

112161



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
HOSPITAL GENERAL DE MEXICO O.D.

ESTUDIO CLINICO Y MOLECULAR EN UNA FAMILIA CON
GLAUCOMA CONGENITO PRIMARIO

POSTGRADO

SECRETARIA DE SALUD
HOSPITAL GENERAL DE MEXICO
BOULEVARD DE LAS AMERICAS S/N
PO BOX 7-070 MEXICO D.F.

TESIS DE POSTGRADO

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICO GENETISTA

P R E S E N T A :

MARIA DEL CARMEN CHIMA GALAN

DIRECCION DE ENSEÑANZA

DIRECTORES DE TESIS: DRA. MARIA DEL REFUGIO RIVERA VEGA
DR. SERGIO A. CUEVAS COVARRUBIAS



MEXICO, D. F.

2003

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS:

A la Dra. Kofman, por todo su apoyo y comprensión, en los momentos más difíciles de mi vida profesional y familiar.

Al Dr. Cuevas y la Dra. Rivera por la ayuda para la realización de este proyecto.

A mi familia por su amor incondicional.

Y especialmente a Mariana y a tí, por su amor y paciencia.

Entrego a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: María del Carmen

Chavez Galvan

FECHA: 27-09-12

FIRMA: [Signature]

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

**Un agradecimiento especial a Luz María González Huerta
por su asesoría técnica en este trabajo y por su amistad.**

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INDICE

	Página
1. RESUMEN _____	1
2. ANTECEDENTES _____	2
EMBRIOLOGÍA, ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DEL OJO _____	4
GLAUCOMA CONGÉNITO PRIMARIO _____	10
ASPECTOS MOLECULARES DEL GEN CYP1B1 _____	13
MUTACIONES EN CYP1B1 _____	20
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVO _____	27
4. DISEÑO DEL ESTUDIO _____	28
5. PACIENTES Y MÉTODOS _____	29
6. RESULTADOS _____	40
7. DISCUSIÓN _____	43
8. ANEXO _____	47
9. BIBLIOGRAFÍA _____	48

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESUMEN

El glaucoma congénito primario (GCP) tiene una frecuencia que varía de 1 en 5,000 a 1 en 10,000 recién nacidos vivos. Se ha estimado que del 20 al 40% de los casos de GCP son familiares. El GCP es un padecimiento genéticamente heterogéneo y generalmente se hereda con carácter autosómico recesivo. En la patogénesis del GCP el ángulo iridocorneal no está completamente desarrollado y tiene una apariencia inmadura, el iris presenta una inserción anterior en la red trabecular impidiendo el drenaje normal del humor acuoso, lo que ocasiona aumento en la presión intraocular. El cuadro clínico del GCP se manifiesta antes del primer año de vida en 85% de los casos y se caracteriza por epifora, fotofobia y blefaroespasmo, que pueden estar presentes antes de que aparezca megalocórnea y edema. Se han asociado dos loci al GCP, uno en la región 2p21 y otro en 1p36, el primero corresponde al gen *CYP11B* relacionado con el 85% de los casos de GCP y el segundo al gen *MYOC* y a genes aún no identificados. El gen *CYP11B* pertenece a una superfamilia multigénica de monooxigenasas, está constituido por 3 exones y 2 intrones y codifica para una proteína de 543 aminoácidos. Se ha demostrado que el RNAm de *CYP11B* se expresa en estructuras como el iris, la malla trabecular y el cuerpo ciliar que participan en el drenaje del humor acuoso. En el presente estudio describimos dos miembros de una familia con GCP debido a mutación en el gen *CYP11B* consistente en la delección de un par de bases en el codón 370, que origina un corrimiento del marco de lectura y un codón de paro prematuro.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANTECEDENTES

La enfermedad ocular es común en la población humana. Muchos padecimientos oculares son hereditarios, algunos son clasificados como anomalías del desarrollo mientras que otros son degenerativos asociados a la fisiología ocular anormal, aunque el límite entre ellas no está bien definido. Las malformaciones del segmento anterior en donde se han identificado mutaciones en genes reguladores de la transcripción, incluyen un componente progresivo, como en el glaucoma, catarata o distrofias corneales.¹

Los glaucomas son un grupo heterogéneo de enfermedades que combinan una presión intraocular (PIO) elevada y degeneración del nervio óptico lo que lleva a la ceguera. Se presentan en cualquier grupo de edad y cualquier población.² Las personas afectadas frecuentemente tienen una PIO mayor de 21 mmHg en ambos ojos, siendo ésta uno de los principales riesgos para el paciente. En algunos casos la PIO se encuentra normal, por lo que el diagnóstico de glaucoma se basa en la presencia de atrofia del nervio óptico asociada con defectos en los campos visuales.³

La frecuencia del glaucoma en el mundo se desconoce, pero se considera la segunda causa de ceguera en el mundo, después de la catarata. En el año 2000 se estimaron 66.8 millones de personas con glaucoma alrededor del mundo, de las cuales 6.7 millones desarrollaron ceguera.⁴

Los glaucomas se clasifican en tres categorías: de ángulo abierto y ángulo cerrado, dependiendo de los mecanismos por los que el flujo del humor acuoso es bloqueado, y una tercera, el glaucoma congénito. Los glaucomas de ángulo abierto o cerrado se refieren a la

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

configuración del ángulo irido-corneal en la cámara anterior del ojo, mientras que el glaucoma congénito (de ángulo abierto), es usado para definir uno de los muchos tipos de glaucoma del desarrollo que se presenta antes del primer año de vida. Cada una de estas categorías es a su vez subdividida en primario, cuando la causa no puede ser identificada o secundario, cuando es causado por alteraciones sistémicas.

El glaucoma primario de ángulo abierto de inicio en el adulto, representa 50% de todos los casos y tienen una progresión lenta, mientras que entre los glaucomas de origen genético, los glaucomas infantiles y juveniles son clínicamente más severos, de evolución rápida y de difícil manejo, siendo el glaucoma congénito primario (GCP) la forma más común.⁵

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

EMBRIOLOGÍA, ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DEL OJO

Los ojos son órganos sensitivos complejos que han evolucionado a partir de regiones fotosensibles situadas en la superficie ectodérmica de los invertebrados. En los vertebrados los ojos se han desarrollado a partir del ectodermo superficial y neural, así como de la cresta neural y el mesénquima mesodérmico. Dentro de su envoltura protectora cada ojo posee un estrato de receptores, un sistema de lentes para enfocar la luz sobre ellos y un sistema de nervios para conducir al encéfalo los impulsos que generan estos receptores. "

La primera manifestación del ojo en desarrollo aparece en el embrión de 22 días, en forma de dos surcos a cada lado del prosencéfalo en invaginación (fig. 1A). Al cerrarse el tubo neural, estos surcos producen las vesículas ópticas, que al ponerse en contacto con el ectodermo superficial, provocan la formación del cristalino (fig. 1B). Poco después la vesícula óptica se invagina y forma la cúpula óptica de pared doble (figs. 1C y 2A). Las capas internas y externas de la cúpula están separadas en un principio por el espacio intrarretiniano (fig. 2B), que después desaparece y las dos capas se juxtaponen (fig. 5). La invaginación comprende también una parte de la superficie inferior (fig. 2A) donde se forma la fisura coroidea, por la cual la arteria hialoidea llega a la cámara interna del ojo (fig. 3 y 6) En la séptima semana los bordes de la fisura coroidea se fusionan y la boca de la cúpula óptica se transforma en la futura pupila

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Mientras tanto, las células del ectodermo superficial se alargan y forman la placoda del cristalino (figs. 1B y 1C), que después se invagina y se convierte en vesícula del cristalino, para situarse en la boca de la cúpula óptica (figs. 2C y 3).

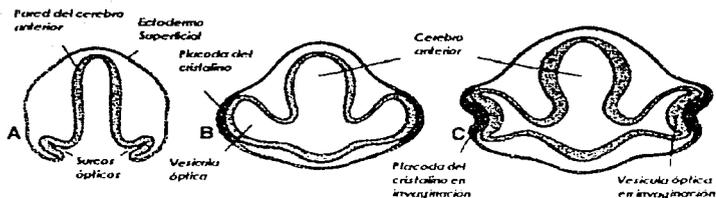


Fig.1. A. Corte transversal del cerebro anterior de un embrión de 22 días, donde se observan los surcos ópticos. B. Corte transversal del prosencefalo de un embrión de 4 semanas, donde se muestran las vesículas ópticas en contacto con el ectodermo superficial. Nótese el engrosamiento del ectodermo (placoda del cristalino). C. Corte transversal del prosencefalo de un embrión de 5 min, que muestra la invaginación de la vesícula óptica y la placoda del cristalino. (Modificado de Laganan, 2002)

La capa externa de la cúpula óptica, recibe el nombre de capa pigmentaria de la retina y la capa interna de la cúpula óptica da origen a la capa neural de la retina que se continua con la capa interna del tallo óptico. Los axones de las células ganglionares pasan al interior del tallo óptico y gradualmente lo convierten en el nervio óptico (figs. 3 y 5). Por otra parte, la porción anterior de la capa interna se divide en la porción iridea de la retina, que forma la capa interna del iris y la porción ciliar de la retina, que participa en la

formación del cuerpo ciliar. El borde de la cúpula óptica está cubierto de mesénquima, en el cual se desarrollan el esfínter pupilar y el músculo dilatador de la pupila, a partir del ectodermo suprayacente.

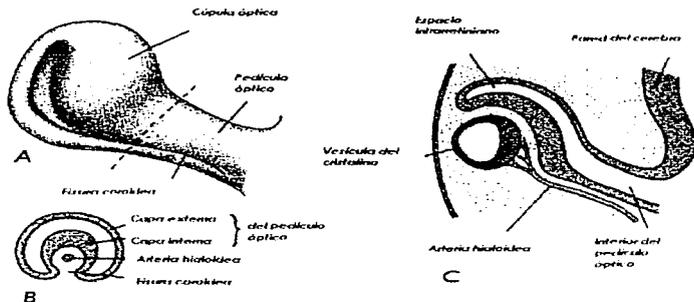


Fig. 2. A. Vista ventro lateral de la cúpula óptica y el pedículo óptico de un embrión de 6 semanas. La fisura coroidea situada en la cara inferior del pedículo óptico se adelgaza gradualmente. B. Corte transversal del pedículo óptico por la línea indicada en A, para mostrar la arteria hialoidea en la fisura coroidea. C. Corte que pasa por la vesícula del cristalino, la cúpula óptica y el pedículo óptico en el plano de la fisura coroidea. (Modificado de Lagman, 2002).

