

## Análisis del gen CYP1B1 en una familia con glaucoma congénito primario: Estudio preliminar

M Carmen Chima-Galán<sup>1</sup>, Luz M González-Huerta<sup>1</sup>, Rita Mata Hara<sup>2</sup>, María R Rivera-Vega<sup>1</sup>, Olga M Messina-Baas<sup>2</sup>, Sergio A Cuevas-Covarrubias<sup>1</sup>, Ignacio Babayán-Mena<sup>1, 2</sup>

### RESUMEN

**Antecedentes:** La enfermedad ocular es común en la población humana. Actualmente se estiman más de 200 loci humanos causantes de enfermedades oculares asociados o no a otros síndromes. El glaucoma congénito primario (GCP) ocurre cuando el desarrollo de las anomalías del ángulo iridocorneal evita el drenaje adecuado del humor acuoso elevándose así la presión intraocular. Recientemente se han descrito diferentes mutaciones en el gen del citocromo P450B1 (CYP1B1) en familias con GCP. La mayoría de los casos son esporádicos mientras que una minoría corresponde a casos familiares.

**Material y método:** En el presente trabajo se estudia el gen CYP1B1, mediante PCR y secuenciación directa de DNA, en una familia con dos casos afectados con GCP.

**Resultados:** El análisis detectó en ambos propósitos 3 variantes polimórficas en el exón 2, dos de las cuales ya han sido reportadas previamente. Para este exón las variantes fueron la transversión de C142→G en el codón 48 que produce la sustitución de arginina por glicina, la transversión de G355→T en el codón 119 que ocasiona el reemplazo de alanina por serina y la transversión de G729→C en el codón 243 que condiciona una mutación sinónima (valina por valina).

**Conclusiones:** Aun cuando no se puede establecer un efecto causal en estas mutaciones encontradas para el GCP, éstas podrían estar fuertemente asociadas al padecimiento. Sin embargo, el estudio completo del gen nos ayudará a identificar la posible causa del GCP.

**Palabras clave:** Glaucoma congénito primario, gen CYP1B1, polimorfismo.

### SUMMARY

**Antecedents:** A review of heritable ocular disorders listed over 190 different conditions and some estimates predict that 30% in these disease genes will cause some kind of ocular phenotype. Primary congenital glaucoma (PCG) is caused by unknown developmental defects of the trabecular meshwork and anterior chamber angle of the eye. PCG occurs when the developmental anomalies of the angle prevent adequate drainage of aqueous humor. Recently, several mutations in CYP1B1 gene as cause of PCG were characterized.

**Material and method:** In the present study we analysed a family with 2 affected female cases of PCG. DNA studies were performed through PCR and DNA sequence analysis. We found three polymorphisms within exon 2: one in codon 48 (G355→T) that produces the substitution of arginine instead of valine, one in codon 119 (G355→T) that changes the amino acid serine by alanine and the last one in codon 243 (G729→C) that produces a synonymous mutation (valine by valine). The later mutation was not previously reported. The polymorphisms G355→T and G355→T have been identified in the CYP1B1 gene in other populations.

**Conclusions:** Although we cannot conclude that PCG are consequence of these polymorphisms, we can state that they are strongly associated with the disease. Further studies will be required to discard this possibility.

**Key words:** Primary congenital glaucoma, gene CYP1B1, polymorphism.

*Servicios de <sup>1</sup>Genética y <sup>2</sup>Oftalmología, Hospital General de México.*

*Correspondencia*

*Dr. I. Babayán Mena. Servicio de Oftalmología, Hospital General de México. Dr. Balmis 148 Col. Doctores, C.P.*

