

## Identificación de mutaciones en el gen *CYBB* que llevan al fenotipo de la enfermedad granulomatosa crónica ligada al cromosoma X: Reporte de una nueva mutación

Piedad Agudelo-Flórez<sup>1ab</sup>, Sara Navarro V<sup>2a</sup>, Pamela Luttges D<sup>2c</sup>, Juan Alvaro López<sup>1abd</sup>, Ximena Norambuena R<sup>3</sup>, Carmen Luz Navarrete S<sup>4</sup>, Arnoldo Quezada L<sup>5</sup>, Michael Spencer Y<sup>2</sup>, Antonio Condino-Neto<sup>1e</sup>, Mónica Cornejo De L<sup>2</sup>.

### *Report of a new mutation in CYBB gene in two patients with X linked chronic granulomatous disease*

**Background:** The X-linked form of chronic granulomatous disease (CGD) is a primary immunodeficiency that affects phagocytes of the innate immune system and is characterized by an increased susceptibility to severe bacterial and fungal infections. It is caused by mutations in the *CYBB* gene, which encodes the 91-kD subunit of phagocyte NADPH oxidase. **Aim:** To identify the mutation in the *CYBB* gene in two unrelated patients from Chile with the diagnosis of X-linked CGD and their families. **Patients and methods:** The molecular genetic defects of two unrelated patients from Chile with X-linked CGD caused by defects in the *CYBB* gene were investigated. The underlying mutation was investigated by single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis of PCR-amplified genomic DNA and by sequencing of the affected gene region. **Results:** We found an insertion c.1267\_1268insA in exon 10 leading to a frameshift mutation. This mutation is a novel report. We also identified a splice site mutation in the other patient, that presented a c.1326 +1 G>A substitution in intron 10. The mutation was also detectable in his heterozygous mother. **Conclusions:** This is the first report of the clinical and molecular characterization of Chilean patients with mutations in *CYBB* gene (Rev Méd Chile 2006; 134: 965-72).

**(Key words:** *CYBB* protein, human; Genetic diseases, X-linked; Granulomatous disease, chronic)

Recibido el 6 de agosto, 2004. Aceptado el 7 de marzo, 2006.

Trabajo financiado por Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 01/14365-3 e 02/05880-4), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq 470413/03-4), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) y parcialmente por la Dirección de Investigación y Postgrado de la Universidad de Valparaíso (Dipuv 05/02).

<sup>1</sup>Centro de Investigación em Pediatria e Departamento de Pediatria, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas. <sup>2</sup>Laboratorio de Inmunología, Escuela de Medicina, Universidad de Valparaíso. <sup>3</sup>Unidad de Inmunología, Hospital Dr. Exequiel González Cortés. <sup>4</sup>Consultorio Inmunología y Reumatología, Hospital Clínico de la Universidad de Chile. Santiago de Chile. <sup>5</sup>Departamento de Pediatría Sur, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Hospital Dr. Exequiel González Cortés. Santiago de Chile.

<sup>a</sup>Biólogo. <sup>b</sup>PhD. <sup>c</sup>Bioquímico. <sup>d</sup>MSC. <sup>e</sup>MD, PhD.

*Correspondencia a:* Pamela Luttges D. Laboratorio de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Valparaíso. Hontaneda 2664, Valparaíso, Chile. Fono: 56-32-507369. Fax: 56-32-507321. E mail: [pamela.luttges@uv.cl](mailto:pamela.luttges@uv.cl)