Al final de la quinta semana el primordio del ojo está rodeado completamente por mesénquima laxo (fig.3), el cual se diferencia en una capa interna que forma la coroides y una capa externa que se convierte en esclerótica (fig. 4). La diferenciación de las capas mesenquimáticas suprayacentes a la cara anterior del ojo es distinta. Por vacuolización se forma un espacio, llamado *cámara anterior* del ojo, que divide al mesénquima en una capa

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

interna por delante del cristalino y el iris, la membrana iridopupilar, y una capa externa que continua con la esclerótica, la sustancia propia de la córnea (fig. 4).

El mesénquima invade el interior de la cúpula óptica por la fisura coroidea, ahí forma los vasos hialoideos que irrigan al cristalino (fig. 4). Además, forma una delicada red de fibras entre el cristalino y la retina. Los espacios intersticiales de esta red son ocupados más tarde por una sustancia gelatinosa y transparente, el cuerpo vítreo.

La cúpula óptica se une al cerebro por el pedículo óptico, que tiene en la superficie ventral la fisura coroidea, donde se encuentran los vasos coroideos (fig.2 y 3). En la séptima semana del desarrollo la fisura coroidea se cierra y se forma un túnel dentro del pedículo óptico. Como consecuencia del número creciente de fibras nerviosas la pared interna del pedículo crece hasta fusionarse con la pared externa. De tal manera que el pedículo óptico se convierte en nervio óptico. ⁷

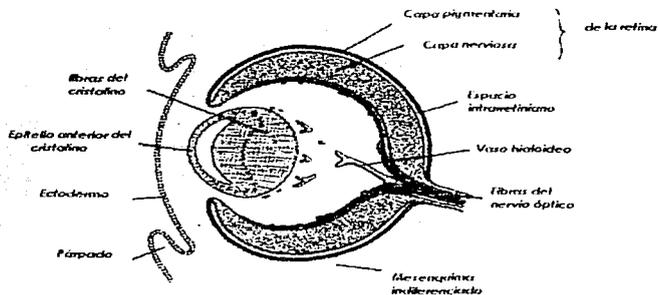


Fig. 3. Corte transversal del ojo de un embrión de 7 semanas. El primordio ocular está completamente incluido en el mesénquima. Las fibras de la porción nerviosa de la retina convergen hacia el nervio óptico. (Modificado de Lagman, 2002)

El ojo desarrollado presenta una envoltura protectora externa, la *esclerótica* que está modificada en su porción anterior para formar la *córnea* transparente a través de la cual entran los rayos luminosos al ojo. Dentro de la esclerótica esta la *coroides*, capa pigmentada y vascularizada que nutre a las estructuras del ojo. Revistiendo a las dos terceras partes posteriores de la coroides está la *retina*, el tejido nervioso que contiene las células receptoras. El *crystalino* es una estructura transparente, que se mantiene en su sitio por el ligamento circular del cristalino (zónula), que se encuentra adherida a la porción anterior de la coroides, el *cuerpo ciliar*. Este último contiene fibras musculares circulares y longitudinales que se insertan cerca de la unión corneoescleral. Frente al cristalino se encuentra el *iris*, formación pigmentada y opaca que contiene fibras musculares circulares que causan constricción de la *pupila*. El espacio entre el cristalino y la retina esta lleno de un material gelatinoso transparente llamado *humor vítreo*. El *humor acuoso* es un liquido transparente, incoloro que lleva en suspensión células de la linfa en escasa cantidad y se

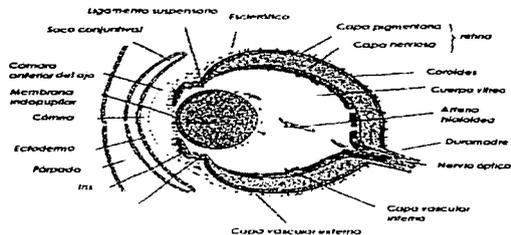


Fig. 4. Corte sagital del ojo. Obsérvese la cámara anterior del ojo, la membrana iridopupilar, las capas vasculares interna y externa, la coroides y la esclerótica (Modificado de Lagman, 2002)

forma por extravasación del plasma al nivel de los vasos sanguíneos de los procesos ciliares y del iris.

El humor acuoso se vierte a la cámara posterior, pasa después al conducto de Petit, atraviesa el cristalino y posteriormente se vierte en la cámara anterior al nivel de la pupila, o bien atravesando los espacios linfáticos del iris. Una vez en la cámara anterior, el humor acuoso se dirige hacia el ángulo iridocorneal, luego se resorbe por una red de trabéculas hacia el interior del *conducto de Schlemm* y va finalmente a las venas esclerales para reintegrarse a la circulación venosa, después de haber intervenido en la nutrición del cristalino, del iris y de la córnea (Fig. 5). Para mantener la presión dentro del ojo sano se requiere un balance entre secreción continua y drenaje a través de la malla trabecular. *

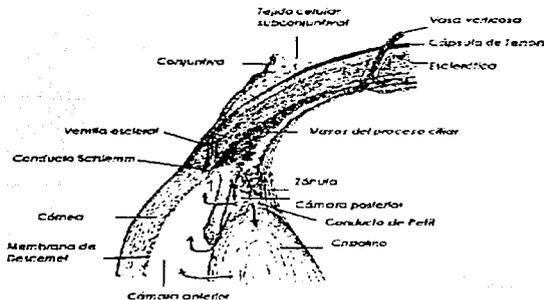


Fig. 5. Circulación del humor acuoso. 1. ángulo de la cámara anterior. Las flechas indican la dirección del humor acuoso. (Modificado de Quiroz, 1996)

GLAUCOMA CONGÉNITO PRIMARIO

El GCP es un padecimiento que se manifiesta en el período neonatal o infantil y su frecuencia aproximada varía de 1 en 5,000 a 1 en 10,000 recién nacidos vivos. En general, una parte importante de casos de GCP son familiares y presentan un patrón de herencia autosómico recesivo bien documentado (en poblaciones con alta consanguinidad se llega a presentar de forma pseudodominante).⁹

En la patogénesis del GCP el ángulo irido-corneal de la cámara anterior no se desarrolla por completo y tiene una apariencia inmadura, el iris presenta una inserción anterior en la malla trabecular y esta última se encuentra engrosada, interfiriendo con el flujo del humor acuoso, lo que ocasiona un aumento en la PIO. En los niños las capas del ojo son elásticas, de manera que la PIO elevada causa agrandamiento del globo ocular. (búfalmo), especialmente en los casos unilaterales.¹⁰

El 60 a 70% de los pacientes afectados con GCP son del sexo masculino, en 65-85% de los enfermos ambos ojos están afectados y en 85% de los casos el inicio del padecimiento se presenta antes del año de vida.¹¹

Clinicamente el GCP presenta las siguientes características: 1) PIO elevada, 2) agrandamiento de la cámara anterior, 3) edema y opacificación de la córnea, con ruptura de la membrana de Descemet, 4) adelgazamiento de la esclera anterior y atrofia del iris, 5) depresión anormal de la cámara anterior, 6) segmento posterior estructuralmente normal, 7) fotofobia, blefaroespasmus y epifora. El diagnóstico de GCP se realiza generalmente en los primeros meses de vida.¹²

A la exploración física los pacientes tienen ojos y córneas grandes, las córneas presentan estrias de Haab, que son hendiduras en la membrana de Descemet. En la gonioscopia, el ángulo irido-corneal está pobremente desarrollado, típicamente los pacientes son miopes y se demuestra una excavación del nervio óptico.¹³

El diagnóstico y tratamiento precoces influyen sobre el pronóstico de la enfermedad. Por regla general, los lactantes diagnosticados y tratados antes de presentar megalocórnea y edema corneal responden bien al tratamiento quirúrgico y tienen mejor pronóstico.

Aunque en ocasiones el glaucoma infantil remite espontáneamente, el tratamiento exitoso de la enfermedad exige la intervención quirúrgica. Las técnicas más utilizadas y que consiguen mayor éxito son la goniotomía (corte de la red trabecular a través de la cámara anterior) o la trabeculotomía (introducción de una cánula por el canal de Schlemm para llegar a la cámara anterior y permitir el drenaje adecuado del humor acuoso). Previo a la cirugía, se instaura tratamiento médico con pilocarpina tópica al 2%, adrenalina al 0.5% y acetazolamida por vía oral.