## ANTECEDENTES

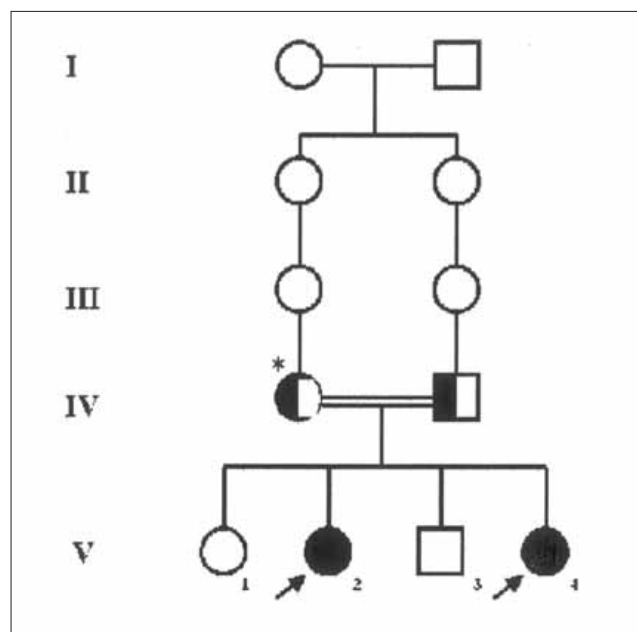
La enfermedad ocular es común en la población humana. Actualmente se estiman más de 200 loci causantes de enfermedades oculares asociados o no a otros síndromes. Muchos de ellos participan en el desarrollo y formación del segmento anterior del ojo el cual está constituido por la córnea y el cristalino. El iris, compuesto particularmente de neuroepitelio, se proyecta en este espacio. La malla trabecular es una red de células que forma la unión iridocorneal (ángulo anterior) del ojo (1). El humor acuoso producido por el cuerpo ciliar en la cámara posterior, ocupa el espacio entre la córnea y el iris y baña el cristalino por su cara anterior. La presión dentro del ojo se mantiene mediante un balance de secreción continua y drenaje a través de la malla trabecular. El patrón de expresión génica durante el desarrollo del ojo se observa en general durante los estados de: 1) vesícula óptica, 2) placoda de cristalino y 3) copa óptica, estados que involucran la morfogénesis de la copa ocular y del cristalino, el desarrollo de la neurorretina y del epitelio pigmentario de la retina (2).

Los glaucomas son un grupo heterogéneo de desórdenes que habitualmente cursan con presión intraocular elevada que conlleva al daño y muerte de las células ganglionares de la retina (3). Según el mecanismo por el cual el flujo de la cámara anterior es bloqueado, los glaucomas se clasifican en glaucomas de ángulo abierto, de ángulo cerrado y congénito. El desarrollo del glaucoma puede ocurrir como una anomalía ocular aislada, en cuyo caso se denomina glaucoma congénito primario (GCP). El GCP tiene una incidencia de 1 en 10,000 nacidos vivos y la mayoría parece heredarse en forma autosómica recesiva. El diagnóstico se realiza en los primeros años de vida y se sospecha por la presencia de hipersensibilidad a la luz, epífora y blefaroespasma. En el GCP el ángulo iridocorneal no se desarrolla completamente mostrando una apariencia fetal a la gonioscopia, el iris tiene una inserción trabecular que se observa engrosada (4), la anomalía del ángulo iridocorneal evita el drenaje adecuado del humor acuoso y se eleva así la presión intraocular. Esta elevación de la presión en el ojo "elástico" del niño produce un aumento del tamaño del globo ocular, hidroftalmos y las demás alteraciones que llevan a la ceguera (5). Aunque el GCP es la forma más común de glaucoma en la infancia y que existen estudios en modelos animales, poco se sabe de su patogénesis (6). Recientemente se han descrito diferentes mutaciones en el gen citocromo P4501B1 en familias con GCP, siendo al parecer las alteraciones en este gen la causa más frecuente de este tipo de glaucoma (7-9). El gen CYP1B1 se localiza en 2p21-22 y contiene 3 exones. El marco de lectura abierto comprende 1629 pb e inicia en el segundo exón. Carece de la caja TATA en la región del promotor y contiene nueve dominios potenciadores de unión central TCDD-sensibles (5'-GCGTG-3') de los cuales 3 contribuyen a la expresión del gen CYP1B1 (10). El objetivo del presente trabajo es analizar clínica y genéticamente a una familia con GCP y señalar la importancia de establecer un diagnóstico oportuno e

identificar el defecto molecular para ofrecer un asesoramiento genético adecuado.

## PACIENTES Y MÉTODOS

Los propósitos fueron dos mujeres de 8 y 13 años de edad procedentes del estado de Veracruz, productos de padres sanos, consanguíneos, sin antecedentes importantes para el padecimiento. El árbol genealógico se muestra en la figura 1.



**Fig. 1.** Árbol genealógico de la familia. Ambas hermanas eran productos de padres consanguíneos (primos segundos). \* Madre estudiada molecularmente, aún cuando el padre no pudo ser analizado, se considera como un portador obligado.

