

## Análisis molecular de casos aislados con glaucoma congénito primario: estudio preliminar

M Carmen Chima-Galán\*, Luz M González-Huerta\*, María R Rivera-Vega\*, Cristina Villanueva\*\*, Ignacio Babayán-Mena\*\*\*, Olga M Messina-Baas\*\*\*, Sergio A Cuevas-Covarrubias\*

### RESUMEN

La forma hereditaria del glaucoma congénito primario (GCP) presenta un modo de transmisión autosómico recesivo. El GCP se debe a un desarrollo anormal del segmento anterior del ojo, siendo una causa importante de ceguera en la niñez. El principal defecto molecular observado en los pacientes con GCP ocurre en el gen CYP1B1, el cual se expresa, además de otros tejidos, en el ángulo de la cámara anterior del ojo. En condiciones normales, la enzima CYP1B1 participa en el desarrollo tisular y es capaz de metabolizar hormonas esteroides. En el presente estudio, analizamos el gen CYP1B1 de 14 casos esporádicos con GCP. El inicio de los síntomas se presentó desde el nacimiento hasta los 12 meses de vida (media 4.5 meses), la relación hombre:mujer fue 10:4 mientras que los hallazgos oculares fueron similares en todos los pacientes excepto por dos casos que presentaron evolución tórpida. En tres familias se observó consanguinidad. El análisis mediante secuenciación directa del gen CYP1B1 no mostró ningún tipo de mutación deletérea, excepto por la presencia de cambios polimórficos similares a los observados en controles sanos. Estos datos permiten concluir que la mayoría de los casos esporádicos con GCP no son consecuencia de mutaciones en el gen CYP1B1, por lo menos en la muestra analizada. El análisis del gen CYP1B1 es muy importante en el diagnóstico y consejo genético de pacientes con GCP ya que, a diferencia de lo reportado en la literatura internacional, la mayoría de los casos esporádicos no parecerían obedecer a un patrón de herencia autosómico recesivo.

**Palabras clave:** Gen CYP1B1, glaucoma congénito primario, citocromo P4501B1, SNP's.

### SUMMARY

Primary congenital glaucoma (PCG), an autosomal recessive disorder due to abnormal development of the anterior eye portion, is an important cause of childhood blindness. The principal molecular defect in most of PCG subjects occurs in the CYP1B1 gene which is also expressed in the anterior chamber angle of the eye. CYP1B1 enzyme is able to metabolize steroid hormones and participates in tissue development. In the present study, we analyze the CYP1B1 gene of 14 non-related and sporadic patients with PCG. Onset of clinical symptoms ranged from birth to 12 months (mean 4.5 months), the male:female ratio was 10:4 while ocular findings were similar in all patients, two cases were of difficult control. Consanguinity was observed in 3 families. DNA sequencing analysis of the CYP1B1 gene showed no missense or nonsense mutations, only polymorphic changes similar to those observed in normal controls were found to be present. These data allow to conclude that sporadic cases with PCG are not consequence of mutations in the CYP1B1 gene in our population, at least in the analyzed sample. The analysis of the CYP1B1 gene is very important in diagnosis and genetic counseling of PCG in this population.

**Key words:** Gen CYP1B1, primary congenital glaucoma, cytochrome P4501B1, SNP's.

### INTRODUCCIÓN

La forma hereditaria del glaucoma congénito primario (GCP) presenta un modo de transmisión autosómico recesivo. El

GCP se debe a un desarrollo anormal en el ángulo de la cámara anterior del ojo. El GCP se refiere al tipo de glaucoma que se manifiesta al nacimiento o durante los primeros meses de vida. El iris muestra una inserción anterior dentro de la malla

\*Servicios de Genética y \*\* Oftalmología, Hospital General de México, Facultad de Medicina UNAM. \*\*\*Servicio de Genética, Hospital de la Ceguera. Mexico D.F., Mexico.

