

ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS GENETICOS DEL GEN CYP1A1 EN RELACIONA PACIENTES CON MIELOMENINGOCELE NO SINDROMICO

Dres. H. Gomez Demaio*, C. Martín*, N. Brandan**, S. Bluvstein**, R. Blanco***, H. Carreño***

RESUMEN

El gen CYP1A1 codifica para el Citocromo P1 450 y se considera un candidato marcador de susceptibilidad frente a la exposición de contaminantes ambientales hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs). Las formas raras mutadas en homocigosis de tres polimorfismos confieren al individuo que las porta un alto riesgo de mutagénesis, carcinogénesis o teratogénesis. Debido al uso de agroquímicos en los cultivos de la Provincia de Misiones nos propusimos investigar la distribución de las frecuencias alélicas de los polimorfismos Msp1 y del exon 7 del gen en poblaciones normales no aborígenes argentinas y chilenas y en una población de pacientes con mielomeningocele (MMC) no sindrómico, para correlacionarlas con los fenotipos de detoxificación ya descriptos por nosotros en publicaciones anteriores, en poblaciones controles y con MMC, identificando población de riesgo, contribuyendo al Screening Internacional del Proyecto Genoma Ambiental y poder realizar profilaxis. Se obtuvo el ADN de linfocitos de sangre periférica en 100 controles sanos argentinos y 100 chilenos y en 31 pacientes argentinos con MMC. Se amplificó el exon 7 CYP1A1, con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con ASO, para un polimorfismo. Para el otro denominado MSP1, se amplificó el ADN con PCR-RFLP. Los productos se visualizaron en electroforesis en gel de agarosa al 1,8% con tinción con Bromuro de Etidio y se identificaron las variables alélicas. Se hallaron los siguientes resultados: **Polimorfismo Msp1:** población argentina control (N= 30) con 47% homocigota normal; 43% heterocigota y 10% homocigota mutado. Población chilena (N=41) con 65%, 30% y 4%, respectivamente. **Polimorfismo del exon 7:** población argentina con 47% homocigota normal, 43% heterocigota y 10% homocigota mutado; población chilena con 25,8%, 61,3% y 12,9%, respectivamente ($p < 0,05$). Siendo en cada caso el homocigota salvaje de bajo riesgo; el heterocigota de riesgo intermedio y homocigota mutado de alto alto riesgo o susceptibilidad frente a la exposición con HPAs. Las frecuencias genotípicas argentinas y chilenas halladas son significativamente diferentes. Identificar las variantes alélicas en poblaciones normales expuestas a contaminantes ambientales, permite tomar medidas profilácticas. En portadores de malformaciones congénitas como el MMC permitiría establecer el riesgo asociado a las formas mutadas del gen.

Palabras Clave: mielomeningocele- CYP1A1- Msp1- ASO- hidrocarburos aromáticos policíclicos.

Medicina Infantil 2004; XI: 191 - 195.

ABSTRACT

Gen CYP1A1 codifies for Cytochrome P1 450 and it is considered a potential indicator of susceptibility after exposure to environmental contaminants (polycyclic aromatic hydrocarbons-PAH). The rare mutated homozygous forms of three polymorphisms make the affected person highly susceptible to mutagenesis, carcinogenesis or teratogenesis. Knowing the common use of mutagenic insecticides in the Province of Misiones we studied the allelic: distribution of Msp1 polymorphisms and of exon 7 of the gen in normal non-aborigine Argentine and Chilean populations compared with a subset of patients with non-syndromic myelomeningocele (MMC). We correlated these results with detoxification phenotypes previously described by us in former publications, in control populations and myelomeningocele populations, identifying people at risk. These findings contributed to the international screening of the Project Human Environmental Genome and helped to settle prevention measures. DNA was obtained from peripheral blood lymphocytes in healthy control cases, 100 Argentines and 100 Chileans, and in 31 MMC Argentine patients. Exon 7 CYP1A1 was amplified with PCR with ASO for one polymorphism. For the other known as MSP1, DNA was amplified with PCR-RFLP. Products were observed by electrophoresis in 1.8% agar gel with Ethidium bromide staining to identify allelic variables. Results: 1 - Msp1 Polymorphism. Argentine control population (n=30) with 47% normal homozygous; 43% heterozygous and 10% mutated homozygous. Chilean Control Population (n=41) with 65%, 30% and 4%, respectively. 2- Exon 7 polymorphism. Argentine control population with 47% normal homozygous, 43% heterozygous and 10% mutated homozygous. Chilean control population: 25.8%, 61.3% and 12.9%, respectively ($p < 0.05$). The homozygous allele is of low risk, the heterozygous is of intermediate risk and the mutated heterozygous of high risk when exposed to APH. The Argentines and Chileans genotype sequences were significantly different. In families with congenital malformations such as MMC, risk can be assessed by finding these mutations.

