarray-CGH</b>	Localização	2q21.3	12p13.32p13.33	15q26.2q26.3	-	-	-
	Tipo	Deleção	Deleção	Duplicação	-	-	-
	Início (pb)	135,910,526	194,249	97,457,409	-	-	-
	Fim (pb)	136,071,347	4,114,078	102,465,355	-	-	-
	Dimensão Estimada	160Kb	3,9Mb	5Mb	-	-	-

SN = sem necessidade de ser realizada; - = sem alterações significativas; pb = pares de bases.

Nos restantes pacientes, os desequilíbrios genômicos detetados foram considerados variantes benignas e desprovidas de impacto fenotípico devido à elevada frequência de CNVs reportadas na *Database of Genomic Variants* (<http://projects.tcag.ca/variation/>) (Miller et al., 2010).

### ***Análise por FISH***

A paciente 2 foi submetida a análise por FISH (ver Figura 2), que comprova o rearranjo cromossômico desequilibrado verificado por oligoarray-CGH. Os pais desta paciente também foram sujeitos a estudo por citogenética convencional e FISH, não revelando contudo qualquer tipo de alteração numérica ou estrutural (dados não apresentados).



**Fig. 2.** Resultados da análise por FISH da paciente 2. As imagens evidenciam um rearranjo subtelomérico envolvendo as regiões 12pter e 15qter. **(A)** *ToTelVysion Mix 12*. A sonda marcada a verde marca as regiões 12pter (*locus SP6*) e a sonda a vermelho marca as regiões 12qter (*locus VIIyRM2196*). A presença de apenas um sinal verde evidencia a deleção 12pter. Os sinais amarelos correspondem às regiões subteloméricas 18qter (*locus 18QTEL11*). **(B)** *ToTelVysion Mix 10*. A sonda marcada a verde marca as regiões 10pter (*locus 10p006*) e a sonda a vermelho marca as regiões 10qter (*locus D10S2490*). Os sinais amarelos correspondem às regiões subteloméricas 15qter (*locus D15S936*). Os 3 sinais amarelos demonstram a duplicação 15qter, translocada para a região terminal do braço curto do der(12).

## DISCUSSÃO

Numa primeira análise dos resultados, a ausência de desequilíbrios genómicos significativos em alguns dos casos (3 dos 5) limitou a pesquisa de potenciais novos genes associados à MAC. Todavia, isto vai ao encontro da noção vigente de que são expectáveis casos em que não se encontram alterações genéticas. Mesmo assim, levanta-se a questão: será que não existem mesmo alterações, ou o método utilizado não teve a resolução e/ou direccionalidade necessárias? Como sabemos, a técnica oligoarray-CGH pode deixar escapar alterações genéticas, como sejam os *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) que, alterando a sequência codificante do gene, podem modificar a estrutura da proteína sintetizada ao ponto de interferir com a sua função e originar fenótipos patológicos, especialmente se forem atingidos domínios críticos. Reitera-se assim a importância de procurar novas regiões genómicas e mutações que forneçam um melhor *insight* sobre as bases genéticas da MAC e as interações génicas envolvidas na formação ocular.

Focando a atenção nas pacientes 1 e 2, foram encontrados 67 genes incluídos nos desequilíbrios detetados, sendo que a maioria daqueles (65) pertenciam à paciente 2. Cada um desses genes foi explorado em termos de potencial para vir a ser associado ao fenótipo MAC, tendo por base critérios como função, patologias associadas, tecidos em que se expressa, envolvimento no desenvolvimento embrionário, interações com outros genes e casos reportados com alterações semelhantes. Foram assim escolhidos para discussão os genes evidenciados na Tabela III, tendo para tal sido necessária a consulta das seguintes bases de dados: *OMIM Online Mendelian Inheritance in Man* (<http://www.omim.org/>); *Gene Cards* (<http://www.genecards.org/>); *BioGPS* (<http://biogps.org/#goto=welcome>); *STRING Interaction Network* (<http://string-db.org/>).

TABELA III. Genes que sugerem potencial envolvimento na MAC

	Gene	Posições Nucleotídicas (pb)	Número de Identificação OMIM
<b>Paciente 1</b> 2q21.3	<i>RAB3GAP1</i>	cs2:135,809,835-135,928,279	602536
	<i>TULP3</i>	cs12:3,000,033-3,050,306	604730
	<i>KDM5A</i>	cs12:389,223-498,620	180202
<b>Paciente 2</b> 12p13.32p13.33	<i>WNT5B</i>	cs12:1,726,222-1,756,377	606361
	<i>PRMT8</i>	cs12:3.600,425-3,703,138	610086
	<i>CACNA2D4</i>	cs12:1,901,123-2,027,870	608171
	<i>IQSEC3</i>	cs12:176,049-287,625	612118
<b>Paciente 2</b> 15q26.2q26.3	<i>ADAMTS17</i>	cs15:100,511,643-100,882,183	607511
	<i>ALDH1A3</i>	cs15:101,420,009-101,456,830	600463

pb = pares de bases; cs = cromossoma.

Reportemos então a paciente 1. Importa referir que o cromossoma 2 surge frequentemente associado a alterações de fenótipo ocular, indiciando uma riqueza em genes com influência ocular (Pallotta, 1991; Hirayama et al., 2005). Dos dois genes englobados pelo desequilíbrio genómico da paciente 1, o *RAB3GAP1* apresenta relação com MAC. A proteína gerada é a subunidade catalítica (p130) do complexo heterodimérico Rab3gap. O *RAB3GAP1* regula a atividade das proteínas Rab3 envolvidas no tráfego membranar, nomeadamente na excitose de neurotransmissores e hormonas. Está pois demonstrada a importância do *RAB3GAP1* para o normal desenvolvimento do olho e do cérebro, visto que regula a transmissão e plasticidade sinápticas (Sakane et al., 2006). O *RAB3GAP1* é pois um gene documentado na literatura como causador da síndrome *Warburg Micro 1* (WMS1). Trata-se de uma síndrome que cursa com microftalmia, microcórnea, microcefalia, cataratas congénitas, atrofia do nervo óptico, displasia cortical (principalmente do corpo caloso), diplegia espástica, hipotonia, atraso de desenvolvimento psico-motor (grave a profundo) e hipogonadismo, podendo cursar com dismorfismos faciais (Warburg et al., 1993). Embora existam casos de WMS1 em que não são encontradas alterações genéticas, a maioria

apresenta mutações em homozigotia para o *RAB3GAP1*, com perda de função (Abdel-Salam et al., 2007; Yüksel et al., 2007; Morris-Rosendahl et al., 2010).

