

*APROXIMACIÓN GENÉTICA EN UNA  
FAMILIA COLOMBIANA CON PORFIRIA  
INTERMITENTE AGUDA*

Daniel Camilo Nariño Rojas – 201126575  
Universidad de los Andes  
Enero de 2017

*Trabajo de Grado en Biología*

*Directora: María Claudia Lattig | Codirector: John Mario González*

## **APROXIMACIÓN GENÉTICA EN UNA FAMILIA COLOMBIANA CON PORFIRIA INTERMITENTE AGUDA**

*Daniel Camilo Nariño Rojas (201126575), María Claudia Lattig (Directora) – Facultad de Ciencias, John Mario González (Codirector) – Facultad de Medicina*

### **RESUMEN**

La porfiria es un conjunto de enfermedades metabólicas, generalmente hereditarias, que generan una acumulación de porfirinas, ocasionado por anomalías en algunas enzimas que participan en la vía de síntesis del grupo heme, el cual interactúa con varias proteínas entre las que se encuentra la hemoglobina. La porfiria intermitente aguda (PIA) es un tipo común de porfiria neurológica y se caracteriza por presentar un patrón de herencia autosómico dominante y penetrancia incompleta. Mutaciones en el gen de la Porfobilinógeno desaminasa; también conocido como hidroximetilbilano sintetasa (HMBS) son responsables de esta condición. El diagnóstico de PIA se realiza midiendo los niveles de porfirinas en orina y es confirmado por pruebas moleculares. Dado que existe una penetrancia incompleta es importante realizar pruebas moleculares con el fin de comprender mejor el comportamiento de la enfermedad. El objetivo general de este estudio fue realizar una correlación fenotipo-genotipo en una familia colombiana de cuatro generaciones con diagnóstico de porfiria intermitente aguda. Para esto se revisaron las historias clínicas de todos los individuos de la familia que deseen participar, se elaboró el árbol genealógico de la familia para evidenciar el patrón de herencia, y finalmente se espera identificar la mutación en el gen HMBS y su co-segregación con la enfermedad en esta familia.

**Palabras clave:** Porfiria, HMBS, mutación, autosómico dominante, penetrancia incompleta.

### **ABSTRACT**

Porphyria is a set of metabolic diseases, usually hereditary, that generate an accumulation of porphyrins, caused by abnormalities in some enzymes involved in the pathway of synthesis of the heme group, which interacts with several proteins including hemoglobin. Acute intermittent porphyria (AIP) is a common type of neurological porphyria and is characterized by a pattern of autosomal dominant inheritance and incomplete penetrance. Mutations in the Porphobilinogen deaminase gene; Also known as hydroxymethylbenzene synthetase (HMBS) are responsible for this condition. The diagnosis of AIP is performed by measuring porphyrin levels in urine and is confirmed by molecular tests. Since there is

incomplete penetrance it is important to perform molecular tests in order to better understand the behavior of the disease. The overall objective of this study was to perform a phenotype-genotype correlation in a Colombian family of four generations with diagnosis of acute intermittent porphyria. For this, the clinical records of all the individuals in the family who wish to participate were reviewed, the family tree was elaborated to show the inheritance pattern, and finally it is expected to identify the mutation in the HMBS gene and its co-segregation with The disease in this family.

**Key Words:** Porphyria, HMBS, mutation, autosomal dominant, penetrance.

## INTRODUCCIÓN

La porfiria es un grupo de enfermedades metabólicas que generan una acumulación de porfirinas y de precursores de estos compuestos químicos. Esto se debe a anormalidades generadas en algunas enzimas que participan en la vía de síntesis del grupo heme, el cual es un grupo prostético que interactúa con varias proteínas, y entre estas se encuentra la hemoglobina (Jiao, et al., 2015). Las porfirinas son estructuras cíclicas tetrapirrólicas que, al unirse con diversos metales, forman metaloporfirinas (Rodríguez Alvarez, Rodríguez de Alba, & Panadero, 2007). De estas, la que tiene mayor importancia biológica es la que contiene hierro, ya que interviene en el ciclo de formación del grupo heme. En su forma biológica activa, el grupo heme se une a varias proteínas para formar hemoproteínas, incluyendo la hemoglobina, la mioglobina, y todos los citocromos que en conjunto con otros compuestos intervienen en múltiples reacciones de oxidación e hidroxilación (Rodríguez Alvarez, Rodríguez de Alba, & Panadero, 2007). Los principales sitios de producción del grupo hemo en los vertebrados son la médula ósea; desarrollando eritrocitos, y el hígado; generando hepatocitos (Bonkovsky, et al., 2013). Por lo anterior, las porfirias generalmente se clasifican de acuerdo con el sitio principal de sobreproducción de porfirinas o de sus precursores, siendo de este modo hepáticas o eritropoyéticas (Bonkovsky, et al., 2013). Dentro de las porfirias hepáticas se encuentran: la Porfiria Intermitente Aguda (PIA), la Porfiria Cutánea Tarda (PCT), la Porfiria Hepatoeritropoyética (PHE) la cual se presenta en forma homocigótica, la Porfiria Variegata (PV) y la coproporfiria hereditaria (Porfirias, 2013). Ahora, las porfirias eritropoyéticas abarcan la Porfiria Eritropoyética congénita (PEC), la cual se hereda en un patrón autosómico recesivo, y la Protoporfiria Eritropoyética (PPE) (Porfirias, 2013). Desde el punto de vista clínico se pueden hacer las divisiones en porfirias eritropoyéticas y hepáticas, porfirias cutáneas o no-cutáneas, porfirias agudas y crónicas, y porfirias con síndrome de fotosensibilidad.