Key words: myelomeningocele- CYP1A1- Msp1- ASO- polycyclic aromatic hydrocarbons.

Medicina Infantil 2004; XI: 191 - 195.

* Laboratorio de Biología Molecular y Genética Humana. Hospital Provincia de Pediatría. Posadas. Misiones. ** UNNE. Facultad de Medicina. Corrientes. *** Laboratoriode Genética y Biología Celular. Facultad de Medicina. Universidad de Chile.

Recibido: 04/08/04 - Aceptado: 27/08/04

Correspondencia: H. Gómez Demaio- bubidemaio@arnet.com.ar
Combate de los Pozos 1881, (1245) Buenos Aires

INTRODUCCION

El gen CYP-1A1 codifica para la enzima Aryl Hidrocarburo Hidroxilasa (AHH), un Citocromo P450 de fase 1 de detoxificación presente en la fracción microsomal de la mayoría de los tejidos mamíferos. Este citocromo está involucrado en el metabolismo oxidativo de compuestos enclógenos como esteroides, ácidos grasos, leucotrienos y prostaglandinas y en el metabolismo de químicos externos como drogas, carcinógenos y otros polulantes ambientales^{1,2}. Los P450 comprenden una superfamilia de más de 153 genes agrupados en 27 familias. La familia del gen CYP1 consiste en dos genes funcionales: el CYP1A1, que participa en el mecanismo de detoxificación de los Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), generados por la combustión del carbono fósil y se encuentran como contaminantes, vehículos o en la estructura química principal de muchos plaguicidas; y el CYP1A2, que participa en el metabolismo de las arylaminas presentes, por ejemplo, en el humo del cigarrillo. Ambos genes son inducidos por químicos específicos ambientales: el CYP1A1 por el 3-Metilcolantreno (3-MC) y el 2,3,7,8 -Tetra-clorodibenzo-p-dioxin (TCDD) y el CYP1A2 por el benzo(a) pyreno y la Bnaptoflavona^{1,2,3,4}.

Nuestro interés en el estudio del gen CYP1A1 radica en el hecho de que induciendo la síntesis de la enzima P450, la AHH con un HAP y de acuerdo a la constitución genética del individuo, pueden observarse tres fenotipos de respuesta en relación a la extensión de la misma: una de síntesis enzimática baja, una intermedia y una alta. En los que se presenta el fenotipo de inductibilidad aumentada, que representan un 10% de la población caucásica, existe un mayor riesgo de cáncer, toxicidad y teratogénesis frente a la exposición de los químicos que la enzima detoxifica. Esto se debería a que durante el metabolismo de detoxificación de los HAP, se producen intermediarios reactantes electrofílicos que se unen al ADN provocando mutaciones o formando adultos^{5,6,7,8,9}.

En nuestro trabajo anterior estudiamos la distribución de frecuencias de los fenotipos de inductibilidad en los pacientes afectados de mielomeningocele que concurren al CIETEMM (Centro de Estudio, Investigación y Tratamiento de Enfermedades Malformativas de Misiones) del Hospital Provincial de Pediatría y se compararon con una población control del Servicio de Neonatología del Hospital Ramón Madariaga de Posadas, Misiones^{10,11}. Las frecuencias en la población control no fueron significativamente diferentes a las publicadas para población caucásica, hallándose: 45% de los individuos estudiados con respuesta de inducción baja (fenotipo AHH AA) 43% intermedia (fenotipo AHH AB) y 12% alta (fenotipo AHH BB). En cambio en los pacientes con MMC se observó

un 60% con respuesta intermedia y 40% con respuesta alta, no hallándose ningún paciente con respuesta de inducción baja. La frecuencia de los alelos AHH A y AHH B calculada a partir de las distribuciones fenotípicas fueron 0,667 y 0,333, respectivamente^{12,13,14,15,16}.