Como se pode verificar pela Tabela I, a clínica da paciente 1 parece muito bem relacionar-se com a da WMS1. Todavia, os resultados obtidos por oligoarray-CGH são compatíveis com uma deleção em heterozigotia do gene, o que, numa primeira análise, vai contra a condição autossômica recessiva da WMS1 (que implica o comprometimento das duas cópias do gene), tornando o caso mais interessante. Sugerem-se assim algumas hipóteses explicativas desta situação. Desde logo, podemos pensar que poder-se-á tratar de uma situação de heterozigotia composta para o gene em questão, com deleção de uma cópia e mutação pontual da outra. Estão reportadas na literatura mutações pontuais causadoras de WMS1 (Aligianis et al., 2005) e, como se sabe, a técnica de oligoarray-CGH pode não detetar mutações pontuais. Ponderando este cenário, sugere-se uma prossecução do estudo da paciente 1 com sequenciação genética, na tentativa de identificar mutações do outro alelo que expliquem o fenótipo apresentado. Considerando um cenário em que alelo remanescente não tem alterações, poderão colocar-se duas hipóteses. Por um lado, a clínica ser resultante de mutações nos genes *POMT1* ou *POMT2*, que teriam de ser pesquisadas, e que se associam a formas suaves de Distrofia Muscular Congénita tipo A1 (CMD-A1) (Kim et al., 2004; Godfrey et al., 2007), cujas manifestações se assemelham às da paciente 1. Por outro lado, o fenótipo poder resultar duma redução na quantidade de Rab3gap formada/funcional, embora esta situação seja pouco provável, porque contraria a característica de autossomia recessiva da WMS1 e porque não existe até à data literatura que corrobore este postulado.

Porém, a hipótese mais interessante que se coloca é a seguinte. O WMS1 é conhecido por se sobrepor em termos clínicos a uma outra síndrome, a de *Martsolf* (MS), sendo a severidade do quadro neurológico e ocular o principal parâmetro para a sua distinção (mais grave na WMS1). Mutações do *RAB3GAP2* (sintetiza a subunidade não-catalítica, p150, do

Rab3gap) parecem ser a causa da MS. Não obstante, devido ao “*overlapping*” referido, tem sido proposto que as duas síndromes sejam na realidade um *continuum* fenotípico, o qual se poderia designar por “*Warburg-Martsolf Syndrome*” (Aligianis et al., 2006). Isso verifica-se igualmente a nível genético, visto existirem casos de WMS1 causados por mutações no *RAB3GAP2* (Borck et al., 2011), embora não existam casos reportados de MS devidos a mutações *RAB3GAP1*. Surge então daqui o interesse em estudar a nossa paciente 1 de forma mais aprofundada, uma vez que se trata de um possível caso de perda de função em homozigotia do *RAB3GAP1* – a esclarecer por sequenciação – que causa um possível MS, sugerido pelo fenótipo menos grave – a paciente não apresenta atrofia do nervo óptico nem convulsões. Pelo acima exposto, justificar-se-ia a realização de eletrorretinografia (ERG), potenciais visuais evocados (PEV) e ressonância magnética crânio-encefálica (RMN-CE), por forma a melhor caracterizar esta paciente que, verificando-se a possibilidade de se tratar de um MS causado por alteração no *RAB3GAP1*, seria a primeira reportada deste género, apoiando a noção do possível espectro “*Warburg-Martsolf Syndrome*”.

Embora não seja um novo gene a associar ao fenótipo MAC, a discussão anterior vem, por um lado, abrir caminho a um estudo mais pormenorizado da paciente 1 e, por outro, não se comprovando as hipóteses colocadas, deixar em aberto a possibilidade de pesquisar outros genes responsáveis pelo fenótipo.

Quanto à paciente 2, sugere-se que 6 dos 34 genes incluídos no desequilíbrio encontrado no braço curto do cromossoma 12 possam ter alguma relação com o fenótipo MAC (ver Tabela III), destacando-se o *TULP3*.

Este gene é pois reportado como sendo um gene crítico para a embriogénese, particularmente no desenvolvimento e função neuronais (Ikeda et al., 2001; Cameron et al., 2009). Embora não esteja completamente esclarecida a função da proteína que sintetiza (*TULP3*), sabe-se tratar-se de um fator de transcrição que se encontra acoplado ao