El sistema NADPH oxidasa es un complejo enzimático que está localizado en la membrana plasmática de los gránulos específicos de los fagocitos y cataliza la generación de ion superóxido a partir del oxígeno molecular. Uno de los componentes de este complejo enzimático es el flavocitocromo  $b_{558}$ , una proteína integral de membrana con bajo potencial de reducción, que le permite ceder electrones y generar especies reactivas de oxígeno. Es un heterodímero compuesto por una glicoproteína de 91 kDa llamada gp91-*phox* (*phox* por *phagocyte oxidase*) y una subunidad de 22 kDa denominada p22-*phox*. Al sistema oxidasa pertenecen, además, otras tres proteínas citosólicas (p47-*phox*, p67-*phox* y p40-*phox*) y unas proteínas con actividad GTPasa, conocidas como Rac1 y Rac2. Frente a un estímulo, las proteínas citosólicas se translocan desde el citosol hacia la membrana, generando la interacción de todos los componentes del sistema oxidasa y el inicio de la actividad enzimática<sup>1</sup>.

Cualquier alteración genética en alguna de las proteínas del sistema NADPH oxidasa que implique falla en la expresión o función de este sistema transportador de electrones, lleva al fenotipo de la enfermedad granulomatosa crónica (EGC), que afecta de 1 en 200.000 a 1 en 250.000 individuos<sup>1</sup>. Estos pacientes tienen un defecto en el «estallido respiratorio» de los fagocitos, que resulta en la incapacidad de destruir microorganismos tales como *Staphylococcus aureus*, y especies de hongos tales como *Aspergillus*, *Candida* y *Nocardia*<sup>2</sup>. Los neutrófilos y monocitos estimulados *in vitro* por una variedad de estímulos solubles y particulados de los pacientes con EGC, no son capaces de producir especies reactivas del oxígeno.

La forma más común de EGC es causada por un defecto en la proteína gp91-*phox*, que tiene un patrón hereditario ligado al cromosoma X. A su gen se le conoce como *CYBB* y está localizado en la porción Xp21.1. Las mutaciones que presenta el gen *CYBB* son heterogéneas y responsables de 60 a 65% de los casos de EGC<sup>3</sup>. La enfermedad también se presenta con una forma de herencia autosómica recesiva por defecto de las proteínas p47 (30%), p67 (5%) y p22 (5%)<sup>4</sup>. Los genes de cada una de ellas se denominan NCF-1, NCF-2 y CYBA, respectivamente.

En este trabajo se estudia, a nivel bioquímico y genético, la molécula gp91-*phox* en 2 pacientes

chilenos con diagnóstico de EGC, con el fin de confirmar el diagnóstico de EGC ligado a X. También se estudian familiares directos para detectar eventuales portadores.

#### PACIENTES Y MÉTODOS

*Pacientes y controles. Paciente P1:* varón de 9 años, sin antecedentes familiares de EGC. Inició su sintomatología cuando tenía 1 año y 11 meses de edad y presentó abscesos subcutáneos, hepático y, posteriormente, a los 2 años 6 meses, un absceso pulmonar. En todos ellos se identificó *Staphylococcus aureus* como germen causal y requirió tratamiento antibiótico (Cloxaciclina) y drenaje quirúrgico. Un estudio de nitroblue tetrazolium (NBT) realizado a los 2 años 6 meses confirmó el diagnóstico de EGC. La prueba de reducción de NBT en el paciente fue de 0% (control 98%), sin embargo, la madre y la hermana tenían una respuesta normal. Desde el diagnóstico, se inició terapia profiláctica con TMP-SMX. Actualmente presenta adenitis supurada persistente, cultivo (-) y se encuentra en tratamiento con cefalosporina.

*Paciente P2:* varón de 5 años 7 meses. Primer hijo de una familia sin antecedentes de inmunodeficiencia primaria o consanguinidad. A los 6 meses de vida presentó adenoflegmón cervical izquierdo (cultivo identificó *Staphylococcus aureus*) que requirió drenaje quirúrgico y terapia antibiótica. A los 18 meses presentó piodermitis del cuero cabelludo y episodios de diarrea a repetición. A los 2 años 11 meses inició síndrome febril prolongado y neumopatía de lóbulo superior derecho de evolución tórpida que requirió biopsia pulmonar. En el estudio bacteriológico de tejido pulmonar se identificó *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas sp.* La prueba de reducción del NBT demostró 0% de reactividad y una respuesta disminuida en la madre (12%), tía materna (49%) y abuela materna (42%); (Control 98%). Con el diagnóstico de EGC se inició terapia profiláctica con TMP-SMX e itraconazol. El paciente se encuentra actualmente sin infecciones.