Debido a que existen diferencias en la extensión de la respuesta enzimática en individuos de distinto origen étnico, y que la zona geográfica de estudio en la Argentina es similar en cuanto a contaminantes ambientales que la de Chile, consideramos fundamental comparar la distribución de frecuencias de los alelos, identificando a los individuos de alto riesgo^{13,14,15}. Estudiaremos este gen ambiental como uno de los marcadores en portadores de malformaciones congénitas del desarrollo embrionario de línea media como el mielomeningocele y la fisura labiopalatina, en poblaciones argentinas y chilenas, con la misma metodología para contribuir a la etiopatogenia de las mismas. Los objetivos del presente estudio son: investigar en los pacientes con MMC la forma de detoxificar (fenotipo enzimático del citocromo P450) los contaminantes ambientales (hidrocarburos aromáticos policíclicos) comparados con la población considerada normal; determinar las variantes del gen ambiental CYP1A1 en estas poblaciones y su correlación con la inductibilidad del P450; identificar a la población susceptible de presentar fenómenos de toxicidad, mutagénesis, carcinogénesis y teratogénesis para malformaciones de línea media embrionaria como el MMC, por presentar las formas mutadas raras del CYP1A1; comparar dichas frecuencias en distintas poblaciones según origen étnico.

METODOS

Población

Controles

Argentinos (Misioneros): recién nacidos normales en el Servicio de Neonatología del Hospital Ramón Madariaga (N=100) y adultos entre 21 y 45 años de edad del Banco de sangre del Hospital Provincial de Pediatría de Posadas, Misiones. Según Protocolo y con consentimiento informado.

Chilenos: población de Santiago de Chile sana de sujetos que concurren al Banco de sangre para donaciones, tomada como control para un estudio en desarrollo de marcadores moleculares asociados a Fisura labiopalatina (N=100). Según Protocolo y con consentimiento informado.

Pacientes:

Afectados de mielomeningocele no sindrámicos del CIETEMM de recién nacidos a 10 años de edad según el protocolo y con el consentimiento informado (N=31).

Muestras

En recién nacidos: 1ml de sangre extraída con

EDTA 50mM al 5% en condiciones estériles del cordón umbilical.

En niños y adultos: entre 5 y 10 ml de sangre venosa extraída con EDTA 50mM al 5% en condiciones estériles.

Procesamiento

Se extrajo el ADN de los linfocitos según protocolo 9 y se utilizó 1 ug para cada reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

CARACTERIZACION GENOTIPICA: GEN CYP1A1.

Polimorfismo MspI con enzimas de restricción (FIFLP): se realizó la PCR en las condiciones descritas y para amplificar el fragmento de la región X terminal del gen CYP1A1 se usaron los siguientes primers: C47: (5' CAGTGAAGAGGTWAGCCGCT 3') y C44: (5'TAGGAGTCTTGTCTCATGCCT 3'). Un ciclo a 95 mC 5' y 25 ciclos bajo las siguientes condiciones: hibridización a 68 mC por 1'; extensión a 72mC por V, denaturación a 95 mC por 1' y una extensión final a 72 mC por X. Los fragmentos amplificados se digieren luego con Msp1 (New England Biolabs) según recomendaciones del producto, a 37°C por 2 horas. Los productos se visualizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1,8% con tinción con Bromuro de Etidio. El marcador de peso molecular utilizado es el de 100 pares de bases (New England Biolabs). Se caracterizó al genotipo A por una banda de 340 pib para los dos alelos. El genotipo B, se caracteriza por tres bandas: una de 140 pib y una de 200 pib para un alelo y otra de 340 pib para el otro y el genotipo C, se caracterizó por dos bandas, una de 200 pib y otra de 140 pib para ambos alelos. Figura 1^{15,16,20}.

	A	B	C
	Normal Homocigota	Heterocigota	Mutado homocigota
340bp	—	—	—
200bp		—	—
140bp		—	—

Figura 1: Caracterización de los genotipos del polimorfismo Msp 1 en gel de agarosa.

Polimorfismo del exon 7 con oligonucleótidos alelo específicos (ASO): se realizó la PCR en las condiciones descritas y para amplificar el fragmento del exón 7 se usaron los siguientes primers: IAIA: (5' GAAGTWATCGGMAGACCA X) junto con C53: (3' GTAGACAGAGTCTAGGCCTCA 5') y el

IAIG: (5'GAAGTWATCGGTGAGACCG 3') junto con C53: (3'GTAGACAGAGTCTAGGCCTCA 5'). Un ciclo a 94°C por 4' y 30 ciclos en las siguientes condiciones: hibridización a 65°C por V, extensión a 72°C por V, denaturación a 94°C por V y extensión final a 72°C por X.