fosfatidilinositol membranar, estabelecendo uma ligação direta entre a transdução de sinal mediada pelas proteínas G e a expressão génica nuclear correspondente. Os seguintes 3 aspetos foram pois as principais razões que despoletaram o interesse no facto de este gene poder estar relacionado com MAC: estudos em modelo animal; homologia com proteínas da mesma família; influência na via de sinalização *Hedgehog* (Hh). Foi verificado no modelo animal (rato) que o gene *Tulp3* apresentava elevada expressão no olho e tecido nervoso durante o desenvolvimento embrionário (Sahly et al., 1998). Foi também evidenciada a grande homologia (60 a 90%) existente entre o *TULP3* e os genes *TUB*, *TULP1* e *TULP2*, os quais apresentam associações documentadas com patologias oculares tais como degeneração retiniana precoce e progressiva, retinite pigmentosa e distrofia de cones e bastonetes, respetivamente (North et al., 1997). Por último, diversos estudos têm caracterizado a função do *TULP3* como regulador negativo do *SHH* e, conseqüentemente, da via Hh, que é sobreativada quando existem mutações em homozigotia do *TULP3* (Norman et al., 2009; Patterson et al., 2009). O *SHH* é pois um gene que está envolvido no desenvolvimento do CO (Gregory-Evans et al., 2004), havendo inclusivamente casos de CO isolado por mutações no *SHH*. Para além disso, a via Hh reprime a expressão do *PAX6*, outro gene que vimos origina CO quando mutado. Assim, a influência que tem sobre genes já reportados como estando na origem de MAC, associada ao facto de ainda não se conhecerem completamente as suas funções, conferem potencial ao *TULP3* para ser explorado no âmbito da MAC. Quanto ao ADPM da paciente 2, poderá eventualmente ser explicado pelo facto de a deleção ser subtelomérica (Wu et al., 2010).

Outro gene com possível interesse na MAC é o *KDM5A*. Este gene codifica uma desmetilase de histonas de expressão ubíqua e específica para a lisina, que se liga diretamente à proteína do retinoblastoma (codificada pelo *RBPI*). Embora não se encontrem reportados casos de MAC associados a alterações deste gene, a verdade é que o mesmo interage com

outros genes que intervêm na embriogênese, nomeadamente a nível da ectoderme, como se verificou após consulta da *STRING Interaction Network* (<http://string-db.org/>). Como exemplo desses genes interessantes temos o *RARA*, que por ser um recetor do ácido retinóico, poderá associar-se a efeitos teratogénicos, o *EED*, envolvido no desenvolvimento da ectoderme, e o *EZH2*, que desempenha um papel importante sobre a identidade e diferenciação das células embrionárias. Assim, seria curioso aprofundar o estudo das interações entre esses genes e os seus produtos, nomeadamente através de técnicas de imunoprecipitação ou análise de expressão génica nas células embrionárias.

O *WNT5B* poderá também apresentar algum interesse visto pertencer a uma família de genes que codificam proteínas envolvidas em processos de organização e migração celular (da neurectoderme, inclusive) durante a gastrulação embrionária. As vias de sinalização do Wnt5b e Wnt11, sobreponíveis, são responsáveis por movimentações de convergência e extensão celular durante a gastrulação (Kilian et al., 2003). Alterações destas vias foram reportadas em associação com fenótipo ciclópico (Goudevenou et al., 2011). É legítimo então inferir que o *WNT5B* apresenta potencial como gene a ser estudado na MAC.

Os genes *PRMT8*, *CACNA2D4* e *IQSEC3* foram também escolhidos para discussão, embora não sejam tão relevantes. O *PRMT8* é apenas referido por apresentar um padrão de expressão específico para o cérebro e olho, observado a partir de bibliotecas de cDNA de rato. Trata-se de um gene com relevância na diferenciação neuronal (Lee et al., 2005). Por sua vez, o *CACNA2D4* sintetiza uma subunidade de canais de cálcio que, quando mutada em homozigotia, leva ao desenvolvimento de distrofia dos cones retinianos (Wycisk et al., 2006). Já o *IQSEC3* é referido apenas por ter elevada expressão no tecido cerebral do feto.

Passando agora à duplicação verificada no braço longo do cromossoma 15, sugere-se que 2 dos 31 genes identificados tenham potencial para originar o fenótipo MAC (ver Tabela III). De um modo geral, as duplicações 15q terminais originam o chamado “*Overgrowth*

*Syndrome*” (OS) (Tatton-Brown et al., 2009; Chen et al., 2011), caracterizado por uma clínica de sobre-crescimento pré-natal, craniossinostose e dismorfismos faciais, em virtude da incorporação do gene *IGF1R* na duplicação. Embora esteja reportada na literatura uma duplicação semelhante em localização (15q26.2q26.3) e dimensão (4.71Mb) e que se traduz num OS (Chen et al., 2011), este fenótipo não se verifica na nossa paciente. De notar também que o *IGF1R* não sofre *imprinting*. Já o ligeiro ADPM da paciente pode eventualmente explicar-se por esta duplicação, tal como foi reportado num caso de dup15q26-ter (Faivre et al., 2002). Embora seja frequente a presença concomitante de monossomia 12p (Chen et al., 2011), é sem dúvida peculiar o facto de não ter resultado aparentemente de uma translocação desequilibrada herdada de pais equilibrados. Uma situação semelhante, mas sem o componente monossómico, é reportada na literatura (Kim et al., 2011).