Correspondencia. Dr. Sergio Cuevas Covarrubias. Servicio de Genética, Hospital General de México. Dr. Balmis 148, Doctores, 06726, México DF, México. Tel (52)5510350599, Fax (52)5510350600. Email [sergioa@servidor.unam.mx](mailto:sergioa@servidor.unam.mx)

trabecular impidiendo el flujo del humor acuoso en el ángulo iridocorneal (1). Los niños con GCP son muy sensibles a la luz y presentan blefaroespasmos, lagrimeo e hidroftalmos. También se observa aumento de la presión intraocular que produce daño al nervio óptico y finalmente ceguera. El diagnóstico oportuno de GCP es importante para evitar la pérdida visual que ocurre en el glaucoma. A pesar de que existen modelos animales para el glaucoma, el defecto en el desarrollo del ojo es desconocido. En los casos hereditarios, el GCP es una entidad genéticamente heterogénea asociada a dos loci ubicados en los cromosomas 1q25 (gen MYOC) y 2p21 (gen CYP1B1), respectivamente (2, 3). Sin embargo, la mayoría de los casos hereditarios están asociados fuertemente a mutaciones en el gen del citocromo P450 (CYP1B1) (3-9). El gen CYP1B1 está localizado en el cromosoma 2 y se compone de 3 exones y 2 intrones (10). La región codificante inicia en el exón 2 y codifica para una proteína que es miembro de una subfamilia de genes de los citocromo P450. El gen CYP1B1 se expresa en tejidos esteroideogénicos y en muchos otros tejidos incluyendo riñón, timo, bazo, cerebro, corazón, pulmón, colon e intestino (10, 11). Diversos defectos moleculares en el gen CYP1B1 se han identificado en paciente con GCP en distintas poblaciones. El objetivo del presente estudio fue analizar el gen CYP1B1 en casos aislados con GCP en una muestra de pacientes mexicanos.

## PACIENTES Y MÉTODOS

La muestra incluyó 14 casos no relacionados y esporádicos que presentaron GCP. El diagnóstico se estableció mediante los siguientes criterios clínicos: presión intraocular elevada (mayor a 20 mmHg), megalocórnea, lagrimeo excesivo, hidroftalmos, fotofobia y ruptura de la membrana de Descemet. Todos los padres de los pacientes fueron informados de las características del estudio aceptando ellos participar. El protocolo fue aprobado por el Comité de Investigación del Hospital General de México. El inicio de la sintomatología fue desde el nacimiento hasta los 12 meses de edad (media de 4.5 meses), la relación hombre:mujer fue 10:4. Los hallazgos oculares fueron similares en todos los pacientes. El manejo y respuesta terapéutica fueron parecidos en la mayoría de los casos, excepto por dos pacientes de evolución tórpida y condiciones difíciles de controlar a pesar de los tratamientos médico y quirúrgico. La presión ocular de ambos ojos se encontró entre 24 y 30 mmHg (media 28 mmHg). El hidroftalmos sólo se observó en 4 pacientes mientras la consanguinidad estuvo presente en 3 familias.

La extracción de DNA de las muestras se realizó de leucocitos periféricos como se describe previamente (12). Las condiciones y los oligonucleótidos para amplificar los exones 2 y 3 del gen CYP1B1 fueron:

DNA 500 ng, oligonucleótidos 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. 94°C por 1 min, 30 ciclos de 94°C por 1 min, \*alineamiento 55°C por 30 s

\* el alineamiento para G1Ex2A fue 62°C.

y 72°C por 2 min, con los siguientes oligonucleótidos:

<b>G1Ex2A</b>	<b>F5'</b> GCCTTCTCCTTTCTGTCCCCAGC
<b>G1Ex2A</b>	<b>R5'</b> AGCACGTGGCCCTCGAGGACTT
<b>G1Ex2B</b>	<b>F5'</b> AAGTCCTCGAGGGCCACGGCT
<b>G1Ex2B</b>	<b>R5'</b> CCACGCCTCCAGAGGCTTTAC
<b>G1Ex3</b>	<b>F5'</b> CTCCACATTAAACACCAAACAG
<b>G1Ex3</b>	<b>R5'</b> ATTTCAGCTTGCCTCTTGCTTC