Los productos de 210 pb se visualizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1,8% con tinción con Bromuro de Etidio. El marcador de peso molecular utilizado fue el de 100 pares de bases (New England Biolabs). Se caracterizó al genotipo A (Ile/Ile): homocigota salvaje. Con una banda visible en A. El genotipo AG (Ile/Val): heterocigota. Se caracteriza por una banda visible en A y otra en G y el genotipo G

(Val/Val): homocigota mutado. Se caracteriza por banda visible en G. Figura 2^{15,16,20}.

	A Ile/Ile	AG Ile/Val	G Val/Val
	Normal Homocigota	Heterocigota homocigota	Mutado
	A G	A G	A G
210pb	—	— —	—

Figura 2: Caracterización de los genotipos del polimorfismo ASO en gel de agarosa.

ANALISIS ESTADISTICO

- Se calcularon las frecuencias de los alelos estudiados del gen CYP1A1 según el modelo de distribución en una población en equilibrio de Hardy-Weinberg.
- Se realizó un test de x² para examinar las diferencias en las poblaciones estudiadas. Se consideró significativa una p < 0,05.

RESULTADOS

Polimorfismo Msp1: se pudo realizar en 30 controles normales argentinos y se compararon con los fenotipos hallados en 60 individuos controles normales argentinos estudiados previamente y caracterizados fenotípicamente como de baja, intermedia y alta producción de enzima inducida por el contacto con hidrocarburos aromáticos policíclicos, hallándose los siguientes valores visualizados en la Tabla 1.

No se hallaron diferencias significativas en los tres grupos cuando se correlaciona el fenotipo de detoxificación, con el genotipo en sus variantes alélicas. Luego se incluyó el estudio de 41 controles normales chilenos, hallándose los siguientes

TABLA 1: CORRELACION DEL POLIMORFISMO MSP1 Y DE LOS FENOTIPOS DE INDUCTIBILIDAD ENZIMATICA.

Polimorfismo Msp1 GEN CYP1A1 (N= 30. Población normal)		Fenotipos de inductibilidad. Enzima AHH (N= 60. Población normal) -Gómez Demaio y col, 1997	
m1/m1	47% (14)	Baja	45% (27)
m2/m2	43% (13)	Intermedia	43% (26)
m1/m2	10% (3)	Alta	12% (7)

Chi-cuadrado= 0,226; P del chi-cuadrado= 0,893
No significativa.

TABLA 2: ESTUDIO COMPARATIVO DE POBLACIONES CONTROLES NORMALES ARGENTINAS Y CHILENAS PARA EL POLIMORFISMO MSP 1.

	Argentinos N= 30 Población normal	Chilenos N=41 Población normal
m1/m1 Baja	47% (14)	65% (28)
m1/m2 Intermedia	43% (13)	30% (13)
m2/m2 alta	10% (3)	4% (2)

X²; 2 GL., 0,95: 15,63
P: 0,001

TABLA 3: COMPARACION DE LAS FRECUENCIAS ALElicas DEL POLIMORFISMO DEL EXON 7 (ASO) EN POBLACIONES CONTROLES ARGENTINAS Y CHILENAS Y EN PACIENTES CON MMC ARGENTINOS.

Población	Frecuencias genotípicas		
	Ile/Ile A BAJA	Ile/ Val AG Intermedia	Val /Val G Alta
Argentinos Controles N= 100	35,71%	46,43%	17,86%
MMC N= 31	6,45%	58,06%	35,48%
Chilenos Controles N=100	26%	61%	13%

x² 2GL; 0,95: 9.552
p: 0,0084. Significativa (p < 0,05 considerada significativa)
Entre controles.
X² 2GL; 0,95: 105,17
P: 0,0001*** Entre pacientes MMC y controles argentinos

valores visualizados en la Tabla 2.

Se observa un número mayor de individuos en la población chilena con polimorfismo que se correlaciona con baja producción de enzima y menor cantidad de individuos que con alta cantidad de enzima producida son susceptibles de presentar los fenómenos de mutagénesis, carcinogénesis y toxicidad referidos. No se ha estudiado aun en los pacientes con MMC este polimorfismo.