En los lactantes, a diferencia de los adultos, la excavación de la papila óptica que provoca pérdida de la visión es reversible con el tratamiento oportuno.¹⁴

El GCP es un padecimiento genéticamente heterogéneo. Estudios de ligamiento mostraron dos loci importantes para el GCP, uno en 2p21¹⁵ y otro en 1p36.¹⁶ El primero corresponde al gen *CRY1B* y el segundo al gen *MYOC* y a genes aún no identificados, por mapeo se situó a esta región en 1p36.2-p36.1, adyacente a los loci de neuroblastoma y Charcot-Marie-Tooth tipo 2A. Mutaciones en el gen *CRY1B1* representan 85% de los casos de GCP, indicando que son la causa más común de GCP.¹⁷

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Existen otras formas de glaucoma de inicio temprano asociadas a anomalías congénitas del segmento anterior del ojo y que no son consideradas como GCP. Estas formas han sido mapeadas en los cromosomas 6p25¹⁸ y 4q25.¹⁹ En el gen *Forkhead* (*FHL7*) (un factor de transcripción "fork head") localizado en 6p25, se han encontrado alteraciones en dos pacientes con glaucoma. En el primer caso, el paciente presentó una translocación balanceada con puntos de ruptura en 6p25 y 13q13.²⁰ Y en el segundo caso se demostró una delección en este gen en un paciente con GCP, defectos de la cámara anterior y una microdelección cromosómica que implicó la región 6p25.¹⁸

En familias con disgenesia iridocorneal o anomalía de Axenfeld-Rieger, se identificaron mutaciones en el gen *PITX2/RIEGL* perteneciente a los genes homeobox localizado 4q25.¹⁹ La disgenesia iridocorneal causa glaucoma en la niñez en el 50% de los casos y puede manifestarse sólo como embriotoxon posterior (anillo de Schwalbe prominente), anomalía de Axenfeld (bandas de iris adheridas a un anillo de Schwalbe prominente), anomalía de Rieger (anomalías del ángulo camerular e hipoplasia del estroma del iris) o de forma sindrómica, acompañándose además de alteraciones dentales, dismorfias faciales y anomalías umbilicales.²¹

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ASPECTOS MOLECULARES DEL GEN *CYP1B1*

El gen *CYP1B1* pertenece a una superfamilia multigénica con función de monooxigenasas, responsable de la primera fase del metabolismo de diferentes sustratos. Inserta un átomo de oxígeno atmosférico a estas moléculas, creando así un nuevo grupo funcional (-OH, -NH₂, -COOH) para hacerlas hidrosolubles y más fáciles de excretar.

Los citocromos P450 son hemoproteínas localizadas en la membrana del retículo endoplásmico de los hepatocitos y de otras células corporales. Las enzimas P450 están constituidas de una parte proteica (apoproteína) y un grupo prostético (hem).

Dentro de su estructura general posee un sitio para atrapar al oxígeno, el dominio hem, y otro para unirse a sus sustratos junto a la región de unión al hem.

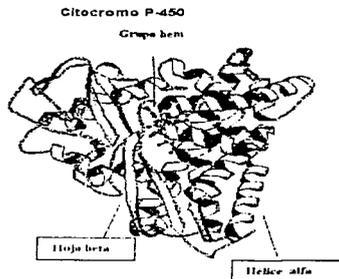


Fig. 6. Estructura general de las enzimas citocromo P450 (Modificado de Bioquímica Lentlinger, 1993).

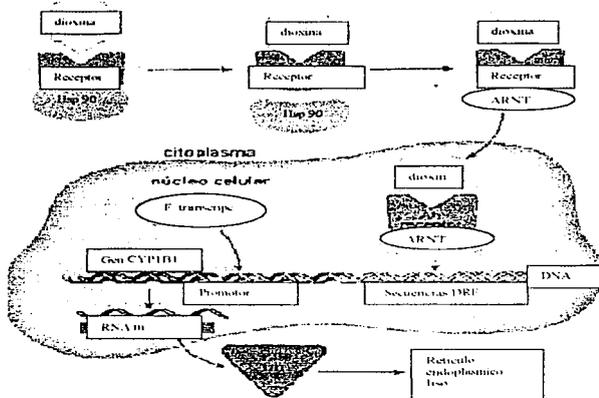


Fig.7. La dioxina se une al receptor Ah y posteriormente al complejo AhR/ARNT para unirse a los motivos DRE, los cuales actúan como potenciadores de la transcripción de CYP1B1 (Modificado de Shugart, 1996).

La estructura tridimensional de las enzimas P450 se caracterizan por la presencia de hélices α y hojas β (Fig. 6).^{22,23}

La superfamilia génica citocromo P450 contiene 70 familias génicas constituidas por aproximadamente 100 enzimas que se han encontrado en bacterias, plantas, levaduras, insectos y vertebrados. Hay 14 familias en mamíferos.²⁴ En humanos, inicialmente se pensó que la familia P4501 estaba compuesta por dos miembros, designados como CYP1A1 y CYP1A2. Estos genes son ubicuos y tienen una actividad catabólica similar. Sin

embargo, se encontró un nuevo miembro, CYP1B1, ²⁵ el cual se identificó a través del estudio de la expresión de genes que codifican proteínas implicadas en el metabolismo de xenobióticos, respuestas inflamatorias agudas, manejo del estrés oxidativo y la regulación del crecimiento, como lo son los citocromos P450. La expresión de estos genes se altera por un tóxico ambiental el 2,3,7,8-tetraclorodibenzeno-p-dioxina (TCDD o dioxina) La dioxina es un potente carcinógeno que en el humano produce cloracné, caracterizado por la formación de quistes foliculares que se acompañan de hiperqueratinización de la epidermis interfolicular. Se aisló un gen nuevo del cDNA de queratinocitos humanos que responde a la dioxina, identificado como un nuevo miembro de la superfamilia de citocromos P450, el cual se designó como citocromo P4501B1. ²⁵

El efecto biológico de la dioxina es mediado por su alta afinidad y unión saturable a su receptor. ²⁴ TCDD se une y activa una proteína receptora, designada AhR (receptor Aril hidrocarburo), un miembro de la familia de factores de transcripción hélice-asa-hélice, que libera una proteína de choque térmico (hsp 90), la cual es reemplazada por una segunda proteína ARNT (translocador nuclear del receptor Aril hidrocarburo). El heterodímero AhR/ARNT resultante activa la transcripción génica a través de su unión a los motivos de reconocimiento que se encuentran dentro de los elementos de respuesta a dioxina (DRE), localizados en el extremo 5' del promotor del gen CYP1B1 (Fig. 7). ^{24,26}

CYP1B1, que difiere de los otros dos miembros de la superfamilia P450, en el número de exones (3 vs 7), localización cromosómica (2 vs 15) y el sitio donde inicia su transcripción. Por lo que fue designado como único miembro de la subfamilia CYP1B. ²⁵

Mediante mapeo de cromosomas de alta resolución e hibridación in situ con fluorescencia (FISH) se llegó a la localización precisa de CYP1B1 en la región cromosómica 2p22-p21 (Fig. 8). ²⁵

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El gen del citocromo P4501B1 está constituido por 3 exones (371, 1044 y 3707 pb de longitud) y 2 intrones (390 y 3032 pb). El ADN codificante de *CYP1B1* tiene 5.1 kb, su marco de lectura inicia en el segundo exón y tiene 1,629 pb de longitud (Fig.9).²⁵

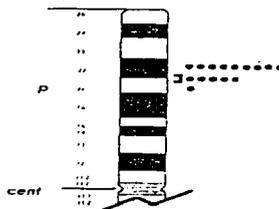


Fig. 8. Mapeo cromosómico de alta resolución de *CYP1B1* en 2p21-22. (Modificado de Tang, 1996).



Fig. 9. Organización del gen humano *CYP1B1* (Modificado de Tang, 1996)

CYP1B1 carece de la caja consenso TATA en la región del promotor y en su lugar tiene un sitio de inicio de la transcripción (TIS) localizado en el nucleótido 27, corriente abajo de una secuencia similar a la caja TATA (TTCGACTCT). A 2.5 kb del extremo 5' del TIS se encuentran 9 motivos DRE (Dioxin responsive enhancers) necesarios para la unión del heterodímero AhR/ ARNT, formado en respuesta a la activación de AhR por la dioxina (TCDD) y cuya secuencia es 5'-GCGTG-3'. Los motivos DRE son potenciadores de la expresión de *CYP1B1*. Además, hay 4 motivos DRE en el primer intrón, 3 en la región codificante del exón 2 y 5 en el segundo intrón, sin embargo, la función de estos motivos se desconoce.²⁷

La superfamilia de citocromos P450 presenta estructuras conservadas en el extremo carboxilo, en el caso de P4501B1 se encuentran dentro de la región CCS (conserved core structures) en el exón 3, e incluyen la hélice J, la hélice K, la región "serpenteada" y la región de unión al grupo hem.^{28,29} En la hélice K los aminoácidos Glu387 y Arg390 forman una secuencia consenso GluXXArg totalmente conservada en los citocromos P450, indicando que este motivo es esencial para la función normal de la molécula. En la familia CYP1 el codón 469 codifica una arginina o lisina, ambos son aminoácidos básicos, se encuentran cargados positivamente y preceden a la cisteína invariante de la posición 470, la cual se encuentra dentro de la región de unión al hem (Fig. 10).³⁰

Las hélices D, E, I y L, así como las hojas $\beta 1$ y $\beta 2$ que participan en el plegamiento de la molécula, también se encuentran conservadas.³¹

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

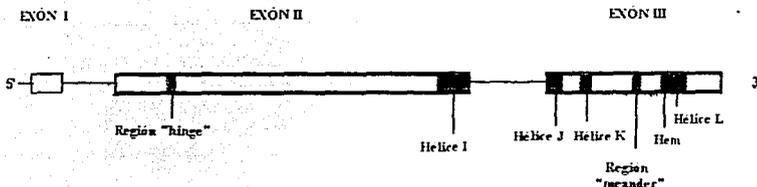


Fig. 11. Estructuras conservadas en CYP1B1 (Modificado de Stoilov, 1998)

CYP1B1 se expresa constitutivamente en las glándulas suprarrenales, ovario y testículo, aunque su expresión puede ser potenciada por hidrocarburos aromáticos planos, adrenocorticotrópicos y hormonas peptídicas. Se considera que *CYP1B1* está implicado en el metabolismo de xenobióticos y posiblemente de hormonas esteroideas por su patrón de distribución tisular.^{34,35} Además, la expresión de *CYP1B1* se ha demostrado en el ojo fetal y adulto, especialmente en el iris, la red trabecular y el cuerpo ciliar, estructuras que participan en la secreción del humor acuoso y en su drenaje adecuado,³⁶ por lo que se le relacionó con el GCP.

Por otra parte, se ha observado que el citocromo P4501B1 es una enzima importante en la activación de diversos procarcinógenos³⁵ y se encuentra activo en el metabolismo del estradiol,³⁷ así como del benzopireno y del 7,12 dimetilbenzoantraceno (7,12-DMBA) procarcinógenos conocidos. *CYP1B1* se expresa en un nivel alto en diversos cánceres humanos incluyendo el cáncer de piel, cerebro, testículo³⁸ y mama³⁹ en comparación con otros tejidos.