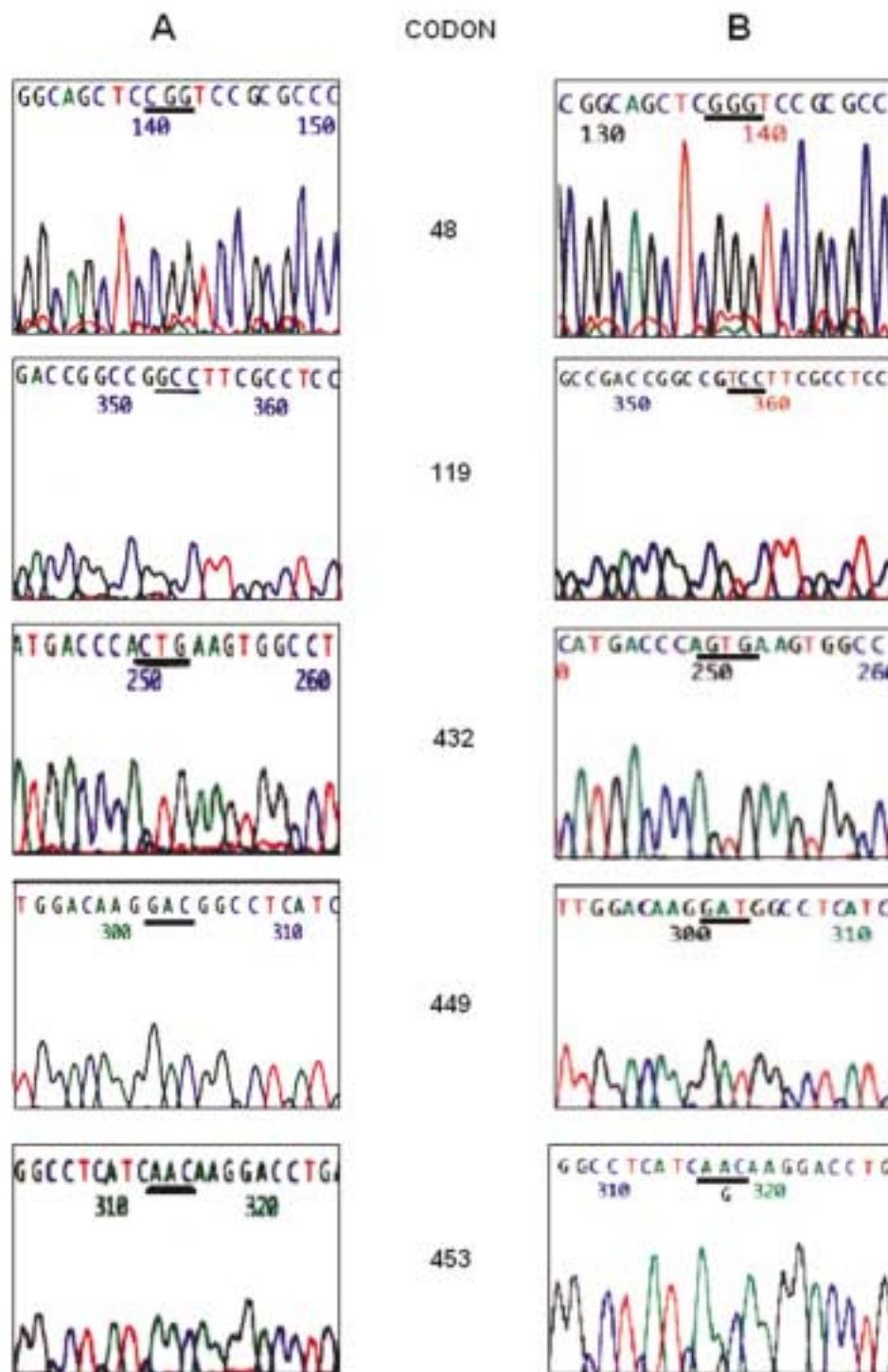
El análisis de secuenciación de DNA se llevó a cabo en un analizador genético ABI PRISM 3100 (Perkin-Elmer) de acuerdo a las indicaciones del proveedor. Todos los procedimientos se realizaron por triplicado.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Distintos polimorfismos han sido reportados en diversas poblaciones para el gen CYP1B1. De éstos, 4 de ellos resultan en sustituciones de aminoácidos: Arg48Gly, Ala119Ser, Val432Leu y Asn453Ser. El análisis de secuenciación de DNA de nuestros pacientes mostró 5 diferentes polimorfismos en la región codificante del gen CYP1B1 (cuadro 1 y figura 1). Estos polimorfismos no co-segregaron con el GCP y fueron observados también en controles sanos (n=29). Casi la mitad de nuestros pacientes (42.8%) fueron negativos para cualquier cambio en la secuencia de DNA del gen CYP1B1 incluyendo los polimorfismos (n=6) y por tanto se consideraron homocigotos para la forma silvestre del gen. Con la metodología usada en este estudio, podemos asegurar la presencia de 5 haplotipos diferentes en nuestros pacientes (cuadro 1). Los sujetos con los polimorfismos en el gen CYP1B1 eran clínicamente similares y no presentaban diferencias importantes en comparación con los sujetos que no mostraban los polimorfismos. De hecho, los pacientes más afectados (n=2) presentaron la forma silvestre del gen CYP1B1. Estos resultados sugieren la participación de otros factores genéticos o ambientales en la génesis del GCP en nuestra población. Estudios previos reportan un amplio espectro de defectos moleculares en el gen CYP1B1 en pacientes con GCP (4-9, 13-15), el principal gen asociado al GCP. Cabe mencionar que el gen MYOC, que codifica para una glicoproteína, se ha asociado también al GCP aunque de una manera más importante al glaucoma juvenil de ángulo abierto autosómico dominante