Como controles; se utilizaron 6 individuos sanos, no relacionados con los pacientes, sin antecedentes personales o familiares de la enfermedad. Pacientes, familiares y controles firmaron un consentimiento informado aprobado por el

Comité de Ética de la Escuela de Medicina de la Universidad de Valparaíso.

**Métodos.**

**Reducción de NBT (Nitroblue Tetrazolium) en placa:** Polimorfonucleares de sangre periférica adheridos a una placa se activaron con forbol miristato acetato (PMA) (*Sigma Chemical Co.*, St. Louis MO) 1 mg/ml. La generación de radicales de oxígeno se evidenció por medio de la reducción del colorante NBT (Sigma) 1 mg/ml, con la consecuente formación de precipitados de formazan. Cada ensayo se hizo en paralelo con una prueba no estimulada y un control normal. La observación se realizó por microscopía óptica.

**Aislamiento de ADN genómico y PCR:** A partir de 5 ml de sangre total con anticoagulante EDTA, se obtuvo el ADN genómico (ADNg) de pacientes, familiares y 6 controles, por la técnica del ADNzol (Invitrogen). La reacción de polimerasa en cadena (PCR) se realizó en un termociclador marca Thermo Hybaid, modelo PCR Sprint. El volumen final de la reacción fue de 50 µl conteniendo 200 ng de ADN, 10 mM Tris-HCl pH=8,3, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µM de cada partidor, 2,5 U de Taq polimerasa (Invitrogen) y 200 µM de cada dNTP. Las condiciones de reacción fueron: 2 min a 95°C, 35 ciclos de 5 s a 94°C, 15 s a 50°C, 30 s a 72°C, y una extensión final de 7 min a 72°C. La pureza de los productos amplificados se midió por electroforesis en agarosa al 1,5% teñida con bromuro de etidio. Los partidores empleados para la amplificación del ADNg de los 13 exones de la proteína gp91-*phox* fueron diseñados de acuerdo a Patiño y col<sup>5</sup>.

**Análisis de polimorfismos conformacionales de cadena simple (SSCP):** Se estudió el polimorfismo conformacional de los fragmentos generados por PCR del ADNg de los pacientes, familiares y controles. Volúmenes iguales de los productos amplificados con tampón de carga (0,05% de azul de bromofenol, 0,05% cyanol xylene, 95% formamida y 20 mM EDTA) fueron denaturados a 80°C por 10 min y colocados inmediatamente en hielo. Se realizó una electroforesis no denaturante en un gel de poliacrilamida al 6%, TBE 0,6X, glicerol al 8% a 2 W toda la noche, a temperatura ambiente. Las bandas de ADN fueron teñidas con plata por métodos estándares<sup>6</sup>. El perfil de migración de las

bandas de los pacientes fue comparada con el perfil de sujetos controles normales.

**Secuenciación del ADN:** Los productos de PCR que dieron bandas alteradas en el SSCP se purificaron con el *kit Concert™ Rapid Purification System* (Life Technologies) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Los productos purificados fueron secuenciados con técnicas estándares en un secuenciador automático ABI 377 PE/Applied Biosystems. Las secuencias alteradas fueron comparadas con las secuencias normales a partir de los datos de GenBank (Número de acceso NM\_000397). La nomenclatura usada para describir los cambios encontrados en las secuencias se basó en las recomendaciones del *Human Genome Variation Society*, disponibles en Internet<sup>7</sup>. Los nucleótidos fueron numerados de acuerdo a la secuencia de ADN complementario donde el codón de inicio de la traducción es +1 y el nucleótido A del codón de inicio ATG es 13<sup>8</sup>.

