

# Glaucoma congénito primario: estudio molecular en una familia con dos casos afectados

Luz M González-Huerta\*, Olga M Messina-Baas\*\*, Silvia F Lara-Huerta\*\*, Ignacio Babayán-Mena\*\*, Sergio A Cuevas-Covarrubias\*

## RESUMEN

Los glaucomas son un grupo de entidades que resultan en daño irreparable del nervio óptico. Dependiendo de cómo es impedido el flujo del humor acuoso, éstos se clasifican en glaucomas de ángulo cerrado y ángulo abierto; en caso de que este último se presente al nacimiento sin otra enfermedad que lo condicione, se denomina glaucoma congénito primario (GCP). El GCP tiene una incidencia de cerca de 1 en 10,000 nacidos vivos, la mayoría de los cuales parecen heredarse en una forma autosómica recesiva. 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. El objetivo del presente trabajo es analizar el gen CYP1B1 en una familia de dos casos afectados con GCP. El estudio del gen CYP1B1 se llevó a cabo mediante PCR y secuenciación directa de DNA obtenido de leucocitos. El análisis detectó en ambos propositi una delección de 13 pares de bases en el exón 3 reportada previamente en otras poblaciones. Esta delección remueve los nucleótidos 1410 a 1422 del gen y crea un codón de alto prematuro así como una proteína trunca que carece de función. El análisis del gen CYP1B1 en los padres identificó en ambos el estado de heterocigocidad para este defecto molecular. El estudio del gen CYP1B1 es importante tanto para la identificación del defecto molecular en los casos de GCP como para ofrecer un asesoramiento genético adecuado.

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

## SUMMARY

The glaucomas are an heterogeneous group of entities that cause death of the optic nerve. They are classified in open-angle, close-angle and congenital based on the mechanism by which aqueous outflow is impeded. When glaucoma occurs as an isolated ocular abnormality it is known as primary congenital glaucoma (PCG). PCG has an incidence of about 1 in 10,000 new-born and apparently is inherited as autonomic recessive trait. Recently, mutations in CYP1B1 gene in PCG have been reported. In the present study we analyzed a family with 2 affected female cases of PCG. DNA studies were performed through PCR and DNA sequencing analysis from genomic DNA. We found a 13 bp homozygous deletion that removes nucleotides 1410 to 1422 from exon 3. These mutations resulted in a truncated polypeptide by creating a premature stop codon. CYP1B1 gene analysis in both parents showed that they were heterozygous for the same molecular defect. Analysis of the CYP1B1 gene in PCG is important to correctly offer an adequate genetic counseling.

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

## ANTECEDENTES

Los glaucomas son un grupo heterogéneo de padecimientos oculares causantes del 15% de los casos de ceguera en el mundo (1). El ojo presenta una atrofia glaucomatosa típica del nervio óptico que finalmente lleva a la ceguera total en la mayoría de los casos. Los axones, vasos y estructuras de

soporte del nervio óptico se van perdiendo gradualmente. Los glaucomas habitualmente cursan con presión intraocular elevada que conlleva al daño y muerte de las células ganglionares de la retina (2).

Dependiendo de la forma en la cual se bloquea el flujo del humor acuoso de la cámara anterior, los glaucomas se denominan de ángulo abierto, de ángulo cerrado y congénito,

Servicios de \*Genética y \*\*Oftalmología, Hospital General de México, Facultad de Medicina, UNAM.