Polimorfismo de exón 7 (ASO) o ILE/VAL: se pudieron estudiar 100 controles argentinos, 100 controles chilenos y 31 pacientes con MMC argentinos. Se hallaron los siguientes resultados visualizados en la Tabla 3.

DISCUSION

El 40% de los pacientes con MMC producen alta cantidad de enzima P1450 para detoxificar los Hidrocarburos aromáticos policíclicos. El 35,48 % tiene la forma rara mutada del gen CYP1A1 para el polimorfismo del exón 7.

En los controles normales se hallaron diferencias en las frecuencias estudiadas entre las poblaciones argentinas y chilenas, para ambos polimorfismos, debidas probablemente, a su diferente origen étnico.

La población chilena presenta una mayor cantidad de individuos con un sólo alelo mutado en heterocigosis, en una de las mutaciones.

El homocigota raro hallado en población normal chilena no difiere de; hallado en poblaciones asiáticas, y el hallado en población argentina (Misiones) no difiere de; hallado en población caucásica.

Las poblaciones normales con alto riesgo en Argentina representan el 10-12%. Las chilenas, entre el 4 y el 13%.

Determinar las frecuencias genotípicas de las variantes alélicas de los polimorfismos de gen CYP1A1, en poblaciones de distinto origen étnico, en similares condiciones ambientales permite la utilización de las técnicas moleculares, como método más apropiado en caracterizar el genoma que codifica para enzimas que detoxifican contaminantes ambientales para la identificación de individuos en riesgo (portadores de las formas raras mutadas del gen) en los fenómenos de carcinogénesis, teratogénesis, por ejemplo el MMC y la fisura labiopalatina no sindrómicas, y toxicidad frente a la exposición de contaminantes HAPs detoxificados principalmente por la superfamilia del Citocromos P450 y la consecuente aplicación de medidas profilácticas^{21,22,23}.

REFERENCIAS

- Laurence, K.M.; Jarnes, N. 1981. >,Increased risks of recurrence of pregnancies complicated by fetal neural tube defects in mothers receiving poor diets, and possible benefit of dietary counselling». Br Med J 281:(1591-1595).

- Gómez Demaio, H; Martín, M.C., 1990. «Estudio de la casuística de pacientes afectados de mielomeningocele, en el período 1987-1989» Tesis para acceder a la Licenciatura en genética de la Fac. de Ccas. Exac. Ocas. y Nat. (UNaM).
- Nebert, D, 1989. «The Ah locus: Genetic Differences in Toxicity, Mutation, cancer and Birth defects». *Toxicology Mol* 20. (3) Pag.153174.
- Keilermann G., Luyten-Keilerman, Shaw C, 1973. «Genetic Variation of Ary1 Hydrocarbon Hydroxylase in human Lymphocytes». *Amer J Hum Genet* 25: 327-331.
- Nebert D; Gelboin H, 1968:» Substrate-inducible microsomal ary1 hydroxylase in mammalian cell culture. *J Biol Chem* 243:6242-6249.
- Atlas geográfico de malformaciones congénitas en Sudamérica ECLAMC, Edit. Fiocruz. 1995
- Brandan NC, *Br J Haematol* 47: 461, 1981
- Whitlock J.P.: Induction of cytochrome P4501A1: a model for analyzing mammalian gene transcription. *FASEB J* 10,809818, 1996.
- Monta, Shunji, et al, 1997: CYP-IA-1, CYP2E1 and GSTM1 polymorphisms are not associated with susceptibility to squamous cell carcinoma of the esophagus. *Int J Cancer*, 71, 192-195
- Crofts, F et al, 1993: A novel CYP13A1 gene polymorphism in African-Americans. *Carcinogenesis*, 14, 1729-1731.

Medicina Infantil, agradece las siguientes adhesiones

- *RHASA.*
- *Banco Patagonia Sudameris S.A. I*
- *Investigaciones Weckesser S.A.*
- *Total Lubricantes Argentina S.A.*
- *Monsanto Argentina S.A. Estudio Bullo, Tassi, Ester Benet, Lioera, Torassa y Asociados.*
- *V. Tokatlian S.A.*
- *Villalba Hnos S.A.*
- *Cías. Asoc. Petrolera S.A. (CAPSA).*
- *Indunor S.A.*
- *Bardhall Lubricantes Argentina S.A.*
- *Neumáticos Good Year S. R. L.*
- *Sociedad Militar Seguro de Vida.*
- *BAFIRSA.*