### Paciente 1

Femenino de 8 años de edad que inicia su padecimiento a los 2 meses con epífora constante y blefaroespasma. A los 36 meses fue intervenida quirúrgicamente sin que se tengan datos sobre la naturaleza de la intervención. A la exploración física, con el ojo derecho (OD) alcanza una visión de movimientos a 30 cm, córnea con opacidad central transversal, de 13 mm de diámetro horizontal, vesícula filtrante plana con vascularización en el meridiano de las 12, cámara anterior profunda, atrofia iridiana en los 360°, iridectomía quirúrgica permeable a las 2, midriasis media, ectropión uveal leve, cristalino con pigmento en su cara anterior, ángulo con implantación anterior del iris, no se observa espolón escleral, banda del cuerpo ciliar ni línea de Schwalbe. La papila del nervio óptico (NO) con excavación 8/10, con palidez media, vasos nasalizados en bayoneta, fondo coroideo, áreas de atrofia coriorretinianas en arcada temporal superior. La tensión ocular (TO) era de 18 mm Hg.

En el ojo izquierdo (OI) la córnea es transparente, vesícula filtrante elevada, discretamente vascularizada, iris atrófico, aterciopelado sin criptas, pupila oblicua, cristalino transparente, ángulo con inserción anterior de la raíz del iris. FO papila redonda de coloración rosa naranja, excavación 8/10, vasos nasalizados discretamente. TO de 22 mm Hg.

## Paciente 2

Hermana de la paciente 1, de 13 años edad, que inicia su padecimiento a los 2 años de edad con epífora constante y blefaroespasmio. A la exploración física presenta en el OD: visión de movimientos a 1 m, córnea con opacidad transversal central, iridectomía en meridiano de las 11, pupila irregular, cámara anterior amplia, cristalino transparente, implantación anterior de la raíz del iris, resto de estructuras no visibles. En el FO excavación total de la papila del NO. TO 40 mmHg.

OI: Visión de movimientos a 2 metros. Conjuntiva con vesícula filtrante superior. Córnea con opacidad central, puntillero epitelial moderado. Iris atrófico, 2 iridectomías quirúrgicas en los meridianos de las 11 y 2, sinequias posteriores en sector superior, pigmento en la cara anterior del cristalino. Implantación anterior de la raíz del iris. FO palidez moderada de la papila, vasos nasalizados, excavación 6/10. TO de 30 mmHg.

## Análisis del gen CYP1B1

El DNA se extrajo mediante método salino (11). Se analizó la región codificante del exón 2 del gen mediante PCR y secuenciación automatizada. Las condiciones de la PCR para amplificar el exón 2 fueron: DNA 500 ng, primers 0.4 µM, dNTP's 0.08 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, buffer 1x, Taq Pol 1.5 U, vol 50 µL. Desnaturalización: 5 min a 94°C; 30 ciclos de 1 min a 94°C; 1 min de alineamiento; 1 min a 72 °C y finalmente 5 min a 72°C. Para la secuencia del DNA se utilizó un secuenciador ABI Prims 3100 (Perkin Elmer, CA, USA) siguiendo las instrucciones del proveedor.

Oligonucleótidos utilizados para la amplificación mediante PCR:

Región	Oligonucleótidos	TA
Exón 2		
GLEX2AF	F5' GCC TTC TCC TTT CTG TCC CCA GC	62°C
GLEX2AR	R5' AGC ACG TGG CCC TCG AGG ACT T	
GLEX2BF	F5' AAG TCC TCG AGG GCC ACG GCT	55°C
GLEX2BR	R5' CCA CGC CTC CCA GAG GCT TTA C	

TA = temperatura de alineamiento

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis del marco de lectura abierto del exón 2 del gen CYP1B1 mostró en ambas propositi tres variantes polimórficas, dos de ellas previamente descritas (fig. 2 y cuadro 1).

La primera substitución fue la transversión de C142→G en el codón 48 que produce el cambio de arginina por glicina.