Correspondencia. Dr. Sergio A Cuevas-Covarrubias. Servicio de Genética, Hospital General de México, Facultad de Medicina, UNAM. Dr. Balmis 148 Col. Doctores. Email: sergioa@servidor.unam.mx

siendo este último de ángulo abierto. Una anormalidad en el ángulo iridocorneal al nacimiento produce una disminución de flujo acuoso y, por consiguiente, una presión intraocular elevada que finalmente lleva a la presentación del glaucoma. El desarrollo del glaucoma puede ocurrir en ausencia de otras anormalidades oculares, en cuyo caso se denomina glaucoma congénito primario (GCP). El GCP tiene una incidencia de 1 en 10,000 nacidos vivos y la mayoría parecen heredarse en forma autosómica recesiva. Generalmente se diagnostica en los primeros meses después del nacimiento, siendo 80% de los casos diagnosticados antes del primer año de vida. Los pacientes con GCP presentan hipersensibilidad a la luz, lagrimo y blefarospasmo. En ocasiones, los padres notan que los ojos de sus hijos son más grandes de lo normal, siendo esto más evidente en los casos unilaterales. A la exploración física, el ángulo iridocorneal muestra una apariencia fetal, el iris tiene una inserción trabecular y esta última se observa engrosada (3). 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 el resto de las alteraciones que conllevan a la ceguera (4). Aunque algunos casos de GCP son esporádicos, parece que en muchos casos existe un componente genético, observándose en algunas familias una transmisión autosómica recesiva (5, 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 tres 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 motivos potenciadores de unión central TCDD-sensibles (5'-GCGTG-3') de los cuales tres contribuyen a la expresión del gen CYP1B1 (10). El objetivo del presente trabajo es analizar el gen CYP1B1 en dos pacientes en una familia con GCP y señalar la importancia de establecer un diagnóstico molecular oportuno para ofrecer un asesoramiento genético adecuado. El análisis molecular en esta familia detectó una delección homocigota de 13 pb en el exón 3 del gen CYP1B1, ya reportada previamente en otras poblaciones.

## PACIENTES Y MÉTODOS

Los propósitos fueron dos mujeres de 10 y 12 años de edad procedentes del estado de Oaxaca, productos de padres sanos, consanguíneos, sin antecedentes importantes para el padecimiento.

**Paciente 1.** Femenino de 10 años de edad que inicia su padecimiento a los 6 meses con lagrimo constante. Al año de edad fue intervenida quirúrgicamente en ambos ojos sin obtenerse más datos al respecto; cuenta con varias cirugías de filtración. Actualmente, en el ojo derecho alcanza una visión de movimientos a 50 cm, córnea de 15 mm de diámetro

horizontal con opacidad central transversal, 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 úvea, ángulo con implantación anterior del iris, no se observa espolón escleral, banda del cuerpo ciliar ni línea blanca de Schwalbe. La papila del nervio óptico con excavación 9/10, con palidez media, vasos nasalizados en bayoneta, fondo coroideo, áreas de atrofia coriorretiniana en arcada temporal superior. La tensión ocular (TO) era de 18 mm Hg.

A la exploración en el ojo izquierdo cuenta dedos a 1.5 m, córnea transparente de 15 mm de diámetro horizontal, 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, TO de 20 mmHg.

**Paciente 2.** Hermana de la paciente 1, de 12 años edad que inicia su padecimiento al año de edad con lagrimo constante y blefarospasmo. Tiene el antecedente de múltiples cirugías. A la exploración física presenta datos muy similares a los observados en su hermana.

## Análisis del gen CYP1B1

El DNA se extrajo mediante método salino (11). Se analizó la región codificante de los exones 2 y 3 del gen mediante PCR y secuenciación automatizada. Las condiciones de la PCR para amplificar los exones 2 y 3 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 Prism (Perkin Elmer, CA, USA) siguiendo las instrucciones del proveedor.

Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación mediante PCR se muestran en el cuadro 1.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis del marco de lectura abierto de los exones 2 y 3 del gen CYP1B1 mostró, en ambas propositas, una delección homocigota de 13 pb involucrando los nucleótidos 1410 a 1422 (1410\_1422delGAGTCAGGCAGA) de la secuencia codificante del exón 3 (figs. 1, 2, 3). Esta delección produjo un desplazamiento en el marco de lectura abierto y un codón de paro prematuro (TGA), 203 pares de bases corriente abajo del sitio de la delección (o bien, 68 aminoácidos después del último aminoácido original, Thr-354). La misma delección de 13 pb fue detectada en estado de heterocigosis en ambos padres de las propositas, confirmando su estado de portadores. De este modo, las dos propositas afectadas heredaron una copia sencilla de esta delección por parte de cada uno de los padres.