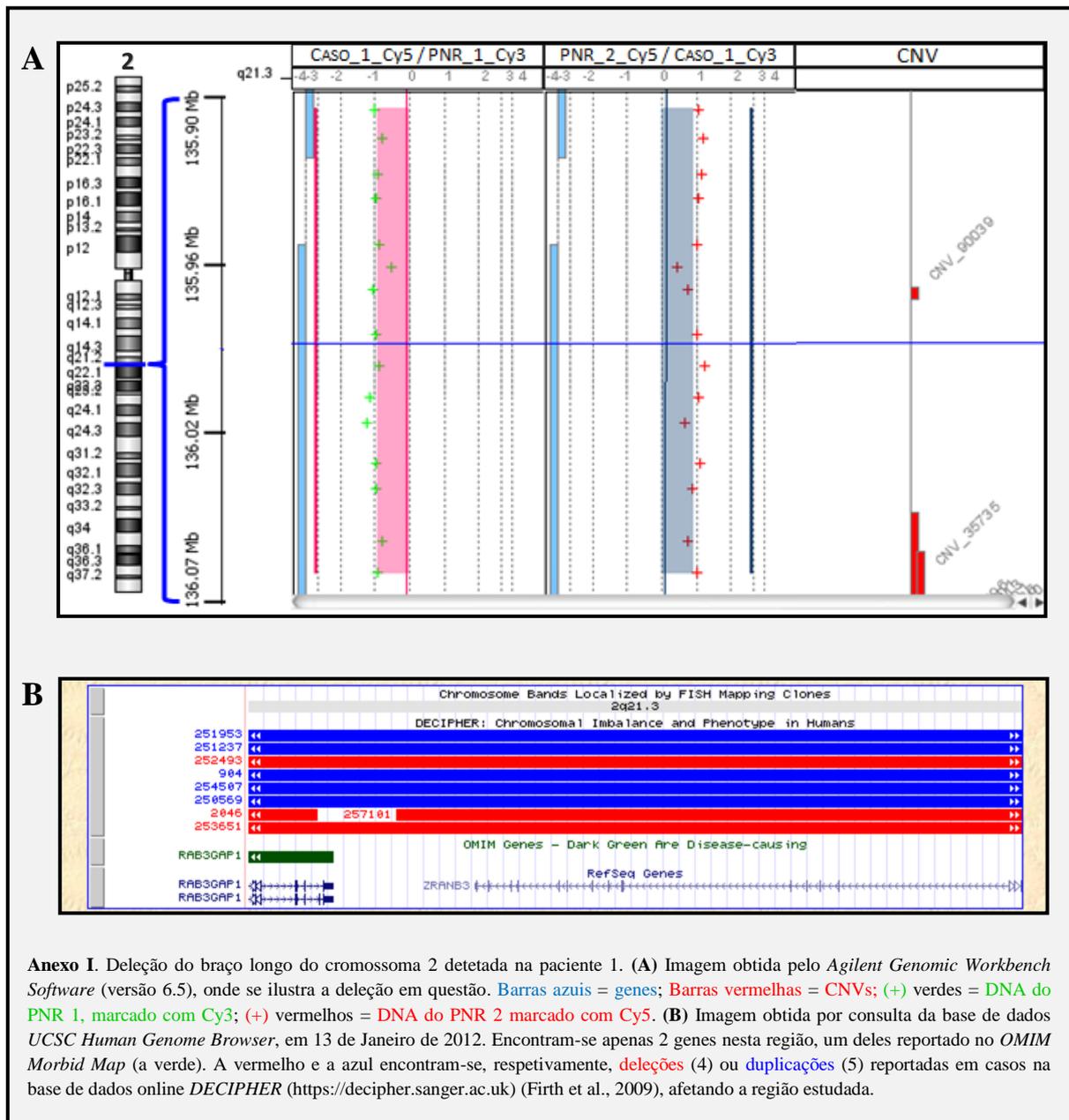
Começando pelo *ADAMTS17*, este codifica uma proteína membro da família das proteínas Adamts, metaloproteases dependentes de zinco, cujas funções ainda não estão completamente esclarecidas (Porter et al., 2005). Porém, sabe-se que tanto as metaloproteases como as proteínas dependentes de zinco desempenham funções importantes na fisiologia/patologia ocular (Morales et al., 2009). A Adamts17 apresenta 2 isoformas (*a* e *b*), sendo a última altamente expressa a nível do olho e retina em particular. Para além disso, são reportadas mutações em homozigotia para este gene que produzem um fenótipo com alterações oculares (Morales et al., 2009), no contexto da síndrome *Weill-Marchesani-like* (WMLS). Assim, embora tenhamos encontrado na nossa paciente uma sobredosagem génica ao invés de uma mutação homozigótica, o envolvimento documentado num fenótipo ocular justifica a potencialidade deste gene ser relacionado com MAC.

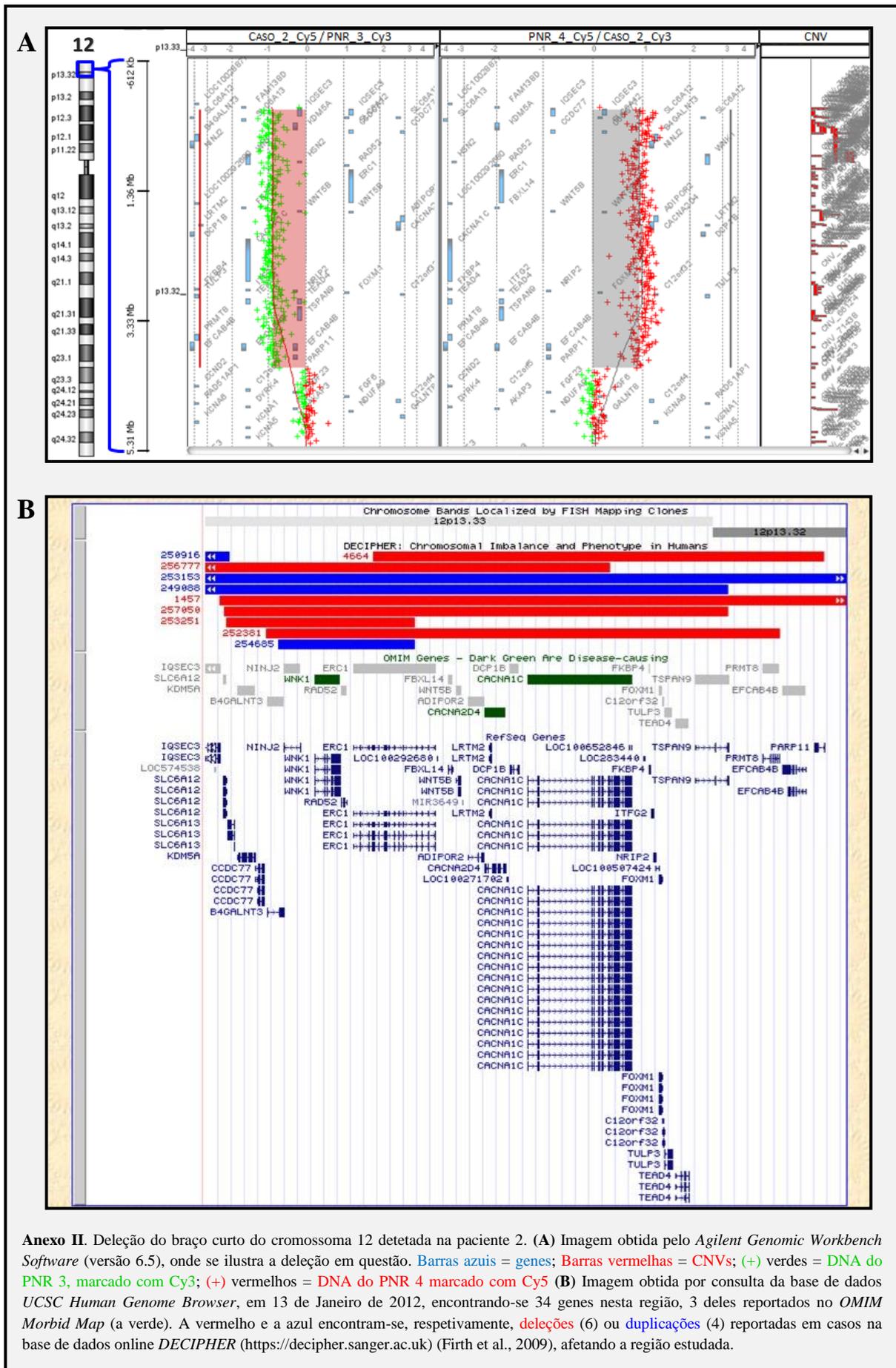
Quanto ao *ALDH1A3*, codifica uma iso-enzima da família das aldeído-desidrogenases. Justifica-se a escolha porque se trata de um gene que codifica uma enzima-chave durante o desenvolvimento inicial do olho, responsável pela formação dum gradiente de concentração