RESULTADOS

**Reducción de NBT (Nitroblue Tetrazolium) en placa:** Los resultados del NBT en placa se muestran en la Tabla 1. En todos los ensayos se incluyó un control normal y una placa con muestra no estimulada como control de la técnica. Los pacientes P1 y P2 no son capaces de reducir la molécula NBT. La madre del paciente P1 reduce el NBT en 95% de las células, lo que se considera normal. En cambio la madre, abuela y tía materna del paciente P2 tienen entre 12% y 49% de sus células capaces de reducir el NBT (Tabla 1).

**Tabla 1. Reducción de NBT en placa de pacientes, sus familiares y controles**

	Reducción de NBT (%)
Paciente P1	0
Madre P1	95
Paciente P2	0
Madre P2	12
Abuela materna P2	42
Tía materna P2	49
Control	98

*SSCP y secuenciación del gen CYBB:* Estudiados todos los exones del gen de la molécula gp91-phox, sólo se encontró un perfil de migración alterado en el exón 10 del gen *CYBB* en ambos pacientes (Figura 1). En el SSPC del exón 10 del gen *CYBB* del paciente P1 se nota una alteración en la

migración con respecto al control. Al secuenciar se encontró una inserción c.1267\_1268insA (Figura 2) que altera el marco de lectura del ADN (*insertion frameshift*) a partir del codón 419 (Figura 3). El SSPC del exón 10 del paciente P2 y su madre mostró claras diferencias con respecto al control (Figura 1).

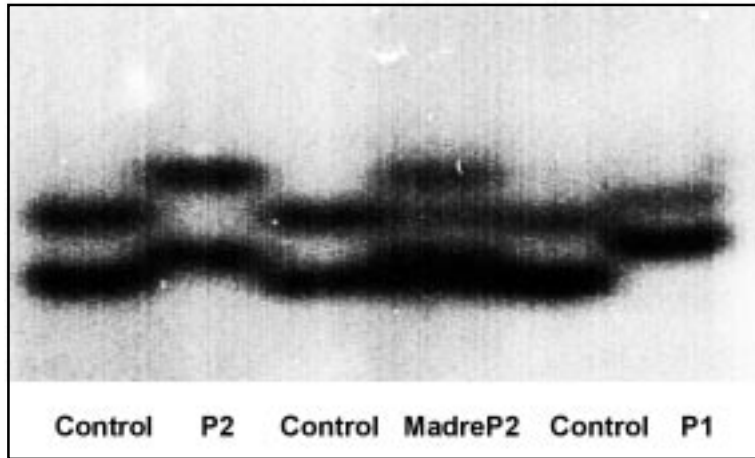


Figura 1. Polimorfismo conformacional de cadena simple (SSCP) del exón 10 del gen *CYBB*. La figura muestra el SSPC del exón 10 del gen *CYBB* efectuado en condiciones no denaturantes en 6% acrilamida, TBE 0,6X, 8% glicerol a 2 W toda la noche a temperatura ambiente de los pacientes P1 y P2, la madre de P2 y controles. Se puede observar un perfil de migración distinto en los pacientes con respecto a los controles. La madre del paciente P2 presenta 4 bandas, 2 de ellas corresponden a la migración del amplificado normal y las otras 2 al amplificado mutado, lo que demuestra su calidad de portadora.