**Cuadro 1. Descripción de los polimorfismos encontrados en el gen CYP1B1 en los controles y pacientes con GCP. La lista se presenta en orden decreciente. Wt = tipo silvestre. \*Estos haplotipos no fueron confirmados**

Haplotipo	Paciente	Control
Wt/Wt	6	12
*48+119 / Wt	2	8
48+119 / 48+119	2	5
*48+119+432+449+453 / 119	1	0
48 / Wt	1	0
432/ Wt	1	2
453/ Wt	1	2



**Fig. 1.** Secuencia parcial de DNA de los codones 2 y 3 del gen CYP1B1 mostrando algunos polimorfismos (A= variantes polimórficas y B= tipo silvestre). El cambio en la secuencia de DNA se encuentra subrayado.

(GJAA) (16-18). Algunos autores consideran que el GCP y el GJAA son variantes alélicas y proponen que estos dos genes pueden interactuar de manera conjunta en el desarrollo normal del tejido ocular (19). Las mutaciones en el gen CYP1B1 en pacientes con GCP ocurren hasta en 30% de poblaciones no consanguíneas y alcanzan una ocurrencia de hasta 85%

en poblaciones consanguíneas (3, 4). Contrariamente a nuestros resultados, algunas poblaciones tienen una gran incidencia de mutaciones en el gen CYP1B1 en los casos aislados con GCP. Esta información es muy importante para ofrecer un adecuado consejo genético. Cabe mencionar que se han identificado individuos sin manifestaciones de GCP y

con mutaciones homocigotas deletéreas en el gen CYP1B1 lo cual dificulta de manera importante la tarea de ofrecer un asesoramiento genético adecuado (20). Algunos autores proponen que esta penetrancia reducida en el GCP es debida a un locus principal modificador que pudiera modificar la susceptibilidad dominante, protección recesiva y/o la susceptibilidad recesiva (20). La forma autosómica recesiva del GCP es debida probablemente a la pérdida de función de la actividad de CYP1B1, aunque el mecanismo de la enfermedad causada por el defecto de la enzima citocromo P450 es desconocida. Se ha especulado que este citocromo participa en el metabolismo de una molécula importante en el desarrollo del ojo. Aunque las mutaciones en el gen CYP1B1 son la causa más común del GCP en diferentes poblaciones, nosotros no encontramos ninguna mutación en el gen CYP1B1 en los casos esporádicos analizados en nuestra población, al menos en la muestra analizada. El análisis de otros loci es imperativo para establecer correctamente el componente genético de los casos con GCP. El conocimiento de los genes implicados en el GCP nos permitirá la identificación oportuna de los pacientes con riesgo de presentar la enfermedad y, de este modo, se podrá reducir la ceguera irreversible que afecta a estos pacientes.