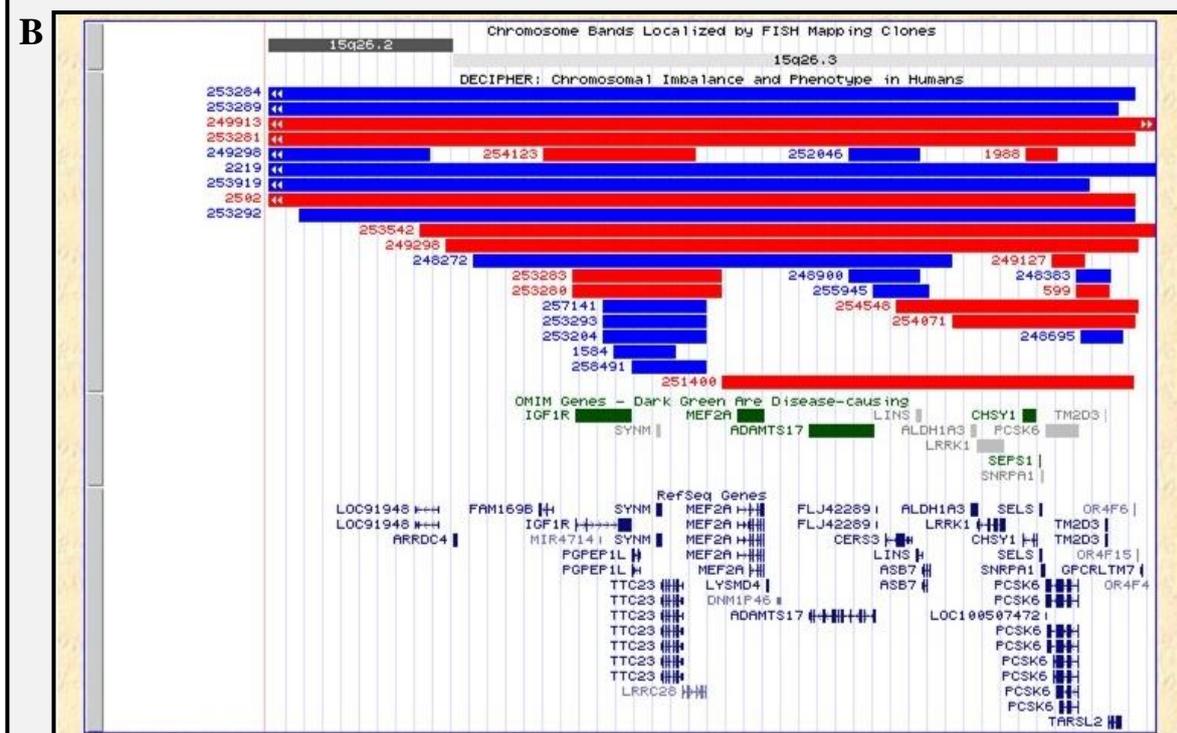
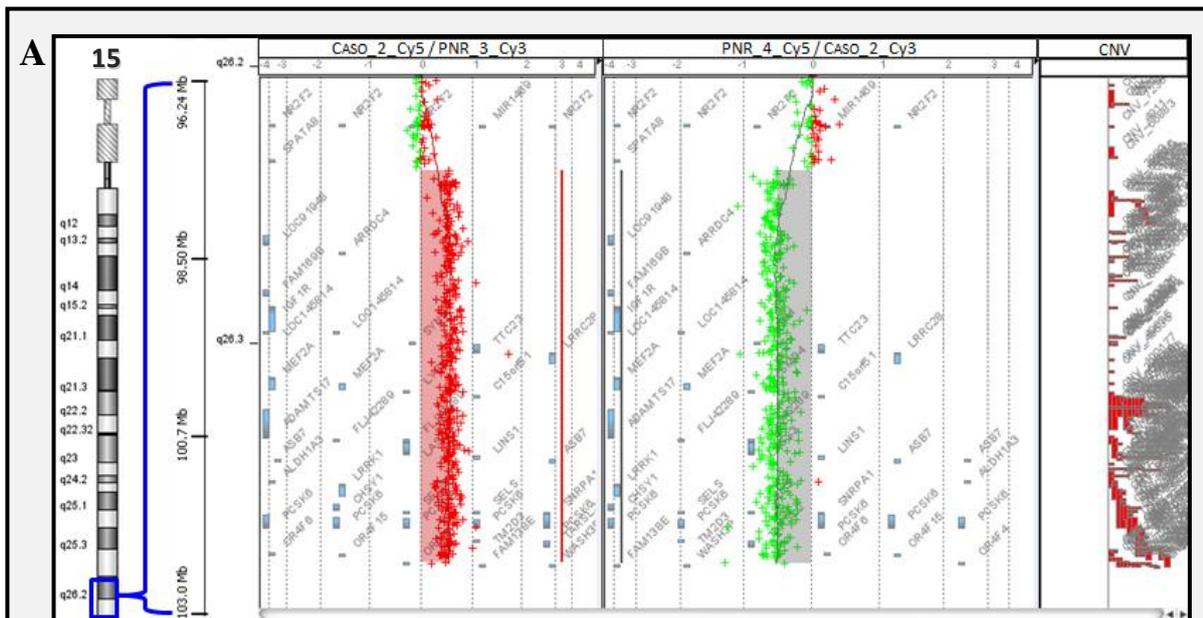
de ácido retinóico ao longo do eixo embrionário dorsoventral. Foi igualmente demonstrada a sua expressão no neuroepitélio ocular em desenvolvimento (Grun et al., 2000).