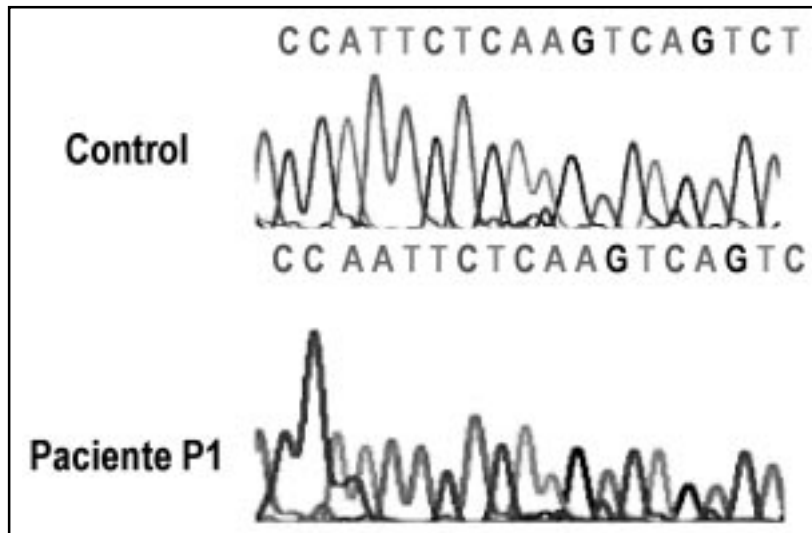


Figura 2. Secuenciación del exón 10 del gen *CYBB* del paciente P1. La figura muestra una porción del amplificado del exón 10 de un control sano y el paciente P1. Se observa una inserción c.1267\_1268insA en el paciente con relación a la secuencia normal.

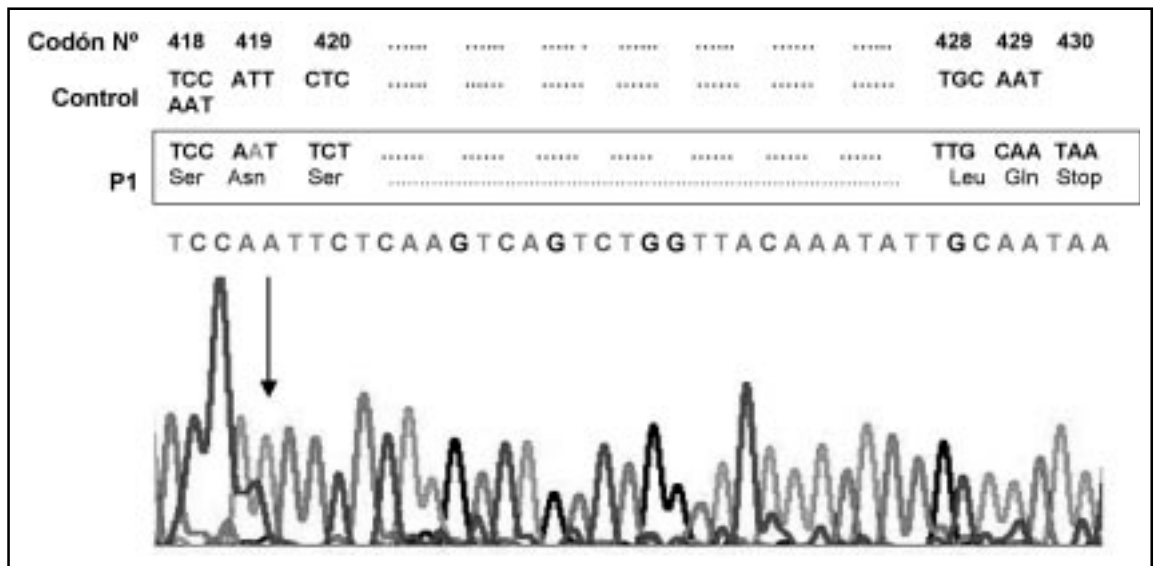


Figura 3. Representación de secuencia normal y la secuencia mutada del gen *CYBB* con la secuencia de aminoácidos esperada. La inserción c.1267\_1268insA en el exón 10 del gen *CYBB* que se produce en el paciente P1 altera el marco de lectura del mRNA y produce un cambio en la serie de aminoácidos a partir del codón 419 seguido de una señal de término prematuro en el codón 430 del mismo exón 10. Esto da como producto final un péptido de menor peso molecular al esperado.