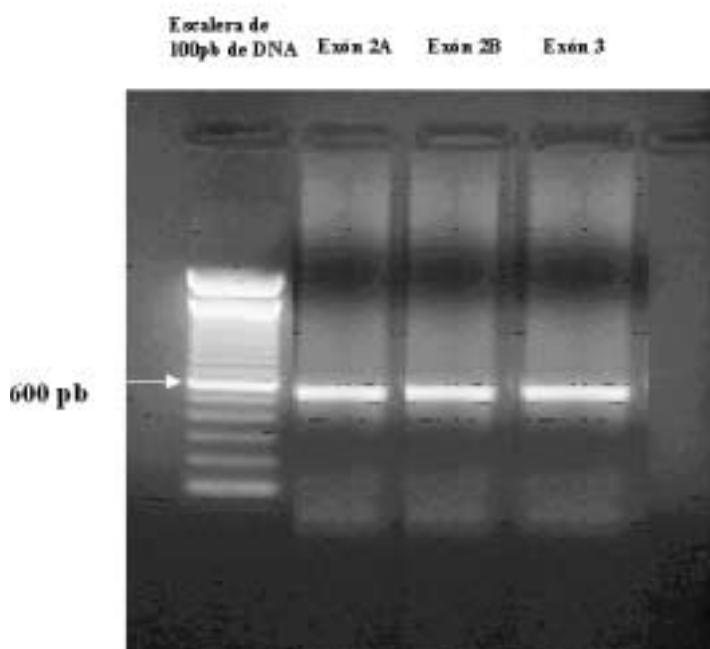
Diferentes genes han sido implicados en la génesis del glaucoma primario de ángulo abierto, demostrando claramente

**Cuadro 1. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación mediante PCR**

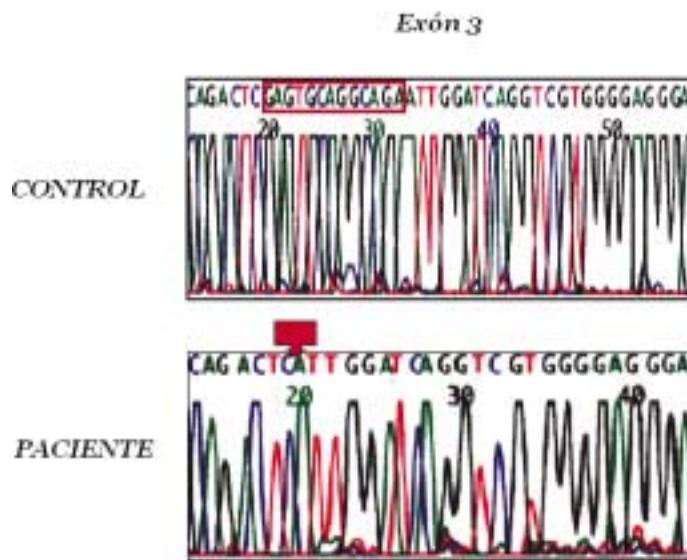
<i>Región</i>	<i>Oligonucleótidos</i>	<i>Temperatura de alineamiento</i>
GLEX2AF	F5' GCCTTCTCCTTCTGTCCCCAGC	62°C
GLEX2AR	R5' AGCACGTGGCCCTCGAGGACTT	
GLEX2BF	F5' AAGTCCTCGAGGGCCACGGCT	55°C
GLEX2BR	R5' CCACGCCTCCAGAGGTTTAC	
GIEX3	F5' CTCCACATTAAACACCAAACAG	55°C
GIEX3	R5' ATTCAGCTTGCTTGTTC	