Embora existam genes com uma associação estabelecida com MAC, sendo o *SOX2* o exemplo mais paradigmático, persiste a necessidade de encontrar novos genes ou regiões genómicas que melhor caracterizem a MAC e aprofundem o conhecimento sobre os processos envolvidos na formação do olho. Percorrendo o trilha dessa busca, e analisando 5 pacientes com MAC, foram sugeridos 8 novos genes com potencial para se explorar uma possível relação com esse fenótipo, destacando-se o *TULP3*, o *ADAMTS17* e o *ALDH1A3*. E na paciente 1, embora o *RAB3GAP1* já esteja reportado em associação com um fenótipo MAC, constatou-se a necessidade de prosseguir o estudo da mesma, nomeadamente com sequenciação e melhor caracterização da clínica, na perspectiva de se poder tratar de um primeiro caso em que alterações do *RAB3GAP1* estejam na origem de uma possível MS, apoiando a noção de um hipotético “*Warburg-Martsolf Syndrome*”.

## ANEXOS







**Anexo III.** Duplicação do braço longo do cromossoma 15 detetada na paciente 2. (A) Imagem obtida pelo *Agilent Genomic Workbench Software* (versão 6.5), onde se ilustra a duplicação em questão. Barras azuis = genes; Barras vermelhas = CNVs; (+) vermelhos = DNA do Caso 2 marcado com Cy5; (+) verdes = DNA do Caso 2, marcado com Cy3 (B) Imagem obtida por consulta da base de dados *UCSC Human Genome Browser*, em 13 de Janeiro de 2012, encontrando-se 31 genes nesta região, 5 deles reportados no *OMIM Morbid Map* (a verde). A vermelho e a azul encontram-se, respetivamente, deleções (14) ou duplicações (17) reportadas em casos na base de dados online *DECIPHER* (<https://decipher.sanger.ac.uk>) (Firth et al., 2009), afetando a região estudada.

## **AGRADECIMENTOS**

À Professora Doutora Isabel Maria Marques Carreira, pelas condições proporcionadas à realização deste trabalho, pelo apoio e disponibilidade em nortear esta tese de Mestrado e pela forma como sempre soube conjugar empatia e motivação na orientação do meu percurso.

À Susana, pela amizade, paciência e prontidão com que sempre me ajudou e respondeu às minhas dúvidas (que não foram poucas), dando o seu melhor no aperfeiçoamento desta tese. É por isso que este trabalho também é fruto do teu.

Ao Zé e ao Miguel, pela disponibilidade e companheirismo com que sempre me receberam no laboratório e me transmitiram os seus conhecimentos.

Ao Dr. Eduardo, pela gentileza em fornecer os dados clínicos dos pacientes estudados e pela simpatia com que ajudou na organização e esclarecimento de dúvidas sobre os mesmos.

À minha família, e em especial aos meus pais, por todo o seu amor e carinho, pelo apoio, pelos princípios, pela união, pela educação e pela força. O homem que hoje sou é a vós que deve inteira gratidão.

À Joana, meu porto de abrigo durante esta viagem por Coimbra, pela confiança, pelo alento, pela paciência, pelo amor.

Aos meus amigos da Coimbra estudantil que, para além da amizade e convívio, ajudaram a que este trabalho chegasse a bom porto com os seus conhecimentos e conselhos.

A todos os meus amigos lá da terra, estejam onde estiverem, obrigado pela amizade e apoio e por não recolherem âncora apesar dos longos períodos de afastamento.

A todos vós, um muito obrigado, do fundo do coração.

## REFERÊNCIAS

Abdel-Salam GM, Hassan NA, Kayed HF, and Aligianis IA (2007) Phenotypic variability in Micro syndrome: report of new cases. *Genet Couns* 18:423-435.

Aligianis IA, Johnson CA, Gissen P, Chen D, Hampshire D, Hoffmann K, Maina EN, Morgan NV, Tee L, Morton J, et al (2005) Mutations of the catalytic subunit of RAB3GAP cause Warburg Micro syndrome. *Nat Genet* 37:221-224.

Aligianis IA, Morgan NV, Mione M, Johnson CA, Rosser E, Hennekam RC, Adams G, Trembath RC, Pilz DT, Stoodley N, et al (2006) Mutation in Rab3 GTPase-activating protein (RAB3GAP) noncatalytic subunit in a kindred with Martsolf syndrome. *Am J Hum Genet* 78:702-707.