La madre mostró el patrón normal y el patrón alterado similar al de su hijo. Se pueden observar claramente las 4 bandas. En el secuenciamiento del exón 10 del paciente P2 se encontró una mutación en el sitio de *splicing* del intrón 10 c.1326 +1 G>A (Figura 4). El secuenciamiento del exón 10 de la madre del paciente P2 demostró un patrón heterocigoto (Figura 4).

#### DISCUSIÓN

La EGC es causada por el defecto molecular que lleva a la ausencia, baja expresión o mal funcionamiento de uno de los componentes del sistema NADPH oxidasa. En la forma ligada al sexo, se afecta la cadena pesada del citocromo  $b_{558}$  o gp91-*phox* y en las formas autosómicas recesivas puede estar afectado uno de los componentes citosólicos de la NADPH oxidasa (p47-*phox* o p67-*phox*) o la cadena liviana del citocromo  $b_{558}$  (p22-*phox*). Hasta el momento, no se han documentado pacientes con EGC secundaria a defectos en los

componentes p40-*phox* y sólo uno que presenta una inmunodeficiencia secundaria a un defecto en el componente rac<sup>2</sup><sup>9</sup>.

El gen *CYBB* codifica la proteína gp91-*phox*, está compuesto por 13 exones y ocupa aproximadamente 30 kb de la región Xp21.1 del brazo corto del cromosoma X. Codifica una proteína de 570 aminoácidos (aa) distribuidos en cuatro dominios. El primero es el dominio N-terminal de aproximadamente 280 aa que cruza varias veces la membrana celular. El segundo es un dominio de unión a la molécula FAD (aa 278-397) y el tercero es el dominio de unión a la molécula NADPH (aa 398-483 y aa 504-570). El último dominio es un asa que se encuentra entre el dominio de interacción de la molécula NADPH conocido como *loop over* y comprende entre los aa 484 y 503<sup>1</sup>. La EGC ligada al X puede resultar de mutaciones en cualquiera de estos dominios de gp91-*phox*.

Los defectos en este gen pueden producir la ausencia de la molécula o la presencia de una molécula poco o no funcional. El mayor porcentaje de mutaciones se ha encontrado en el dominio