La activación del 17-beta-estradiol (E2) a través de la formación de metabolitos de catecol-estrógenos, se ha considerado como un factor participante en el cáncer de mama y se ha sugerido que la predisposición al cáncer de mama mediado por estrógenos, se relaciona con los polimorfismos encontrados en *CYP1B1* que difieren en su capacidad de hidroxilación.⁴⁰

El estradiol es hidroxilado por *CYP1A1* y *CYP1B1* a catecol-estrógenos y a derivados de 2-hidroxi y 4-hidroxi-estrógenos, los cuales son oxidados a semiquinonas y quinonas, que posteriormente pueden formar aductos de DNA.^{41,42} *CYP1B1* actúa principalmente en la posición C-4 del estradiol⁴³ para formar 4-OH E2, compuesto que a diferencia del 2-OH E2, causa daño oxidativo y rupturas de doble cadena del DNA.⁴⁴ Además, se ha demostrado mayor hidroxilación de 4 OH-E2 en tejido tumoral en el cáncer de mama.⁴⁵ Estos hallazgos apoyan el papel causal de 4-OH E2 en el cáncer mamario e implican a *CYP1B1* como participante en el proceso.

MUTACIONES EN CYP11B1

El análisis de 5 familias consanguíneas con GCP de origen Turco identificó las primeras alteraciones del gen *CYP11B1* en el GCP. Estas corresponden a tres diferentes mutaciones sin sentido, una delección de 13 pb en el exón 3, una inserción de una citosina en el exón 2 y una gran delección que afecta el extremo 5' del exón 3 y la región intrónica adyacente.¹⁷

En un estudio posterior se analizaron las secuencias codificantes del gen *CYP11B1* en 22 familias con GCP, originarias de Turquía, EUA, Canadá y Reino Unido, y 100 individuos sanos seleccionados al azar. Se identificaron 16 mutaciones y 6 polimorfismos, ilustrando una extensa heterogeneidad alélica.³⁶ Tabla 1.

Las posiciones afectadas por esos cambios se evaluaron con la construcción de un modelo tridimensional del extremo C-terminal de *CYP11B1*. Esas mutaciones afectaron la región de bisagra y/o las estructuras centrales conservadas (CCS) que determinan el plegamiento y la capacidad de unión del grupo hem de las moléculas P450. En contraste, todos los polimorfismos se encontraron fuera de la CCS y estaban poco conservados.

En un estudio posterior de 25 familias árabes con GCP se encontraron 3 mutaciones diferentes a las reportadas. En el exón 2 la transición 3987G→A y en el exón 3 dos mutaciones puntuales, 7957G→A y 8242C→T. De acuerdo a los datos clínicos y moleculares se encontró penetrancia disminuida del padecimiento, ya que 18 individuos no afectados tuvieron haplotipos idénticos a los de sus parientes enfermos.⁴⁶

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Código	Exón	Mutación	Efecto	Localización
A	2	G517→C	Trp57→Cis	Región bisagra
B	2	G528→A	Glu→Glu	Región bisagra
C	2	847insT	Cambio en el marco de lectura	...
D	2	G1187→T	Glu281→alto	...
E	2	1209insT	Cambio en el marco de lectura	...
F	3	Gran del	Errores en la remoción de intrones	...
G	3	1410del13	Cambio en el marco de lectura	...
H	3	G1439→T	Glu365→Trp	Hélice J
I	3	C1482→U	Pro379→Leu	Hélice K
J	3	G1505→A	Glu387→Lis	Hélice K
K	3	G1515→A	Arg390→His	Hélice K
L	3	1546dup10	Cambio en el marco de lectura	...
M	3	C1656→T	Pro437→Leu	Región serpenteante
N	3	G1691del	Cambio en el marco de lectura	...
O	3	C1751→T	Arg469→Trp	Región de unión al hem
P	3	1749dup27	Cambio en el marco de lectura	...

Tabla 1. Mutaciones en CYP1B1 causantes de GCP

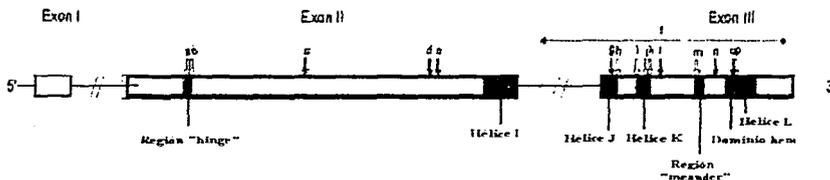


Fig. 12. Cambios en la secuencia observados en CYP1B1. (Modificada de Stoilov, 1998).

En otro estudio en 37 familias árabes con GCP, se confirmó penetrancia disminuida y diferencias en la edad de inicio del padecimiento. Se identificaron 8 mutaciones

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

diferentes, las más comunes fueron G61E, R469W y D374N, constituyendo el 72%, 12% y 7%, respectivamente. Se detectaron otras 5 mutaciones, 2 deleciones y 3 mutaciones de sentido equivocado. En 22 familias de las 37, 40 individuos no afectados tuvieron mutaciones y haplotipos idénticos a los de sus familiares afectados, 2 de los cuales se diagnosticaron posteriormente y otros 2 presentaron datos oftalmológicos consistentes con formas leves de glaucoma.⁴⁷

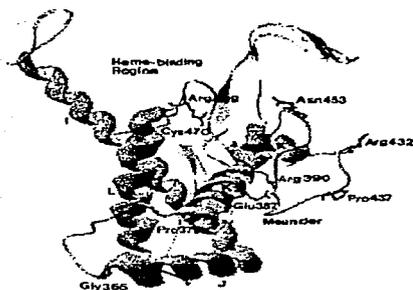


Fig. 1.3. Modelo tridimensional del extremo C-terminal de la proteína CYP11B1. Las hélices alfa se indican con letras mayúsculas y son rojas, las cadenas beta son anillos y las colas son grises. Los residuos de aminoácidos afectados están en azul y los residuos polimórficos, en verde. La cisteína invariante en rojo. (Modificado de Stoitov, 1998).

El estudio de una gran familia consanguínea con GCP en seis generaciones en una comunidad canadiense, reportó dos diferentes mutaciones en el exón 3 de *CYP11B1*, una

delección de 13 pb en el nucleótido 1410 y una transición 1505G→A, segregando juntas con la enfermedad. El heterocigoto compuesto presentó un fenotipo más leve, comparado con los homocigotos que tuvieron sólo la delección de 13 pb.⁴⁸

En un estudio de 11 pacientes japoneses no relacionados con GCP no familiar, se encontró la inserción de una G en el nucleótido 1620 de la secuencia del gen *CYP11B1*, causando un corrimiento en el marco de lectura y un codón de terminación prematura.^{49,50} Un segundo estudio de GCP en pacientes no relacionados fue realizado en 65 pacientes japoneses y se reportaron 7 mutaciones nuevas, 3 causaron un alto prematuro en el marco de lectura abierto. Las otras 4 fueron mutaciones de sentido equivocado (Asp192Val, Ala330Phe, Val364Met y Arg444Gln) localizadas en la región CCS.⁵¹

El análisis del gen *CYP11B1* en tres pacientes alemanes con GCP reportó una transición C/T en el codón 355, que causó una proteína truncada de 188 aminoácidos en un paciente, una mutación heterocigota compuesta consistente en una delección de 12 pb (del nucleótido 1410-1422) y una duplicación de 9 pb (del nucleótido 1546-1555) y por último dos mutaciones heterocigotas de sentido equivocado, Ala433Gly y Glu229Lis.⁵²

En 8 pacientes de cinco familias consanguíneas de la India, se identificaron 5 mutaciones distintas en el gen *CYP11B1*, un corrimiento en el marco de lectura y una mutación de sentido equivocado en un heterocigoto compuesto resultaron en dos mutaciones no observadas previamente.⁵³

El estudio del gen *CYP11B1* en 32 pacientes de Marruecos con GCP aislado, reportó en 11 pacientes 2 mutaciones: una delección de una G en la posición 4339, causando un corrimiento del marco de lectura en el residuo 179 mutación de sentido equivocado G61E, esta última reportada en pacientes turcos y árabes.⁵⁴

En el presente año se realizó un estudio de un pacientes con GCP aislado y una familia con GCP, de diferente origen. Reportó en un caso aislado una delección homocigota de una C (en el nucleótido 622) dentro de una tetrada de citosinas, lo que llevó a un paro prematuro en el codón 93. En los casos familiares se encontró una duplicación de los nucleótidos del 1546 al 1555.⁵⁵

Cabe mencionar el estudio de una familia con glaucoma de inicio temprano con transmisión AD y segregación de mutaciones en los genes *MYOC* y *CYP1B1*. El gen *MYOC* codifica una glicoproteína de 504 aminoácidos, conocida como miocilina que se expresa en el iris, el cuerpo ciliar, la red trabecular, células fotorreceptoras de la retina y en astrositos del nervio óptico. Mutaciones en este gen se han encontrado en pacientes con glaucoma juvenil de ángulo abierto, sin embargo el papel de la miocilina mutante en la fisiopatología del glaucoma aún se desconoce. La expresión fenotípica de estos casos fue diferente a la de los pacientes con mutaciones en *MYOC* o *CYP1B1* únicamente. En esta familia, la edad de inicio del padecimiento en los portadores de mutaciones en *MYOC* fue de 51 años, mientras que los portadores de mutaciones en ambos genes (*MYOC* y *CYP1B1*) presentaron glaucoma a los 27 años en promedio. Se propone que *CYP1B1* puede actuar como modificador de la expresión de *MYOC* y que ambos interactúan en una vía metabólica común, correspondiendo a un tipo de herencia bigénica en el GCP.⁵⁶

Además, mutaciones en *CYP1B1* han sido observadas en el glaucoma secundario, como es el caso de un paciente con anomalía de Peter, caracterizada por una alteración de la porción central de la córnea, en la membrana de Descemet y en el estroma corneal que produce opacificación corneal, así como catarata secundaria al contacto de la córnea con el cristalino, anomalías del ángulo camerular y glaucoma infantil, en 50% de los casos. En

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

dicho paciente se reportó una mutación de sentido equivocado 3807T→C y una mutación sin sentido 3976G→A, en el exón 2 del gen.⁵⁷

Por otra parte, se han identificado diversos polimorfismos en el gen *CYP1B1*, 6 de ellos en la población Anglo-Americana^{36,58} y 3 en la población Africana,⁵⁹ de los cuales 5 causan sustituciones de aminoácidos. (Tabla 2). El estudio de los diferentes haplotipos encontrados ha mostrado que las variantes enzimáticas que presentan los polimorfismos Arg48Gli, Ala119Ser y Asn453Ser muestran mayor actividad de hidroxilación.^{40,59}

Polimorfismo	Posición	Cambio
1	48	Arg→Gli
2	119	Ala→Ser
3	432	Val→Leu
4	443	Ala→Gli
5	453	Asn→Ser

Tabla 2. Polimorfismos de CYP1B1 que causan sustituciones de aminoácidos.