Por otro lado, le genotipificación del gen CYP1B1 reveló que 42.8% de nuestros pacientes y 41.3% de los controles sanos fueron homocigotos para la forma silvestre del gen CYP1B1. La ocurrencia de este haplotipo difiere de lo reportado para otras poblaciones en las cuales la forma silvestre es más frecuente (21), sin embargo, es necesario incrementar el tamaño de la muestra para confirmar este hallazgo. Por otra parte, algunas variantes silvestres de la enzima CYP1B1 presentan importantes diferencias en la hidroxilación de los estrógenos en la posición 2-OH y 4-OH, metabolitos que son oxidados a semiquinonas y quinonas. El 4-OH-E2 forma aductos con el DNA y, de este modo, puede potencialmente causar daño a su estructura rompiendo la doble hélice (22, 23). La presencia de variantes polimórficas de la enzima CYP1B1 que muestran una actividad catalítica alta en comparación con la forma silvestre podrían condicionar una mayor susceptibilidad para el desarrollo de neoplasias (24). Estudios previos apoyan el papel de los 4-OH-estrógenos en el desarrollo de distintos tipos de cánceres (25-27), por lo que es importante identificar las variantes del gen CYP1B1 en nuestra población para así conocer la variabilidad de la enzima debida a estos polimorfismos y su relación con la incidencia de cáncer.

#### Agradecimientos

Este estudio fue apoyado por PAPIIT, DGAPA, UNAM. Proyecto no. IN229905.

#### REFERENCIAS

- Broughton WL, Fine BS, Zimmerman LE. Congenital glaucoma associated with a chromosomal defect. A histologic study. *Arch Ophthalmol* 1981; 99:481-486.
- Sunden SLF, Alward WLM, Nichols BE y col. Fine mapping of the autosomal dominant juvenile open angle glaucoma (GLC1A) region and evaluation of candidate genes. *Genome Res* 1996; 6:862-869.
- Stoilov I, Akarsu AN, Sarfarazi M. Identification of three different truncating mutations in cytochrome P4501B1 (CYP1B1) 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.
- Bejjani BA, Lewis RA, Tomey KF y col. 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.
- Plasilova M, Stoilov I, Sarfarazi M y col. Identification of a single ancestral CYP1B1 mutation in Slovak Gypsies (Roms) affected with primary congenital glaucoma. *J Med Genet* 1999; 36:290-294.
- Kakiuchi-Matsumoto T, Ishashiki Y, Ohba N y col. Cytochrome P450 1B1 gene mutations in Japanese patients with primary congenital glaucoma. *Am J Ophthalmol* 2001; 131:345-350.
- Stoilov IR, Costa VP, Vasconcellos JP y col. Molecular genetics of primary congenital glaucoma in Brazil. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43:1820-1827.
- Sitorus R, Ardjo SM, Lorenz B, Preising M. CYP1B1 gene analysis in primary congenital glaucoma in Indonesian and European patients. *J Med Genet* 2003; 40: e9.
- Colomb E, Kaplan J, Garchon HJ. Novel cytochrome P450 1B1 (CYP1B1) mutations in patients with primary congenital glaucoma in France. *Hum Mutat* 2003; 22:496.
- Sutter TR, Tang YM, Hayes CL y col. Complete cDNA sequence of a human dioxin-inducible mRNA identifies a new gene subfamily of cytochrome P450 that maps to chromosome 2. *J Biol Chem* 1994; 269:13092-13099.
- Shimada T, Hayes CL, Yamazaki H y col. Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P-450 1B1. *Cancer Res* 1996; 56: 2979-2984.
- Jimenez-Vaca AL, Valdes-Flores, Rivera-Vega MR y col. Deletion pattern of the STS gene in X-linked ichthyosis in a Mexican population. *Mol Med* 2001; 7:845-849.
- Stoilov I, Akarsu AN, Alozie I y col. Sequence analysis and homology modeling suggest primary congenital glaucoma on 2p21 results from mutations disrupting either the hinge region of the conserved core structures of cytochrome P450 1B1. *Am J Hum Genet* 1998; 62:573-584.
- Reddy AB, Panicker SG, Mandal AK y col. Identification of R368H as a predominant CYP1B1 allele causing primary congenital glaucoma in Indian patients. *Invest. Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44:4200-4203.
- Soley GC, Bosse KA, Flikier D y col. Primary congenital glaucoma: a novel single-nucleotide deletions and variant phenotypic expression for the 1,546-1,1555dup mutations in the GLC3A (CYP1B1) gene in 2 families of different ethnic origin. *J Glaucoma* 2003; 12:27-30.
- Fingert JH, Heon E, Liebmann JM y col. Analysis of myocilin mutations in 1703 glaucoma patients from five different populations. *Hum Mol Genet* 1999; 8:899-905.
- Baird PN, Craig JE, Richardson AJ y col. Analysis of 15 primary open-angle glaucoma families from Australia identifies a founder affect for the Q368STOP mutation of the myocilin gene in primary open angle glaucoma. *Hum Genet* 2003; 112:110-116.