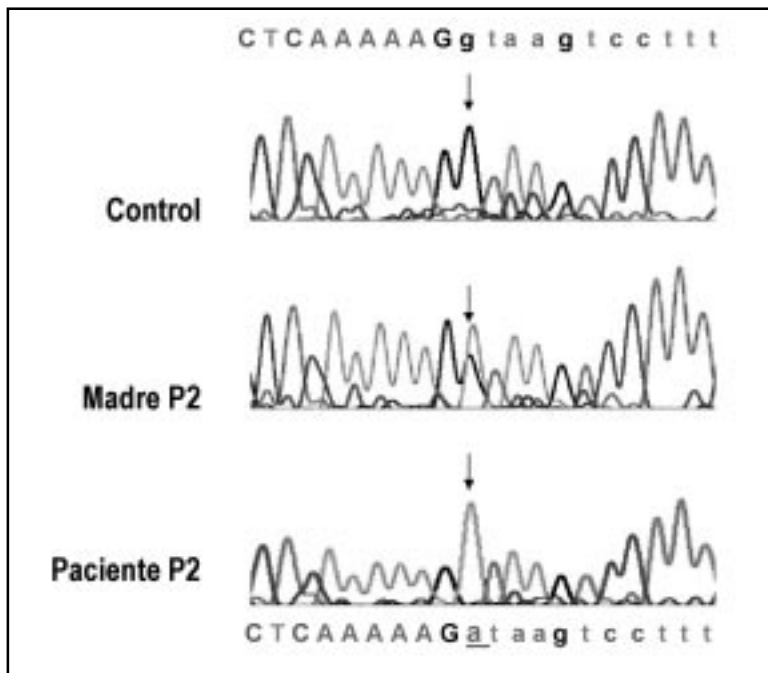


Figura 4. Secuenciamiento del exón 10 del gen *CYBB* del paciente P2 y su madre. La figura muestra una porción del amplificado del exón 10 (representado con letra mayúscula) y del intrón 10 (representado con letra minúscula) de un control sano, la madre del paciente P2 y el paciente P2. Se observa una sustitución en el *sitio splicing* del intrón 10 (c.1326 +1 G>A) en el paciente P2. En análisis de la misma secuencia en la madre del paciente P2 demuestra que la madre presenta ambas secuencias, la normal y la mutada.

N-terminal (60%) seguido por mutaciones en las regiones FAD y NADPH con 16% cada uno<sup>10</sup>. Las mutaciones más comunes son del tipo sin sentido (*nonsense*) y con cambio de sentido (*missense*) con 30% cada una. Le siguen las deleciones e inserciones con alteración del marco de lectura (*frameshift deletion or insertion*) con 15% y 11%, respectivamente. El 13% corresponden a mutaciones que se han localizado en las regiones intrónicas del gen, que generalmente impiden la correcta traducción de la proteína a partir del mRNA. También se ha reportado que aproximadamente 7% de los casos corresponden a grandes deleciones que incluso pueden ser multigénicas. Se han identificado a la fecha más de 300 mutaciones que llevan al fenotipo de EGC ligada a X.

La mayor parte de los pacientes con EGC ligada a X tienen mutaciones exclusivas de sus

familias, a diferencia de lo que ocurre con el gen de *p47-phox*, en donde la mayoría de los pacientes presentan la misma mutación<sup>4</sup>. La diversidad de estas mutaciones constituye una explicación para la heterogeneidad clínica de la EGC<sup>11</sup>. De esta manera, el estudio de las células de los pacientes con EGC, además de ilustrar la relevancia clínica de los compuestos intermediarios de oxígeno reactivo, posibilita la identificación de los diversos componentes de la NADPH oxidasa, así como también sus mecanismos de activación.

Patño et al<sup>5</sup> estudiaron 7 familias con EGC no relacionadas, en Colombia y Brasil. Identificaron mutaciones nuevas y a un paciente con una mutación *de novo*, ya que su madre no resultó ser portadora. Recientemente, en Argentina<sup>12</sup> se estudiaron 18 familias con EGC ligada a X en donde también se describen mutaciones

nuevas y mutaciones *de novo*. En el presente trabajo, se estudiaron 2 familias en las cuales se determinaron 2 mutaciones distintas en el gen *CYBB*. En el paciente P1 se encontró una inserción c.1267\_268insA con alteración del marco de lectura (*insertion frameshift*) del mRNA que da como resultado un cambio en la serie de aminoácidos a partir del codón 419 seguido de una señal de término prematuro en el codón 430 (Figura 3). Lo más probable es que el péptido que se produce sea degradado en el citoplasma y no se exprese en la membrana celular. Esta mutación es un nuevo reporte en la literatura. La madre del paciente P1 tiene una población de células capaces de reducir en forma normal la molécula NBT (Tabla 1). De acuerdo a lo esperado, la secuencia del exón 10 de la madre del paciente P1 resultó normal, por lo tanto ésta sería una mutación *de novo*. En el paciente P2 se encontró una sustitución en el *sitio splicing* del intrón 10 (c.1326 +1 G>A) (Figura 4). Este mismo hallazgo fue observado en la madre del paciente (Figura 4), lo que evidenció su condición de portadora para esta mutación. Aunque se intentó secuenciar el exón 10 de su abuela y tía materna, no se pudo demostrar la misma mutación. Sin embargo, la

prueba de NBT demuestra que son portadoras de una alteración en la gp-91 *phox*<sup>13</sup>.