Bardakjian T, Weiss A, and Schneider AS (1993) Anophthalmia / Microphthalmia Overview. In: *GeneReviews* (Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, and Stephens K, eds). Seattle (WA).

Borck G, Wunram H, Steiert A, Volk AE, Korber F, Roters S, Herkenrath P, Wollnik B, Morris-Rosendahl DJ, and Kubisch C (2011) A homozygous RAB3GAP2 mutation causes Warburg Micro syndrome. *Human Genetics* 129:45-50.

Cameron DA, Pennimpede T, and Petkovich M (2009) Tulp3 is a critical repressor of mouse hedgehog signaling. *Dev Dyn* 238:1140-1149.

Chen CP, Lin YH, Au HK, Su YN, Hsu CY, Liu YP, Wu PC, Chern SR, Chen YT, Chen LF, et al (2011) Chromosome 15q overgrowth syndrome: prenatal diagnosis, molecular cytogenetic characterization, and perinatal findings in a fetus with dup(15)(q26.2q26.3). *Taiwan J Obstet Gynecol* 50:359-365.

Faivre L, Gosset P, Cormier-Daire V, Odent S, Amiel J, Giurgea I, Nassogne MC, Pasquier L, Munnich A, Romana S, et al (2002) Overgrowth and trisomy 15q26.1-qter including the IGF1

receptor gene: report of two families and review of the literature. *Eur J Hum Genet* 10:699-706.

Fantes J, Ragge NK, Lynch S-A, McGill NI, Collin JRO, Howard-Peebles PN, Hayward C, Vivian AJ, Williamson K, van Heyningen V, and FitzPatrick DR (2003) Mutations in SOX2 cause anophthalmia. *Nat Genet* 33:462-463.

Firth HV, Richards SM, Bevan AP, Clayton S, Corpas M, Rajan D, Van Vooren S, Moreau Y, Pettett RM, and Carter NP (2009) DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources. *Am J Hum Genet* 84:524-533.

Godfrey C, Clement E, Mein R, Brockington M, Smith J, Talim B, Straub V, Robb S, Quinlivan R, Feng L, et al (2007) Refining genotype phenotype correlations in muscular dystrophies with defective glycosylation of dystroglycan. *Brain* 130:2725-2735.

Goudevenou K, Martin P, Yeh YJ, Jones P, and Sablitzky F (2011) Def6 is required for convergent extension movements during zebrafish gastrulation downstream of Wnt5b signaling. *PLoS One* 6:e26548.

Gregory-Evans CY, Williams MJ, Halford S, and Gregory-Evans K (2004) Ocular coloboma: a reassessment in the age of molecular neuroscience. *J Med Genet* 41:881-891.

Grun F, Hirose Y, Kawauchi S, Ogura T, and Umesono K (2000) Aldehyde dehydrogenase 6, a cytosolic retinaldehyde dehydrogenase prominently expressed in sensory neuroepithelia during development. *J Biol Chem* 275:41210-41218.

Hirayama T, Kobayashi T, and Fujino O (2005) Congenital bilateral severe microphthalmia with mental retardation and cerebral palsy: chromosome aberration, 46, XY, t (2;6)(q31;q24). *J Nihon Med Sch* 72:242-244.

Ikeda A, Ikeda S, Gridley T, Nishina PM, and Naggert JK (2001) Neural tube defects and neuroepithelial cell death in Tulp3 knockout mice. *Hum Mol Genet* 10:1325-1334.

Källén B, Robert E, and Harris J (1996) The descriptive epidemiology of anophthalmia and microphthalmia. *Int J Epidemiol* 25:1009-1016.

Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, and Haussler D (2002) The human genome browser at UCSC. *Genome Res* 12:996-1006.

Kilian B, Mansukoski H, Barbosa FC, Ulrich F, Tada M, and Heisenberg CP (2003) The role of Ppt/Wnt5 in regulating cell shape and movement during zebrafish gastrulation. *Mech Dev* 120:467-476.

Kim DS, Hayashi YK, Matsumoto H, Ogawa M, Noguchi S, Murakami N, Sakuta R, Mochizuki M, Michele DE, Campbell KP, et al (2004) POMT1 mutation results in defective glycosylation and loss of laminin-binding activity in alpha-DG. *Neurology* 62:1009-1011.

Kim EY, Kim YK, Kim MK, Jung JM, Jeon GW, Kim HR, and Sin JB (2011) A case of de novo duplication of 15q24-q26.3. *Korean J Pediatr* 54:267-271.

Lee J, Sayegh J, Daniel J, Clarke S, and Bedford MT (2005) PRMT8, a new membrane-bound tissue-specific member of the protein arginine methyltransferase family. *J Biol Chem* 280:32890-32896.

Lesnik Oberstein SAJ, Kriek M, White SJ, Kalf ME, Szuhai K, den Dunnen JT, Breuning MH, and Hennekam RCM (2006) Peters Plus Syndrome Is Caused by Mutations in B3GALTL, a Putative Glycosyltransferase. *The American Journal of Human Genetics* 79:562-566.

Makhoul IR, Soudack M, Kochavi O, Guilburd JN, Maimon S, and Gershoni-Baruch R (2007) Anophthalmia-plus syndrome: A clinical report and review of the literature. *Am J Med Genet Part A* 143A:64–68.

Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, Church DM, Crolla JA, Eichler EE, Epstein CJ, et al (2010) Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet* 86:749-764.

Morales J, Al-Sharif L, Khalil DS, Shinwari JM, Bavi P, Al-Mahrouqi RA, Al-Rajhi A, Alkuraya FS, Meyer BF, and Al Tassan N (2009) Homozygous mutations in ADAMTS10 and ADAMTS17 cause lenticular myopia, ectopia lentis, glaucoma, spherophakia, and short stature. *Am J Hum Genet* 85:558-568.