Se considera que estas alteraciones heredadas de la actividad de CYP1B1 definen las diferencias en el metabolismo de estrógenos y explican las diferencias interindividuales en la predisposición a cáncer de mama asociada con la carcinogénesis mediada por estrógenos.^{40,59}

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION

El glaucoma es un padecimiento importante en la patología ocular, ya que es considerado la segunda causa de ceguera en el mundo. En los últimos años, el GCP ha sido estudiado por la alta frecuencia que se ha presentado en algunas poblaciones, en quienes se ha corroborado una transmisión autosómica recesiva del padecimiento. Los avances en la metodología molecular han llevado al conocimiento de los genes causales, y en algunos casos, de los mecanismos patogénicos.

Actualmente, no existen estudios en nuestra población de la participación del gen *CYP1B1* en el GCP, estableciéndose la necesidad de iniciar su estudio en nuestro medio para enriquecer lo que se conoce a nivel internacional de esta enfermedad.

La identificación del defecto molecular permitirá ofrecer un asesoramiento genético adecuado y profundizar en el conocimiento del GCP.

Con base en lo anterior el planteamiento del problema es:

¿Cuáles son las alteraciones que ocurren en el gen *CYP1B1* en una familia con Glaucoma congénito primario?

OBJETIVO

Identificar alteraciones moleculares del gen *CYP1B1* en una familia con glaucoma congénito primario.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISEÑO DEL ESTUDIO

Tipo de Estudio:

Reporte de casos.

Selección de los sujetos de estudio:

Familia diagnosticada con GCP. La familia incluye a los padres, dos propóritas y dos hermanos no afectados.

Grupo control: diseñado para descartar los posibles polimorfismos en el gen *CYP11B1*. Se invitó a sujetos sanos a quienes se les explicó el proyecto y su participación consistió en proporcionar una muestra de sangre para el análisis del gen. Se consideró polimorfismo cuando la mutación se presentaba en individuos sanos, fuera de regiones críticas para la enzima, no sean mutaciones previamente reportadas en la enfermedad y que la mutación no altere la secuencia de aminoácidos de la proteína.

Criterios de inclusión:

Diagnóstico clínico de GCP.

Criterios de exclusión:

Individuos que no deseen participar en el estudio.

Criterios de eliminación:

Cuando no sea posible el procesamiento de las muestras.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Variables**Independiente:** Glaucoma congénito primario**Dependiente:** Mutaciones encontradas en el gen *CYP11B1*.**Definición operativa de variables:**

Glaucoma congénito primario: Aumento de la presión intraocular mayor de 20 mmHg identificada antes del año de vida, acompañada por hallazgos clínicos característicos del GCP (megálocórnea, epífora, cámara anterior profunda y alteraciones angulares características)

Mutación: Cambio en la secuencia normal de nucleótidos del gen *CYP11B1*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

PACIENTES Y METODOS

La familia estudiada incluyo a los padres, dos pacientes y dos hermanos no afectados, originarios del estado de Veracruz y sin antecedentes de importancia para el padecimiento. Los padres son consanguíneos (primos segundos) y no están afectados con GCP. Las propósitas son dos hermanas de 8 y 13 años de edad. El árbol genealógico se muestra en la fig. 14.

Paciente 1:

Femenino de 8 años de edad que inicia su padecimiento a los 2 meses de vida con epifora y blefarospasmo. A los 3 años fue intervenida quirúrgicamente, sin que se obtengan datos sobre la naturaleza de la intervención. A la exploración física en el ojo derecho (OD) alcanza una visión de movimientos a 30 cm, cornea 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 a los 360 grados, iridectomía quirúrgica permeable a las 12, 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 PIO de 18 mmHg. En el ojo izquierdo (OI) la córnea es transparente, vesícula filtrante elevada, discretamente

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

vascularizada, iris anófico, aterciopelado sin criptas, pupila oblicua, cristalino transparente, ángulo de inserción anterior de la raíz del iris. En el fondo de ojo (FO) papila redonda de coloración rosa naranja, excavación 8/10, vasos nasalizados discretamente, PIO de 22 mmHg

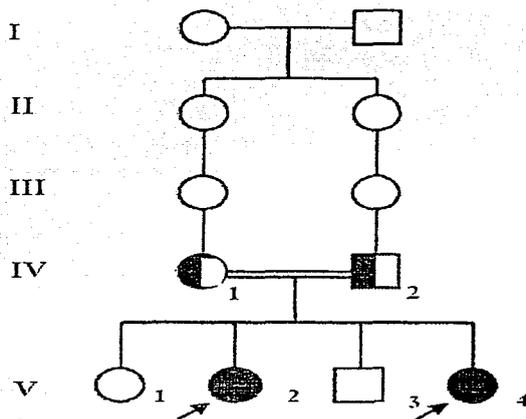


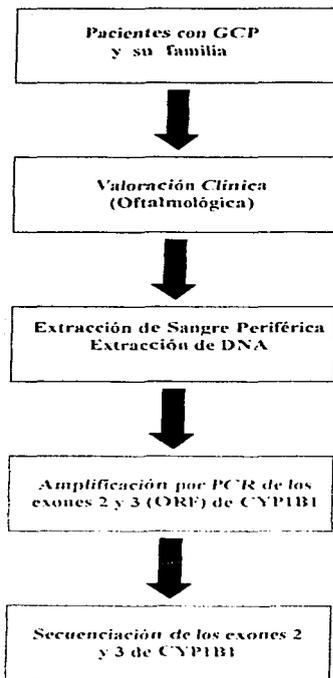
Fig. 14. Árbol genealógico. IV-1 y IV-2 padres consanguíneos y V-2 y V-4 propositas

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Paciente 2:

Hermana de la paciente 1, de 13 años de edad que inicia su padecimiento a los 2 años de edad con epifora y blefárospasmo. 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. PIO de 40 mmHg. En el OI visión de movimientos a 2 metros, conjuntiva con vesícula filtrante superior, córnea con opacidad central, puntillito epitelial moderado, iris atrófico, 2 iridectomías quirúrgicas en los meridianos de las 11 y 2, sinequias posteriores en el sector superior, pigmento en la cara anterior del cristalino, implantación anterior de la raíz del iris. El FO con palidez moderada de la papila, vasos nasalizados, excavación 6/10. PIO de 30 mmHg.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MÉTODOS**PROCEDIMIENTO GENERAL**

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Extracción de sangre periférica:

Se extrajo de forma aseptica 5 ml de sangre periférica y se colocó la muestra sanguínea en un tubo de ensaye con EDTA. Posteriormente se identificó la muestra con el nombre completo del paciente, edad y sexo, diagnóstico e Institución de procedencia.

EXTRACCIÓN DE DNA

La extracción del DNA se realizó por el método salino ^{60,61} y de acuerdo al siguiente procedimiento:

1. Transferir 3 ml de sangre a un tubo cónico de 15 ml y agregar un volumen igual de amortiguador TTS (Tris-Tritón-Sacarosa), el Tris con pH 7.6. Invertir el tubo varias veces.
2. Centrifugar a 3000 rpm/ 6 minutos y decantar con cuidado
3. Agregar al botón 1 ml de amortiguador TTS. Agitar resuspendiendo el botón y pasar a un microtubo de 1.5 ml. Agitar hasta homogeneizar.
4. Centrifugar a 10,000 rpm/ 2 minutos en microcentrifuga. Decantar, añadir 1 ml de amortiguador TTS y resuspender.
5. Centrifugar a 10,000 rpm/ 2 minutos en microcentrifuga (repetir de dos a tres veces el paso anterior)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6. Al botón limpio agregar 570 μl de NaCl 5mM. Agitar 2 minutos y colocar 30 μl de SDS (Dodecil Sulfato de Sodio) al 10%. Agitar 5 minutos. Observar si hay consistencia viscosa y agregar 200 μl de NaCl saturado y agitar 10 minutos
7. Centrifugar a 11,500 rpm/ 20 minutos a 4°C. Decantar el sobrenadante a un tubo estéril de 13x100 mm.
8. Añadir 2 ml de etanol absoluto a -20°C para precipitar el DNA.
9. Tomar el DNA con una varilla de vidrio, lavarlo con etanol al 70%. Dejar evaporar el etanol en condiciones estériles y posteriormente resuspender el DNA en un microtubo con 250 μl de agua estéril, colocar en baño maría a 60°C durante 2 horas.

Cuantificación del DNA

La cuantificación del DNA se realizó mediante análisis espectrofotométrico ⁶² por el método de Warburg-Christian, ⁶³ el cual consiste en determinar la absorbancia de dos longitudes de onda 260 nm y 280 nm, correspondientes a la absorbancia de ácidos nucleicos y proteínas, respectivamente. Dicha concentración se calcula a una dilución 1:140 de la muestra y de acuerdo a la siguiente fórmula:

Concentración de DNA ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) = $A_{260} \times (\text{dilución}) - 1 \times 0.05$

La cantidad total de DNA (en μg) se calcula:

μg totales de DNA = concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) \times volumen total (μl)

Además la relación 260/280 permite determinar la calidad de la muestra, considerando que la lectura a 260 nm corresponde al DNA y 280 nm corresponde a la fracción proteica, una relación 1.8 es ideal para el procesamiento de la muestra.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AMPLIFICACIÓN DEL GEN *CYP11B1* POR PCR

Mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se amplificó la región codificante del gen *CYP11B1*. De acuerdo al tamaño de los exones se diseñaron 3 pares de oligonucleótidos para la amplificación del gen, 2 pares para el exón 2 y uno para el 3. ⁶⁴ Tabla 3.