Los resultados indican que las bases genético-moleculares de la deficiencia de gp91-*phox* ligada al X son heterogéneas y que la clínica de los pacientes es severa. Con ello se confirma que la caracterización de las mutaciones de los pacientes con EGC es fundamental para dilucidar la estructura y función de los componentes del sistema NADPH oxidasa. Sin embargo, a pesar de la intensa investigación clínica, bioquímica y molecular, existe mucho campo en la investigación en EGC, así como también de los mecanismos involucrados en la generación de radicales del oxígeno. Por lo tanto, investigaciones que permitan entender mejor las alteraciones del sistema NADPH oxidasa son fundamentales en el proceso de conocer en detalle la biología de las células fagocíticas. Esto permitirá, desarrollar alternativas de tratamiento que podrían incluso proponer la corrección del gen defectuoso.

Este trabajo constituye la primera comunicación en Chile de identificación de mutaciones que afectan el gen *CYBB* y corresponde a la colaboración entre investigadores pertenecientes al grupo Latino Americano de IDP (LAGID).

#### REFERENCIAS

1. HEYWORTH P, CROSS A, CURNUTTE J. Chronic granulomatous disease. *Curr Opin Immunol* 2003; 15: 578-84.
2. JOHNSTON RB JR. Clinical aspects of chronic granulomatous disease. *Curr Opin Hematol* 2001; 8: 17-22.
3. WINKELSTEIN JA, MARINO MC, JOHNSTON RB JR, BOYLE J, CURNUTTE JT, GALLIN JI ET AL. Chronic granulomatous disease. Report on a national registry of 368 patients. *Medicine* 2000; 79: 155-69.
4. CROSS AR, NOACK D, RAE J, CURNUTTE JT, HEYWORTH PG. Hematologically important mutations: the autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease (first update). *Blood Cells Mol Dis* 2000; 26: 561-5.
5. PATIÑO PJ, PÉREZ JE, LÓPEZ JA, CONDINO-NETO A, GRUMACH AS, BOTERO JH ET AL. Molecular analysis of chronic granulomatous disease caused by defects in gp91-*phox*. *Human Mutation* 1999; 13: 29-37.
6. SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T (EDS). *Molecular cloning. A laboratory manual*, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, N Y. 1989.
7. <http://www.hgvs.org/mutnomen/> Consultado en julio de 2005.
8. HEYWORTH PG, CURNUTTE JT, RAE J, NOACK D, ROOS D, VAN KOPPEN E ET AL. Hematologically important mutations: X-linked chronic granulomatous disease. *Blood Cells Mol Dis* 2001; 26: 561-5.
9. AMBRUSO DR, KNALL C, ABELL AN, PANEPINTO J, KURKCHUBASCHE A, THURMAN G ET AL. Human neutrophil immunodeficiency syndrome is associated with an inhibitory Rac2 mutation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 4654-9.

10. VÄLIAHO J, PUSA M, YLINEN T, VIHINEN M. IDR: the Immuno deficiency resource. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: 232-4.
11. ROOS D, CURNUTTE JT, HOSSLE JP, LAU YL, ARIGA T, NUNOI H ET AL. X-CGDbase: a database of X-CGD-causing mutations. *Immunol Today* 1996; 17: 517-21.
12. BARESE C, COPELLI S, ZANDOMENI R, OLEASTRO M, ZELAZKO M, RIVAS EM. X-linked chronic granulomatous disease: first report of mutations in patients of Argentina. *J Pediatr Hematol Oncol* 2004; 10: 656-60.
13. SEGAL HH, LETO TL, GALLIN JI, MALECH HL, HOLLAND SM. Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease. *Medicine* 2000; 79: 170-200.

#### *Agradecimientos*

A los pacientes y sus familias por su colaboración. Al Dr. Pablo Patiño por su valiosa asesoría. En memoria de la Dra. Mónica Cornejo De Luigi (Q.E.P.D).