la heterogeneidad genética del padecimiento. Por convención, cada gen se asigna con el prefijo “GLC” en alusión a glaucoma, a continuación sigue un número el cual hace referencia al subtipo de glaucoma de ángulo abierto y, por último, a cada gen se le asigna una letra (i.e., A, B, etc.) haciendo mención al orden en que se van identificando. De este modo, para el glaucoma juvenil de ángulo abierto se ha identificado el gen de la miocilina (GLC1A), existiendo en otros glaucomas de ángulo abierto hasta 5 genes más relacionados (A-E). Para el caso del GCP, mediante mapeo genético en distintas familias de Turquía, se identificó el locus GLC3A localizado en el brazo corto del cromosoma 2 (2p21) (7), la ubicación de este gen causando GCP fue confirmada cuando se identificaron 3 mutaciones en este gen y la presencia de GCP en familias cuya genealogía presentaba una transmisión autosómica recesiva (9, 12). De manera similar a estudios previos, en la familia estudiada en el presente trabajo encontramos la presencia de una delección de 13 pb en ambos propositi: los padres fueron heterocigotos para el mismo defecto molecular. El análisis de 100 cromosomas en controles sanos en los cuales no se encontró esta mutación, junto con los reportes previos, nos permite afirmar que esta mutación es causante del GCP en esta familia.

Los defectos moleculares encontrados en el gen CYP1B1 en pacientes con GCP representaron el primer ejemplo en el cual alteraciones en un miembro de la superfamilia del citocromo P450 producían enfermedades del 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 substrato, creando un nuevo grupo funcional (e.gr., -OH, -NH<sub>2</sub>, -COOH). Estudios del gen CYP1B1 han demostrado lo polimórfica que puede resultar una enzima. Dependiendo el polimorfismo del gen CYP1B1, la actividad de la enzima puede ser mayor o menor a la encontrada en la población general. Cabe mencionar que dichos cambios se han asociado a distintos tipos de cáncer estrógeno-dependientes. Distintas mutaciones y polimorfismos se han identificado en el gen CYP1B1. Sin embargo, cuando los cambios afectan de manera radical la actividad de la enzima, éstos se definen como mutaciones deletéreas que, en el caso del gen CYP1B1, se traducen en el GCP. Se han reportado mutaciones sin sentido o bien que alteran el marco de lectura en distintas familias con GCP (12-14). No existen datos de las variedades alélicas en nuestra población por lo que profundizar en la identificación de estas variantes sería de utilidad



**Fig. 1.** PCR de los exones 2 y 3 del gen CYP1B1. Debido a la longitud del exón 2, éste fue fragmentado en dos.



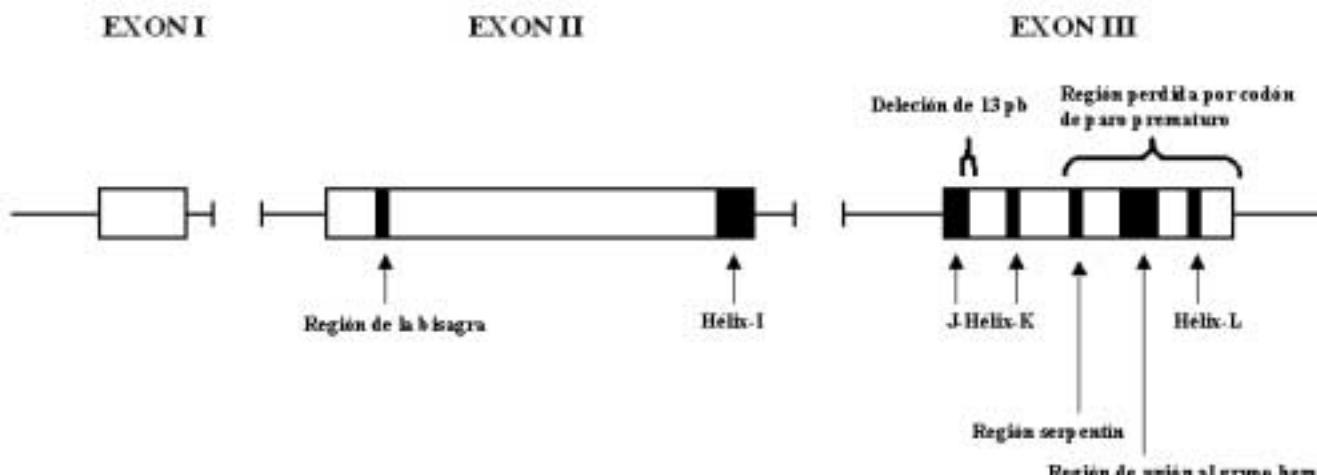
**Fig. 2.** Electroferograma mostrando la secuencia de DNA genómico donde se observa la delección de 13 pb del paciente (1410\_1422delGAGTGCAGGCAGA). Obsérvese cómo se pierde la secuencia en el paciente comparado con el control normal (señalado en el recuadro en el control sano y en la flecha en el paciente con GCP).