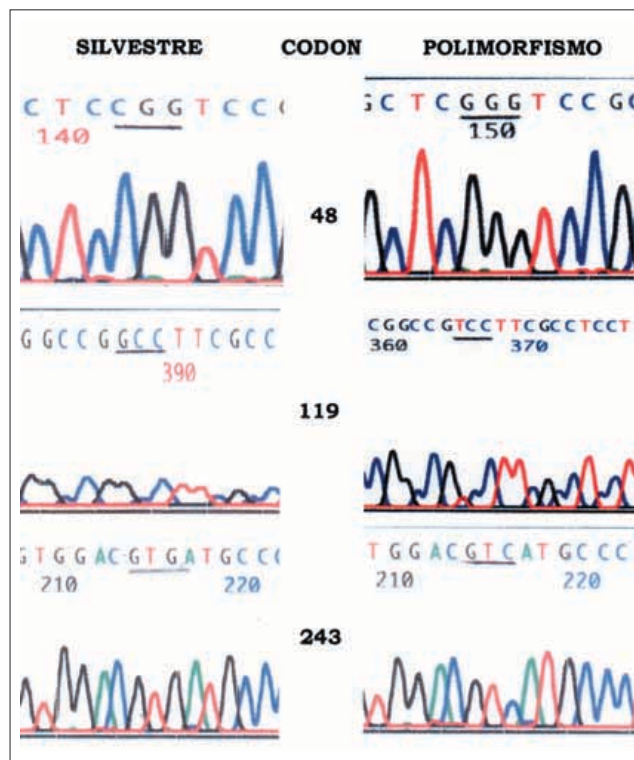


Fig. 2. Electroferograma mostrando la secuencia de DNA genómico donde se observan los polimorfismos del exón 2. Los codones implicados se encuentran subrayados.

Cuadro 1  
Haplotipos del gen CYP1B1 encontrados en los pacientes y padres de la familia estudiada

Exón	Cambio de aminoácido	Cambio en el DNA
2	Gli48Arg	C142→G
2	Ser119Ala	G355→T
2	Val243Val	G729→C

Los propósitos P1 y P2 son homocigotos para los polimorfismos, la madre es heterocigota para los polimorfismos y la variante silvestre. En negritas se indica la mutación en el exón 2 no descrita previamente.

Aunque la conformación de ambos aminoácidos es diferente, ya que uno corresponde a un aminoácido básico polar (arginina) y otro a un aminoácido apolar de cadena corta (glicina), esta variación es considerada como normal. Estudios de transfixión génica han demostrado que esta substitución corresponde a una mutación silente y por tanto se traduce en una actividad normal de la enzima (12). La segunda mutación resultó en una modificación del codón 119 en donde se presentó la transversión de G355→T que se traduce en el cambio del aminoácido alanina por serina, el primero de ellos apolar de cadena alifática y el segundo polar portador de un grupo hidroxilo, ambos de características diferentes. Sin embargo, estudios de transfixión génica han demostrado que esta substitución corresponde a una variante normal de la enzima (12).

Se detectó un tercer polimorfismo en el codón 243 correspondiente a la transversión de G729→C, esta modifica-

ción no produce ningún cambio de aminoácido (valina por valina) por lo que se conoce como una mutación sinónima. El estudio de un número suficiente de alelos de CYP1B1 en nuestra población podría orientarnos para saber si estos cambios en conjunto en la secuencia del DNA producen o no un efecto deletéreo. Es interesante el hecho de observar varios polimorfismos enzimáticos de P4501B1 en una misma familia con GCP. Para descartar si están o no determinando la causa del padecimiento se requiere del estudio completo del gen y/o de estudios más complejos como ensayos de transfixión génica. Sin embargo, no deja de llamar la atención el hecho de encontrar en una sola familia diversos polimorfismos y/o variantes alélicas reportadas en la literatura internacional para distintos pacientes.

La identificación de CYP1B1 como el gen afectado en el GCP fue el primer ejemplo en el cual una mutación en un miembro de la superfamilia del citocromo P450 resultaba en un defecto en el desarrollo primario. El gen CYP1B1 pertenece a una superfamilia multigénica de monooxigenasas responsables de la fase 1 del metabolismo que comprende la inserción de un átomo de oxígeno atmosférico dentro de su sustrato, creando un nuevo grupo funcional (e.gr., -OH, -NH<sub>2</sub>, -COOH). Distintas mutaciones y polimorfismos se han identificado en el gen CYP1B1. Mutaciones sin sentido o bien que alteran el del marco de lectura se han reportado en familias de Turquía y Arabia Saudita con GCP, mientras que 6 polimorfismos han sido informados en población angloamericana (13-14). No existen datos de las variedades alélicas en nuestra población por lo que profundizar en la identificación de estas variantes sería de utilidad para descartar su participación en el GCP. En la familia estudiada el hallazgo de estos polimorfismos, aún cuando no nos permiten establecer el efecto de causalidad de la enfermedad, podría indicar que están fuertemente asociados al padecimiento, sin embargo, se requieren más estudios para llegar a esta conclusión. Finalmente, es importante realizar estudios moleculares en este tipo de padecimientos ya que nos permiten establecer el diagnóstico preciso y, por tanto, un manejo más oportuno del paciente.