Las condiciones generales para la PCR fueron: 500 ng de DNA, 0.4 μ M de oligonucleótidos, 0.08 mM de dNTP's, 1.5 mM de MgCl₂, buffer 1x, 1.5 U de Taq Pol. DMSO al 10% y agua para llevar a un volumen final de 50 μ l. Pre calentamiento a 94°C por 5 minutos, desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, 28 ciclos con alineación a 62°C por 1.5 minutos, elongación a 72°C durante un minuto y extensión final a 72°C durante 5 minutos.

Los productos de la PCR se colocaron en un gel de agarosa al 1.5% con BrEt (bromuro de etidio) a una concentración menor de 5 μ g/ μ l y fueron separados en base al desplazamiento de la molécula (DNA) cargada en un campo eléctrico. ⁶⁵ A través de este método fue posible observar en un transiluminador de luz ultravioleta, la amplificación de los exones 2 y 3 del gen *CYP11B1* de acuerdo al tamaño esperado.

Región	Oligonucleótidos	Temperatura Alineamiento	Tamaño
Exón 2			
2AF	5' GCC TTC TCC TTT CTG TCC CCA GC	62°C	560 pb
2AR	3' AGC ACG TGG CCC TCG AGG ACT T		
2BF	5' AAG TCC TCG AGG GCC ACG GCT	55°C	580 pb
2BR	3' CCA CGC CTC CCA GAG GCT TTA C		
Exón 3			
3F	5' CTC CAC ATT AAA CAC CAA ACA G	55°C	632 pb
3R	3' ATT TCA GCT TGC CTC TTG CTT C		

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para el análisis del gen *CYP11B1*

Purificación de templados para secuenciar

Los fragmentos amplificados se purificaron por elusión, de acuerdo a las instrucciones del proveedor del KIT QUIAEX II (Química Valaner Cat. No. 20051), para remover dNTPs, oligonucleótidos, enzima, agarosa, etc.

Procedimiento

- 1 Colocar amortiguador QN1 (3 veces en volumen el peso de la banda de gel) y 5µl de resina QIAEX II y mezclar con vortex
- 2 Incubar por 10 minutos a 55°C (mezclando la muestra cada 3 minutos)
- 3 Centrifugar a 10,000 rpm durante 1 minuto y decantar
- 4 Colocar 500 µl de amortiguador QN1 y mezclar con vortex

5. Centrifugar 1 minuto a 10,000 rpm, decantar y eliminar los residuos de buffer
6. Agregar 500 μ l de amortiguador PE, mezclar, centrifugar a 10,000 rpm por 1 minuto y decantar (este paso se repite 2 veces)
7. Secar la muestra por efecto de temperatura a 50°C
8. Resuspender la muestra en 15 μ l de agua inyectable y se dejar eluir durante 10 minutos a 55°C
9. Centrifugar a 10,000 rpm por 2 minutos y separar el templado en un microtubo.

Se cuantificó la concentración del producto purificado de la PCR por electroforesis con ayuda de Low DNA Mass Ladder (INVITROGEN) para continuar con la reacción de secuencia.

REACCIÓN DE SECUENCIA

Se calculó la reacción en base a los siguientes requerimientos:

- Templado a una concentración de 25 a 50 ng de DNA
 - Oligonucleótido a una concentración de 8.5 pmol/ μ l
 - Reactivo "Big Dye Terminator" en la cantidad recomendada por el proveedor
- Big Dye Terminator Ready Reaction Kit (Applied Biosystems), consiste en una mezcla de ddNTPs marcados con fluorescencia, dNTPs, Tris-HCl (pH 9.0), Mg Cl₂ y DNA polimerasa AmpliTaq.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La reacción inicia a una temperatura de 96°C por 4 minutos, seguida de 28 ciclos con 10 segundos a 96°C, 10 segundos a 55°C, 5 minutos a 60°C y 7 minutos a 60°C de extensión final

Se purificaron los productos de la reacción de secuencia para eliminar el exceso de ddNTPs marcados mediante el método por columnas CentriSep (Applied Biosystems), para evitar errores en la secuenciación e interpretación de los resultados. Las muestras purificadas se secaron en un concentrador de vacío.

A continuación se agregó a las muestras 13 µl de amortiguador TSR (Template Supresión Reagent) de Applied Biosystems, se desnaturalizaron a 96°C por 5 minutos y finalmente fueron analizadas en el Secuenciador Automatizado ABI PRISM modelo 310 de acuerdo a las instrucciones del equipo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS

El análisis por PCR de los exones 2 y 3 del gen *CYP11B1* mostró amplificación normal del DNA de las pacientes, sus padres y los controles (Fig. 15).

Mediante secuenciación directa se identificó en las dos pacientes una mutación en el exón 3 consistente en la delección de una citosina en el codón 370 (C1453del), la mutación afectó una región altamente conservada de la enzima CYP11B1. Esta mutación originó un corrimiento en el marco de lectura abierto y un paro prematuro en el codón 427 (Tabla 4). Los padres fueron heterocigotos para la misma mutación (Fig. 16).

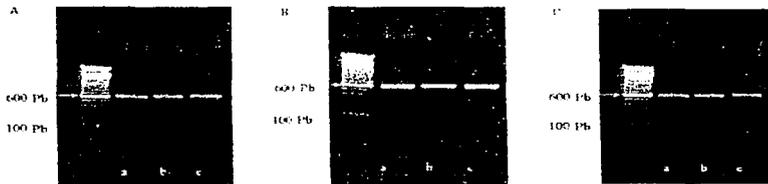


Fig. 15. Amplificación de los exones 2 y 3 del gen *CYP11B1* en las propuestas, sus padres y controles. A. Primera región del exón 2. B. La segunda región del exón 2. C. Exón 3. a. Control. b. Pacientes. c. Padres.

	Secuencia de aminoácidos de CYP11B1
Normal	RLPCMGDQPLPYVI...KDTVVVFVNQWS NH
(Control)	370 427
Pacientes	RLVAVVTSPTPCAMS...ATLWFLSTSGLS

Tabla 4. Secuencia de aminoácidos en CYP11B1 en los pacientes y control.

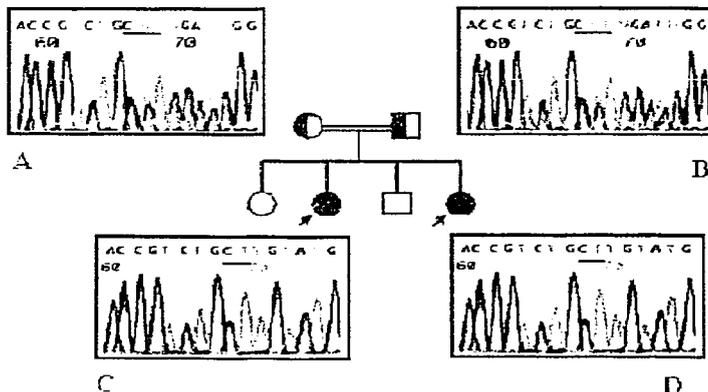


Fig. 16. Segregación del alelo mutante de CYP11B1 en la familia estudiada.

En los electroferogramas (C y D) se muestra que ambas propositas presentan la delección de la segunda citosina en el codón 370 (C145del) del gen CYP11B1. Se aprecia el corrimiento de fase en los padres (A y B) heterocigotos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Además, se identificaron dos polimorfismos del exón 2 del gen *CFTR* en las dos propósitas. El primer cambio fue la transversión C142→G en el codón 48 que produce la sustitución de arginina por glicina. El segundo polimorfismo resultó en una modificación del codón 119 en donde se presentó una transversión de G355→T que se traduce en el cambio de alanina por serina. Los padres fueron heterocigotos para estos cambios (fig. 17).

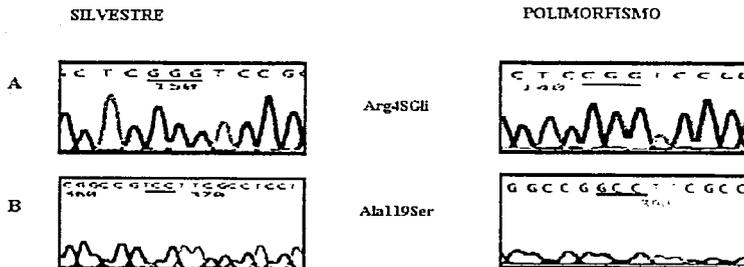


Fig. 17. Se muestran los polimorfismos encontrados en las pacientes. A. Cambio de arginina por glicina en el codón 48. B. Cambio de alanina por serina en el codón 119.

DISCUSIÓN

Los glaucomas comprenden un grupo de enfermedades oculares caracterizadas por neuropatía óptica secundaria a un aumento en la PIO^{3,4,5} y son considerados como la segunda causa de ceguera en el mundo.¹¹ Dentro de las formas hereditarias, el GCP presenta una transmisión autosómica recesiva, siendo estudiados en grandes familias consanguíneas.^{17,30,46,47,48,53,55} El GCP se caracteriza por el desarrollo anormal de la red trabecular y del ángulo irido-corneal de la cámara anterior del ojo, impidiendo el flujo adecuado del humor acuoso.^{9,10,12}

Durante los últimos años estudios moleculares han conducido al conocimiento de las bases moleculares del GCP y han llevado a la identificación de alteraciones en el gen *CYP11B* como la causa del 85% de los casos.^{36,66}

En este estudio describimos una familia con dos miembros afectados con GCP, en quienes se identificó un alelo mutante segregado en forma AR. En ambas propósitas se encontró una mutación homocigota en el exón 3 del gen *CYP11B*, y sus padres fueron heterocigotos para la misma mutación.