para descartar su participación en el GCP. En el caso que se presenta, la delección de 13 pb genera además un codón de paro prematuro y, por consiguiente, una proteína trunca que carece de regiones importantes para la función normal enzimática. Estas regiones incluyen las zonas de la hélice L, el sitio del serpentín y la región de unión al hem, esta última indispensable para la función enzimática de CYP1B1 (fig. 3). Por otro lado, una delección de 13 pb no es un hallazgo común observado en padecimientos genéticos, menos aún si éste ha sido observado en distintas poblaciones. En el caso que presentamos el hallazgo de una delección de 13 pb llama la atención ya que se ha informado en poblaciones europeas, posiblemente un antecesor común dio origen a este defecto,

manifestándose en comunidades endogámicas o en matrimonios consanguíneos. Finalmente, es importante realizar estudios genéticos en este tipo de padecimientos ya que nos permiten establecer el diagnóstico molecular preciso y, por tanto, un manejo más oportuno del paciente y un asesoramiento genético adecuado.

#### Agradecimientos

Este estudio fue apoyado por el programa PAPIIT, DGAPA, de la UNAM, proyecto número IN229905. Agradecemos la asistencia técnica de la M. en C. Laura Márquez, del Instituto de Biología, UNAM.



**Fig. 3.** Esquema representativo del gen CYP1B1 mostrando la ubicación de la delección de 13 pb y la región perdida por la generación del codón de paro prematuro.

## REFERENCIAS

1. Thylefors B, Negrel AD. The global impact of glaucoma. Bull WHO 1994; 72:323-326.
2. Allingham RR. Glaucoma. En: Albert DM, Jakobiec FA (eds.) Principles and practice of ophthalmology: Clinical practice. Vol 3, WB Saunders, Philadelphia, p. 1291.
3. François J. Congenital glaucoma and its inheritance. Ophthalmologica 1980; 181:61-73.
4. deLuise VP, Anderson DR. Primary infantile glaucoma (congenital glaucoma). Surv Ophthalmol 1983; 28:1-19.
5. Gencik A, Gencikova A, Gerinec A. Genetic heterogeneity of congenital glaucoma. Clin Genet 1980;17:241.
6. Gencikova A, Gencik A. Congenital glaucoma in gypsies from Slovakia. Hum Genet 1982; 32:270
7. Sarfarazi M, Akarsu AN, Hossain A y cols. 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 cols. 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 y cols. Somatic and germinal mosaicism for the steroid sulfatase gene deletion in a steroid sulfatase deficiency carrier. J Invest Dermatol 2002; 119:972-975.
12. Stoilov I, Nurten A, Alozie I, Child A, Barsoum-Homsy M, Erol M y cols. 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 q998; 62:573-574.
13. 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.
14. Bejjani BA, Lewis RA, Tomey KF, Anderson KL, Dueker DK y cols. 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:**

La tonometría de indentación se inicia con **H. Schiøtz** en 1905. (*Schiøtz H. Ein neuer Tonometer; Tonometrie. Arch Augenkeilkd 52:401, 1905. Schiøtz H. Tonometry. Br J Ophthalmol 4:201, 1920.*)