18. Adam MF, Belmouden A, Binisti P y col. Recurrent mutations in a single exon encoding the evolutionarily conserved olfactomedin-homology domain of TIGR in familial open-angle glaucoma. *Hum Mol Genet* 1997; 6:2091-2097.
19. Vincent AL, Billingsley G, Buys Y y col. Digenic inheritance of early-onset glaucoma: CYP1B1, a potential modifier gene. *Am J Hum Genet* 2002; 70:448-460.
20. Bejjani BA, Stockton DW, Lewis RA y col. Multiple CYP1B1 mutations and incomplete penetrance in an inbred population segregating primary congenital glaucoma suggest frequent de novo events and a dominant modifier locus. *Hum Mol Genet* 2000; 9:367-374.
21. Aklillu E, Oscarson M, Hidestrand M y col. Functional analysis of six different polymorphic CYP1B1 enzyme variants found in an Ethiopian population. *Mol Pharmacol* 2002; 61:586-594.
22. Abul-Hajj YJ, Cisek PL. Catechol estrogen adducts. *J Steroid Biochem* 1988; 31:107-110.
23. Liehr JG. Genotoxic effects of estrogens. *Mutat Res* 1990; 238:269-276.
24. Hanna IH, Dawling S, Roodi N. Cytochrome P450 1B1 (CYP1B1) pharmacogenetics: association of polymorphisms with functional differences in estrogen hydroxylation activity. *Cancer Res* 2000; 60:3440-3444.
25. Watanabe J, Shimada T, Gillam EM y col. Association of CYP1B1 genetic polymorphism with incidence to breast cancer and lung cancer. *Pharmacogenetics* 2000; 10:25-33.
26. Zheng W, Xie DW, Jin F y col. Genetic polymorphism of cytochrome P450-1B1 and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9:147-150.
27. Bailey LR, Roodi N, Dupont WD, Parl FF. Association of cytochrome P450 1B1 (CYP1B1) polymorphisms with steroid receptor status in breast cancer. {Erratum: *Cancer Res*. 59:1388, 1999} *Cancer Res* 1998; 58: 5038-5041.

***Cita histórica:***

En 1980, **AB Scott** inicia el uso de toxina botulínica para ocasionar parálisis muscular temporal (*Scott AB. Botulinum toxin injection into extraocular muscles as an alternative to strabismus surgery. J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 17:21, 1980. *Scott AB. Botulinum toxin injection of eye muscles to correct strabismus. Trans Am Ophthalmol Soc* 89:734, 1981).