La afectación del gen *CYP11B* en el GCP, es el primer ejemplo en el cual una mutación en un miembro de la superfamilia de las citocromo P450 resulta en un defecto del desarrollo. *CYP11B* es el único miembro de la subfamilia P4501B, perteneciente a la superfamilia multigénica de monooxigenasas, responsables de la primera fase del metabolismo, la cual consiste en la inserción de un átomo de oxígeno atmosférico dentro de diversos sustratos creando un nuevo grupo funcional.^{22,23,24,26}

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El gen *CYP1B1* localizado en 2p21-22, está constituido por 3 exones (uno de los cuales no es codificante) y 2 intrones, tiene una longitud de 1659 pb^{24,25} y posee estructuras conservadas que participan en la integridad, conformación normal y el funcionamiento de la enzima. Dichas estructuras se localizan predominantemente en el extremo carboxilo de la proteína, dentro de la región CCS.³⁶

La mutación identificada en las propósitas fué una mutación nueva en el codón 370 del gen *CYP1B1*, y consistió en la delección de una citosina (del1453C) que originó un corrimiento en el marco de lectura y un paro prematuro en el codón 427. De esta manera deducimos que a partir del codón 370, la secuencia de aminoácidos se modificó, alterando la estructura de la hélice K y llevando a una proteína truncada a partir de la región "serpenteante", perdiéndose ésta, la región de unión al hem y la hélice L. En este caso y en aproximadamente el 50% de los casos reportados,³⁶ se pierde el extremo carboxilo de la proteína incluyendo el dominio hem, esencial para la función de la enzima.

Las mutaciones homocigotas, que originan una proteína truncada y una pérdida de las estructuras conservadas del extremo carboxilo de *CYP1B1*, se han correlacionado con GCP de inicio temprano (0-3 años), progresión rápida del padecimiento y difícil tratamiento.^{15,16,17,36,46} Mientras que en los heterocigotos compuestos presentan un fenotipo menos severo y/o un inicio tardío.^{48,55} En este estudio, las pacientes afectadas por GCP presentan una mutación de *CYP1B1* que coincide con el inicio temprano y la gravedad del padecimiento.

Además, se han reportado cambios en la secuencia del gen *CYP1B1* en posiciones no conservadas, las cuales han sido observadas en la población general y no se relacionan con la enfermedad, por lo que son considerados polimorfismos.^{36,46} En la familia estudiada se identificaron algunos polimorfismos, uno de ellos fue la transversión C142→G en el

codón 48 que produce el cambio de arginina por glicina, aunque la arginina es un aminoácido básico polar y la glicina apolar de cadena corta, se ha demostrado que éste es un cambio silente que se traduce en una actividad normal de la enzima. Otro polimorfismo fue la 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, esta sustitución no afecta la función de la proteína. Ambos padres fueron heterocigotos para estos cambios. Estos dos polimorfismos son los más frecuentemente observados en otras poblaciones analizadas.^{36,67}

El gen *CYP11B* codifica una proteína de 543 aminoácidos que se expresa en tejidos del tracto uveal como son el cuerpo ciliar, el epitelio ciliar no pigmentado y el iris, estructuras con funciones altamente especializadas incluyendo la acomodación del cristalino, regulación y síntesis del humor acuoso.^{24,26,36} Sin embargo, a pesar de que P45011B1 es una enzima ubicua, cuya expresión es mayor en tejidos como timo riñón y bazo, y es constitutiva en glándulas suprarrenales, ovario y testículo,³⁵ se ha demostrado que las mutaciones en *CYP11B* sólo causan GCP ya que en los pacientes afectados no se han encontrado alteraciones en los tejidos en donde se expresa la proteína.

Se ha propuesto que *CYP11B* participa en el metabolismo de una molécula biológicamente activa (aún no identificada) implicada en el desarrollo y función normal del ángulo irido-corneal de la cámara anterior del ojo, dicha molécula podría corresponder a esteroides o derivados del ácido araquidónico, que se sintetizan localmente o son liberadas en el cuerpo ciliar vía flujo sanguíneo.³⁶

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En el futuro, el objetivo principal en el estudio de la patogénesis del GCP será identificar el sustrato de CYP1B1 así como en que vía metabólica del control del desarrollo de la cámara anterior del ojo participa.

En conclusión en el presente estudio informamos de una mutación nueva afectando el gen *CYP1B1* y causando GCP. A diferencia de lo reportado previamente, los padres heterocigotos no estaban afectados en ningún grado con glaucoma. Además, es conveniente el análisis de una población mayor para caracterizar adecuadamente los cambios observados en el gen *CYP1B1* en el GCP en pacientes mexicanos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANEXO

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo _____ otorgo mi consentimiento para que a mi familia y a mi nos sean practicados los estudios genéticos considerados en el proyecto de investigación "Estudio clínico y molecular en una familia con Glaucoma Congénito Primario". Se me ha informado que el Glaucoma Congénito Primario es causado por una alteración genética que ocasiona un desarrollo anormal del ángulo de la cámara anterior del ojo, que impide el flujo anormal del humor acuoso, y que a través del estudio nuestro material genético se buscarán las alteraciones que causaron la enfermedad. La participación de mi familia en el estudio consiste en la extracción de 5 ml de sangre periférica a cada uno de nosotros, éste procedimiento presenta el riesgo menor de producir un "moretón" en el área puncionada. Se nos ha asegurado que la información obtenida no será divulgada y será usada sólo para fines establecidos en el proyecto de investigación. En caso decidir retirarnos del estudio, la calidad de la atención médica no cambiará.

ATENTAMENTE.

Nombre: _____

Firma _____

Médico Responsable: _____

Firma _____

Testigo 1: _____ Testigo 2: _____

Firma _____ Firma _____

México, D.F., a _____ de _____ de _____

<p style="text-align: center;">TESTEO CON FALLA DE ORIGEN</p>

BIBLIOGRAFIA:

1. van Heyningen V: Developmental eye disease –a genome era paradigm. *Clin Genet* 54: 272-282, 1998.
2. Allingham RR: *Glaucoma* en Albert DM, Jakobiec FA (eds) *Principles and practice of Ophthalmology: clinical practice*. Vol 3. WB Saunders, Philadelphia. 1994, p. 1291.
3. Sheffield VC, Alward WL, Stone EM: *The glaucomas* en Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. Vol 4. McGraw-Hill, New York 2001, pp. 6063-6068.
4. Quigley HA: Number of people with glaucoma worldwide. *Br J Ophthalmol* 80: 389, 1996.
5. Shields M, Ritch R, Krupin T: *Classifications of the glaucomas* en Ritch R, Shields M, Krupin T (eds) *The glaucomas*. Vol 2. Mosby, St Louis. 1996, pp. 717-720.
6. Ganong WF: *Visión en Fisiología Médica Manual Moderno*, México D. F. 1997, pp. 157-158.
7. Sadler TW: *Ojo en Langman Embriología Médica Panamericana*, España. 2002, pp. 381-387.
8. Quiroz GF: *Sentido de la vista en Anatomía Humana*. Vol III. Porrúa, México. 1993, pp. 418-420.
9. Turacli ME, Aktan SG, Sayli BS, Akarsu AN: Therapeutical and genetical aspects of congenital glaucomas. *Int Ophthalmol* 16: 359-362, 1992.
10. Hoskins HD Jr, Shaffer R, Hetherington J: Anatomical classification of the developmental glaucomas. *Arch Ophthalmol* 102: 1331-1336, 1984.
11. Francois J: Congenital glaucoma and its inheritance. *Ophthalmologica* 181: 61-73, 1986.
12. de Luise VP, Anderson DR: Primary infantile glaucoma (congenital glaucoma). *Surv Ophthalmol* 28: 1-19, 1983.
13. Thylefors B, Negrel A: The global impact of glaucoma. *World Health Organ Bull Org Mondiale Sante* 72: 323-326, 1994.
14. Anderson DR: Trabeculectomy compared to goniotomy for glaucoma in children. *Ophthalmology* 90: 805, 1983.
15. Turacli ME, Aktan SG: Assignment of a locus (GLC3A) for primary congenital glaucoma (buphthalmos) to 2p21 and evidence for genetic heterogeneity. *Genomics* 30: 171-177, 1995.
16. Akarsu AN, Turacli ME, Aktan SG, Barsoum-Homasy M, Sarfarazi M: A second locus (GLC3B) for primary congenital glaucoma (buphthalmos) maps to the 1p36 region. *Hum Mol Genet* 5: 1199-1203, 1996.
17. Stoilov I, Akarsu AN, Sarfarazi M: Identification of three different truncating mutations in cytochrome P450B1 (CYP1B1) as the principal cause of primary congenital glaucoma (buphthalmos) in families linked to the GLC3A locus on Chromosome 2p21. *Hum Mol Genet* 6: 641-647, 1997.
18. Nishimura DY, Swiderki RE, Alward WL, Seaby CC, Patil SR, Benet SR, Kanis AB, Gastier JM, Stone EM, Sheffield VC: The fork-head transcription factor gene FKHL7 is responsible for glaucoma Phenotypes which map to 6p25. *Nat Genet* 19:

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

140. 1998. Vincent AL, Billingsley G, Buys Y, Levin AV, Priston M, Trope G, Williams, Héon E. Digenic inheritance of Early-Onset Glaucoma: CYP1B1, a potential modifier gene. *Am J Hum Genet* 70: 448-460, 2002.
19. Semina EV, Reiter R, Leysens NJ, Alward WLM. Cloning and characterization of a novel biocine-related homeobox transcription factor gene RGS, involved in Rieger syndrome. *Nat genet* 14: 392, 1996.
 20. Jordan T, Ebenezer N, Manner R, McGill J. Familial glaucoma iridogoniodyspasia maps to a 6p25 region implicated in primary congenital glaucoma and iridogoniodysgenesis anomaly. *Am J Hum Genet* 61: 882, 1997.
 21. Van Buskirk Glaucoma congenito primario en Glaucoma Doyma, España. 1989, pp. 90-93.
 22. Renzoni A, Mattei N, Lari L, Fossi MC. Contaminants in the Environment. CRC Press, Inc, 1993, pp. 286.
 23. Guengerich PF. Cytochrome P450 enzymes. *American Scientist* 81: 440-447, 1993.
 24. Tang YM, Wo YYP, Steward J, Hawkins AL, Griffin CA, Sutter TR, Greenlee WF: Isolation and characterization of the human cytochrome P450 CYP1B1 gene. *J Biol Chem* 271: 28324-28330, 1996.
 25. Sutter TR, Tang YM, Hayes CL, Wo YYP, Jabs EW, Li X, Yin H, Cody CW, Greenlee WF. 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* 269: 13092-13099, 1994.
 26. Shugart LR. Molecular Markers to Toxic Agents. CRC Press Inc, 1996, pp. 133-161.
 27. Stacey E, Ryan O, Stephenson WF. Transcriptional regulation of the human CYP1B1 gene. *J Biol Chem* 275: 6770-6776, 2000.
 28. Poulos TL, Finzel BC, Howard AJ. High-resolution crystal structure of cytochrome P450. *J Mol Biol* 195: 687-700, 1987.
 29. Ravichandran KG, Boddupalli SS, Hassemann CA, Peterson JA, Deisenhofer J. Crystal structure of hemoprotein domain of P450BM-3, a prototype for microsomal P450s. *Science* 261: 731-736, 1993.
 30. Nelson DR, Kamataki T, Wasman DJ, Guengerich PF, Estabrook RW, Feyereisen R, González FJ. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession number, early trivial names of enzymes and nomenclature. *DNA Cell Biol* 12: 1-51, 1993.
 31. Hasemann CA, Ravichandran KG, Peterson JA, Deisenhofer J. Crystal structure and refinement of cytochrome P450terp at 2.3 Å resolution. *J Mol Biol* 236: 1169-1185, 1994.
 32. Yamazaki S, Sato K, Suhara K, Sakaguchi, Michara K, Omura T. Importance of the proline rich region following signal-anchor sequence in the formation of correct conformation of microsomal cytochrome P450s. *J Biochem* 114: 652-657, 1993.
 33. Chen CD, Kemper B. Different structural requirements at specific proline rich residue positions in the conserved proline-rich region of cytochrome P4502C2. *J Biol Chem* 271: 28607-28611, 1996.
 34. Walker NJ, Gastel JA, Costa LT, Clark GC, Lucier GW, Sutter TR. Expression patterns CYP1B1. *Carcinogenesis* 16: 1319-1327, 1995.
 35. Shimada T, Hayes CL, Yamazaki H, Amin S, Hecht SS, Guebberich FP, Sutter TR. Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P450 1B1. *Cancer Res* 56: 2979-2984, 1996.

TFSIS CON
FALLA DE ORIGEN

36. Stoilov I, Akarsu AN, Alojzic I, Child A, Barsoum-Homsy M, Turacli ME, Or M, Lewis RA, Ozdemir N, Brice G, Aktan SG, Chevrette L, Coca-Prados M, Sarfarazi M: Sequence analysis and homology modeling suggest that primary congenital glaucoma on 2 p21 results from mutations disrupting either the hinge region or the conserved core structures of cytochrome P4501B1. *Am J Hum Genet* 62: 573- 584, 1998.
37. Hayes CL, Spink DC, Cao JQ, Walker NJ y Sutter TR: 17-beta estradiol hydroxilation catalyzed by human cytochrome P4501B1. *Proc Natl Acad Sci* 93: 9776-9781, 1996
38. Murray GI, Taylor MC, McFadyen MC, McKay JA, Greenlee WF, Burke MD y Melvin WT: Tumor-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Cancer Res* 57: 3026-3031, 1997
39. McKay JA, Melvin WT, Ah-See AK, Ewen SW, Marcus CB y Murray GI: Expression of cytochrome P450 CYP1B1 in breast cancer. *FEBS* 374: 270-272, 1995.
40. Hanna IH, Dawling S, Roodi N, Guengerich FP, Parl FF: Cytochrome P450 1B1 (CYP1B1) pharmacogenetics: association of polymorphisms with functional differences in estrogen hydroxilation activity. *Cancer Res* 60: 3440-3444, 2000
41. Abul-Hajj YJ, Cisek PL: Catechol estrogen adducts. *J Steroid Biochem* 31: 107-110, 1988
42. Dwivedy I, Devanesan P, Cremonesi P, Rogan E, Cavalieri E: Synthesis and characterization of estrogen 2,3- and 3,4- quinones: Comparison of DNA adducts formed by the quinones versus horseradish peroxidase-activated catechol estrogens. *Chem Res Toxicol* 5: 828-833, 1992
43. Li JJ, Li SA: Estrogen carcinogenesis in Syrian hamster tissues: role of metabolism. *Fed Proc* 46: 1858-1863, 1987
44. Han X, Liehr JG: DNA single-strand breaks in kidneys of Syrian hamsters treat with steroidal estrogens: hormone-induced free radical damage preceding renal malignancy. *Carcinogenesis* 15: 997-1000, 1994
45. Guengerich FP: Oxidation-reduction properties of rat liver cytochromes P-450 and NADPH-cytochrome P-450 reductase related to catalysis in reconstituted systems. *Biochemistry* 22: 2811-2820, 1983
46. Bejjani BA, Lewis RA, Tomey KF, Anderson KL, Dueker DK, Jabak M, Astle WF, Oterud B, Leppert M, Lupski JR: Mutations in CYP1B1, the gene for cytochrome P501B1, are the predominant cause of primary congenital glaucoma in Saudi Arabia. *Am J Hum Genet* 62: 325-333, 1998
47. Bejjani BA, Stockton DW, Lewis RA, Tomey KF, Dueker DK, Jabak M, Astle WF, Lupski JR: Multiple CYP1B1 mutations and incomplete penetrance in a inbred population segregating primary congenital glaucoma suggest frequent de novo events and a dominant modifier locus. *Hum Molec Genet* 9: 367-374, 2000.
48. Martin SN, Sutherland J, Levin AV, Klöse R, Priston M, Heon E: Molecular characterisation of congenital glaucoma in a consanguineous Canadian community: a step towards preventing glaucoma related blindness. *J Med Genet* 37: 422-427, 2000.
49. Kakiuchi T, Isashiki Y, Nakao K, Sonoda S, Kimura K, Ohba N: A novel truncating mutation of cytochrome P4501B1 (CYP1B1) gene in primary infantile glaucoma. *Am J Ophthalmol* 128: 370-372, 1999.

TESTO CON
FALLA DE ORIGEN

- 50 Kakiuchi-Matsumoto T, Isashiki Y, Ohba N, Kimura K, Unoki K: Cytochrome P450 1B1 gene mutations in Japanese patients with primary congenital glaucoma. *Am J Ophthalmol* 131: 345-350, 2001
- 51 Mashima Y, Suzuki Y, Sergeev Y, Ohtake Y, Tanino T, Kimura I, Miyata H, Aihara M, Tanihara H, Inatani M, Azuma N, Iwata T, Araie M: Novel cytochrome P4501B1 (CYP1B1) gene mutations in Japanese Patients with primary congenital glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42: 2211-2216, 2001
- 52 Michels-Rautenstrauss KG, Mardin CY, Zenker M, Jordan N, Gusek-Schneider GC, Rautenstrauss BW: Primary congenital glaucoma: three case reports on novel mutations and combinations of mutations in the CYP1B1 gene. *J Glaucoma* 10: 354-357, 2001
- 53 Panicker SG, Reddy AB, Mandal AK, Ahmed N, Nagarajaram HA, Hasnain SE, Balasubramanian D: Identification of novel mutations causing familial primary congenital glaucoma in Indian pedigrees. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43: 1358-1366, 2002
- 54 Belmouden A, Melki R, Hamdani M, Zaghoul K, Amraoui A, Garchon HJ: A novel frameshift founder mutation in the cytochrome P450 1B1 gene is associated with primary congenital glaucoma in Morocco. *Clin Genet* 62: 334-339, 2002
- 55 Soley GC, Bosse KA, Flikier P, Mardin CY, Michels-Rautenstrauss KG: Primary Congenital Glaucoma: A novel single-nucleotide deletion and varying phenotypic expression for the 1546-1555dup Mutation in the CYP1B1 gene in 2 families of different ethnic origin. *J Glaucoma* 12: 27-30, 2003.
- 56 Vincent AL, Billingsley G, Buys Y, Levin AV, Priston M, Trope G, Williams-Lyn D: Digenic inheritance of early-onset glaucoma. *CYP1B1*, a potencial modifier gene. *Am J Hum Genet* 70: 448-460, 2002.
- 57 Vincent A, Billingsley G, Priston M, Williams D, Sutherland J, Glaser T, Oliver E, Walker MA, Heathcote G, Levin A, Héon E: Phenotypic heterogeneity of CYP1B1: mutations in a patient with Peter's anomaly. *J Med Genet* 38: 324-326, 2001.
- 58 Bailey LR, Roodi N, Dupont WD, Parl FF: Association of cytochrome P450 1B1 (CYP1B1) polymorphism with steroid receptor status in breast cancer. *Cancer Res* 58: 5038-5041, 1998.
- 59 Aklilu E, Oscarson M, Hidestrand M, Leidvik B: Functional Analysis of six different polymorphic CYP1B1 enzyme variants found in an Ethiopian population. *Mol Pharmacol* 61: 586-594, 2002
- 60 Bufflone GG and Darlington GJ: Isolation of DNA from biological specimens without extraction with phenol. *Clin Chem* 31: 164-165, 1985.
- 61 Kempter B and Grossbadem K: Quick preparation of high molecular weight DNA by freezing. *TIG* 8 2, 1992
- 62 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning 2a*. Ed. Cold Spring Harbor 1989. Laboratory Press, pp 435-4
- 63 Beckman: Spectrophotometer Operating Instructions, EUA, 1998, pp 9-7.
- 64 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez> Nucleotide: Human diox-inducible cytochrome P450 (CYP1B1) mRNA, complete cds.
- 65 Nelson y Cox, *Principios de Bioquímica Lenhinger*, Omega, España, 1993, pp. 140-141.
- 66 Sarfarazi M, Stoilov I: Molecular genetics of primary congenital glaucoma. *Eye* 14: 422-428, 2000.