## REFERENCIAS

1. van Heyningen V: Developmental eye disease, a genome era paradigm. *Clin Genet* 1998; 54:272-282.

2. O'Rahilly R: The timing and sequence of events in the development of the human endocrine system during the embryonic period proper. *Anat Embry* 1983; 166:439-451.
3. Allingham RR: Glaucoma. En: Albert DM, Jakobiec FA (eds). *Principles and practice of ophthalmology: Clinical practice*. Vol 3, Philadelphia, WB Saunders, p. 1291.
4. Francois J: Congenital glaucoma and its inheritance. *Ophthalmologica* 1980; 181:61-73.
5. deLuise VP, Anderson DR: Primary infantile glaucoma (congenital glaucoma). *Surv Ophthalmol* 1983; 28:1-19.
6. Fox RR, Crary DD, Babito EJ Jr, Sheppard LB: Buphthalmia in the rabbit. Pleiotropic effects of the (bu) gene and a possible explanation of mode of gene action. *J Hered* 1969; 60:206-212.
7. Sarfarazi M, Akarsu AN, Hossain A, y col.: Assignment of a locus (GLC3A) for primary congenital glaucoma (buphthalmos) to 2p21 and evidence for genetic heterogeneity. *Genomics* 1995; 30:171-177.
8. Akarsu AN, Turacli ME, Aktan GS, y col. A second locus (GLC3B) for primary congenital glaucoma (buphthalmos) maps to the 1p36 region. *Hum Mol Genet* 1996; 5:1199-1203.
9. Stoilov J, Akarsu AN, Sarfarazi M: Identification of three different truncating mutations in the cytochrome P4501B1 (CYP1B1) gene as the principal cause of primary congenital glaucoma (buphthalmos) in families linked to the GLC3A locus on chromosome 2p21. *Hum Mol Genet* 1997; 6:641-647.
10. Tang YM, Wo YYP, Stewart J, Hawkins AL, Griffin CA, Sutter TR, Greenlee WF: Isolation and characterization of the human cytochrome P450 gene. *J Biol Chem* 1996; 271: 28324-28330.
11. Cuevas-Covarrubias SA, Jiménez-Vaca AL, González-Huerta LM, Valdes-Flores M, Rivera-Vega MR, Maya-Nunez G, Kofman-Alfaro S: Somatic and germinal mosaicism for the steroid sulfatase gene deletion in a steroid sulfatase deficiency carrier. *J Invest Dermatol* 2002; 119:972-975.
12. Hanna IH, Dawling S, Roodi N, Guengerich FP, Parl FF: Cytochrome P450 1B1 (CYP1B1) pharmacogenetics: Association of polymorphisms with functional differences in estrogen hydroxylation activity. *Cancer Res* 2000; 60:3440-3444.
13. Stoilov I, Nurten A, Alozie I, Child A, Barsoum-Homsy M, Erol M, Or M, Lewis RA, Ozdemir N, Brice G, Gulderen S, Chevette L, Coca-Prados M, Sarfarazi M: Sequence analysis and homology modeling suggest that primary congenital glaucoma on 2p21 results from mutations disrupting either the hinge region or the conserved core structures of cytochrome p450B1. *Am J Hum Genet* 1998; 62:573-574.
14. Bejjani BA, Lewis RA, Tomey KF, Anderson KL, Dueker DK, Jabak M, Astle WF, Otterud B, Leppert M, Lupski JR: Mutations in CYP1B1, the gene for cytochrome P4501B1, are the predominant cause of primary congenital glaucoma in Saudi Arabia. *Am J Hum Genet* 1998; 62:325-333.

### Cita histórica:

**En 1917, JG Lindberg** describe en su tesis recepcional, en Finlandia, la asociación de pseudoexfoliación con el glaucoma, pensando que se trataba de una asociación privativa de los países nórdicos, lo cual fue desmentido ulteriormente. [Lindberg JG. *Kliniska undersokningar over depigmentering av pupillarranden och genomlysbarkef av iris vid fall av aldestarr samit i normala ogon hos gamla personer*. Diss Helsingfors, 1917.]