Morris-Rosendahl DJ, Segel R, Born AP, Conrad C, Loeys B, Brooks SS, Muller L, Zeschnigk C, Botti C, Rabinowitz R, et al (2010) New RAB3GAP1 mutations in patients with Warburg Micro Syndrome from different ethnic backgrounds and a possible founder effect in the Danish. *Eur J Hum Genet* 18:1100-1106.

Morrison D, FitzPatrick D, Hanson I, Williamson K, van Heyningen V, Fleck B, Jones I, Chalmers J, and Campbell H (2002) National study of microphthalmia, anophthalmia, and coloboma (MAC) in Scotland: investigation of genetic aetiology. *J Med Genet* 39:16-22.

Norman RX, Ko HW, Huang V, Eun CM, Abler LL, Zhang Z, Sun X, and Eggenschwiler JT (2009) Tubby-like protein 3 (TULP3) regulates patterning in the mouse embryo through inhibition of Hedgehog signaling. *Hum Mol Genet* 18:1740-1754.

North MA, Naggert JK, Yan Y, Noben-Trauth K, and Nishina PM (1997) Molecular characterization of TUB, TULP1, and TULP2, members of the novel tubby gene family and their possible relation to ocular diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3128-3133.

Pallotta R (1991) Iris coloboma, ptosis, hypertelorism, and mental retardation: a new syndrome possibly localised on chromosome 2. *J Med Genet* 28:342-344.

Patterson VL, Damrau C, Paudyal A, Reeve B, Grimes DT, Stewart ME, Williams DJ, Siggers P, Greenfield A, and Murdoch JN (2009) Mouse hitchhiker mutants have spina bifida, dorso-ventral patterning defects and polydactyly: identification of Tulp3 as a novel negative regulator of the Sonic hedgehog pathway. *Hum Mol Genet* 18:1719-1739.

Porter S, Clark IM, Kevorkian L, and Edwards DR (2005) The ADAMTS metalloproteinases. *Biochem J* 386:15-27.

Reis LM, Tyler RC, Schneider A, Bardakjian T, and Semina EV (2010) Examination of SOX2 in variable ocular conditions identifies a recurrent deletion in microphthalmia and lack of mutations in other phenotypes. *Mol Vis* 16:768-773.

Sahly I, Gogat K, Kobetz A, Marchant D, Menasche M, Castel M, Revah F, Dufier J, Guerre-Millo M, and Abitbol MM (1998) Prominent neuronal-specific tub gene expression in cellular targets of tubby mice mutation. *Hum Mol Genet* 7:1437-1447.

Sakane A, Manabe S, Ishizaki H, Tanaka-Okamoto M, Kiyokage E, Toida K, Yoshida T, Miyoshi J, Kamiya H, Takai Y, and Sasaki T (2006) Rab3 GTPase-activating protein regulates synaptic transmission and plasticity through the inactivation of Rab3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:10029-10034.

Sanlaville D, and Verloes A (2007) CHARGE syndrome: an update. *Eur J Hum Genet* 15:389-399.

Shaffer LG, Slovak ML, and Campbell LJ (2009) ISCN (2009): An International System of Human Cytogenetic Nomenclature (2009). *S Karger AG, Basel* 2009.

Stoll C, Alembik Y, Dott B, and Roth MP (1992) Epidemiology of congenital eye malformations in 131,760 consecutive births. *Ophthalmic Genetics* 13:179-186.

Tatton-Brown K, Pilz DT, Orstavik KH, Patton M, Barber JC, Collinson MN, Maloney VK, Huang S, Crolla JA, Marks K, et al (2009) 15q overgrowth syndrome: a newly recognized phenotype associated with overgrowth, learning difficulties, characteristic facial appearance, renal anomalies and increased dosage of distal chromosome 15q. *Am J Med Genet A* 149A:147-154.

Verma AS, and Fitzpatrick DR (2007) Anophthalmia and microphthalmia. *Orphanet J Rare Dis* 2:47.

Warburg M (1993) Classification of microphthalmos and coloboma. *J Med Genet* 30:664-669.

Warburg M, Sjo O, Fledelius HC, and Pedersen SA (1993) Autosomal recessive microcephaly, microcornea, congenital cataract, mental retardation, optic atrophy, and hypogenitalism. Micro syndrome. *Am J Dis Child* 147:1309-1312.

Williamson KA, Hever AM, Rainger J, Rogers RC, Magee A, Fiedler Z, Keng WT, Sharkey FH, McGill N, Hill CJ, et al (2006) Mutations in SOX2 cause anophthalmia-esophageal-genital (AEG) syndrome. *Hum Mol Genet* 15:1413-1422.

Wu Y, Ji T, Wang J, Xiao J, Wang H, Li J, Gao Z, Yang Y, Cai B, Wang L, et al (2010) Submicroscopic subtelomeric aberrations in Chinese patients with unexplained developmental delay/mental retardation. *BMC Med Genet* 11:72.

Wycisk KA, Zeitz C, Feil S, Wittmer M, Forster U, Neidhardt J, Wissinger B, Zrenner E, Wilke R, Kohl S, and Berger W (2006) Mutation in the auxiliary calcium-channel subunit CACNA2D4 causes autosomal recessive cone dystrophy. *Am J Hum Genet* 79:973-977.

Yüksel A, Yesil G, Aras C, and Seven M (2007) Warburg Micro syndrome in a Turkish boy. *Clinical Dysmorphology* 16:89-93 10.1097/MCD.1090b1013e328054c328404.

Zhou J, Kherani F, Bardakjian TM, Katowitz J, Hughes N, Schimmenti LA, Schneider A, and Young TL (2008) Identification of novel mutations and sequence variants in the SOX2 and CHX10 genes in patients with anophthalmia/microphthalmia. *Mol Vis* 14:583-592.