La porfiria intermitente aguda (PIA; OMIM#176000] es un tipo común de porfiria neurológica. La PIA se caracteriza por síntomas como dolores abdominales, estreñimiento, vómito y ataques neurológicos, sin embargo, sólo 10% a 20% de los afectados expresan los síntomas. El diagnóstico, generalmente, se realiza obteniendo muestras de orina de los pacientes y midiendo los niveles de porfirinas en la orina (Gómez Gonzaga, et al., 2015). Actualmente, el tratamiento de elección de las crisis de PIA es la administración de hemina, la cual suprime la actividad hepática de la ALA sintetasa, lo que produce una disminución de la producción de porfirinas (Gázquez Sisteré, Luján Mavilla, Chordá Ribelles, & Touzón López, 2010). De todas maneras, la hemina no se ha demostrado útil para el tratamiento de los síntomas crónicos entre los ataques (Gázquez Sisteré, Luján Mavilla, Chordá Ribelles, & Touzón López, 2010).

Para la PIA generalmente se esperan 3 secuencias de síntomas, empezando por dolores abdominales ligados como vómitos y constipación. Posteriormente se pueden presentar síntomas psiquiátricos tales como histeria, o pueden mostrar signos de daños en el sistema

nervioso central los cuales podrían desencadenar convulsiones, depresión o coma. Finalmente, se podrían manifestar neuropatías periféricas, especialmente neuropatías motoras que son muy parecidas al síndrome de Guillain-Barré, y la debilidad en los músculos generalmente comienza en los miembros inferiores y va ascendiendo (Macalusa, 2011). El diagnóstico de la porfiria intermitente aguda generalmente se basa en síntomas clínicos y pruebas bioquímicas, como la determinación de porfobilinógenos y ácido aminolevulínico en la orina, y actividad enzimática (Maeda, et al., 2000). La prueba de actividad de la HMBS en eritrocitos es el ensayo clínico más confiable para diagnosticar pacientes con PIA, tanto sintomáticos como latentes (Maeda, et al., 2000). En Colombia sólo se detecta la presencia de porfirinas en orina y no se mide la actividad enzimática. Los diagnósticos se han realizado, además de la presencia de porfirinas en la orina, por sospecha clínica junto con los antecedentes familiares.

La PIA se caracteriza por presentar un patrón de herencia autosómico dominante y penetrancia incompleta. Mutaciones en el gen de la Porfobilinógeno desaminasa; también conocida como hidroximetilbilano sintetasa (HMBS; GeneID609806), juegan un papel importante en este caso (Jiao, et al., 2015). El gen HMBS, localizado en el cromosoma 11q24.2-24.2 tiene 10kb de longitud con 15 exones que son transcritos por dos promotores distintos. Desde que la primera mutación fue registrada por Grandchamp et al., 1989, más de 380 mutaciones diferentes y 21 polimorfismos han sido reportados en el gen HMBS, lo que demuestra una gran variabilidad en esta enfermedad metabólica. Este hallazgo sugiere que HMBS es muy propenso a mutaciones que son específicas para familias, ya que en sólo algunos casos la misma mutación ha sido encontrada en pacientes afectados por PIA (Gómez Gonzaga, et al., 2015). No se ha evidenciado una clara correlación entre la mutación y las manifestaciones clínicas. La misma mutación puede generar fenotipos más o menos leves en diferentes individuos.

Igualmente, la baja penetrancia (10-20%), es decir que la presencia de la mutación es importante pero no suficiente para la manifestación clínica de la enfermedad, incrementa aún más la complejidad genética de esta enfermedad. En este momento no existe información acerca de factores genéticos adicionales que puedan estar presentes con la variante patogénica del gen HMBS y que podría estar modificando la función de este.

## **OBJETIVO GENERAL**

Realizar una correlación fenotipo-genotipo en una familia de cuatro generaciones con diagnóstico de porfiria intermitente aguda.

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Realizar un árbol genealógico en donde se pueda evidenciar el patrón de herencia en dicha familia.
- Identificar la mutación en el gen HMBS responsable de la porfiria intermitente aguda en esta familia.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### ***Población de estudio***

Se trabajará con una familia de 38 individuos a lo largo de 4 generaciones.

- El proyecto fue explicado a todos los miembros de la familia por alguno de los investigadores del grupo. Aquellos individuos que decidan participar en el estudio de manera voluntaria, deberán firmar el documento de consentimiento informado, en el cual se describe el estudio y las condiciones de su participación.

### ***Recolección y almacenamiento de la información:***

- Posterior a la firma del consentimiento informado, se procedió a la recolección de una muestra de sangre periférica para la extracción del ADN de todos los miembros de la familia que quisieron participar en el estudio. Esta muestra fue tomada por un profesional de salud entrenado y se conservaron las medidas de seguridad requeridas. Ya que las personas viven en diferentes ciudades de Colombia, se buscó el sitio (laboratorio clínico) de toma en cada sitio
- Para proteger la privacidad a cada participante se le asignó un código de identificación. Así PF001 y así consecutivamente.

### ***Aspectos éticos:***

- La realización de este proyecto busca el desarrollo y el beneficio social basados en los principios fundamentales de la ética: *respeto por las personas, justicia y beneficencia*.
- Este estudio se clasifica como de menor riesgo según los lineamientos de la resolución No. 008430 de 1993 del Ministerio de Salud sobre las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud, enfatizando: Título II (de la investigación en seres humanos), capítulo I (de los aspectos éticos de la investigación en seres humanos). El estudio se sometió al Comité de Ética en

Investigaciones de la Universidad de los Andes. Ya que se realizó una toma de muestra de sangre periférica se considera un estudio de bajo riesgo.

### ***Determinación fenotípica***

Uno de los miembros del equipo de investigación revisó las historias clínicas de los individuos afectados y no afectados con el fin de asegurar el diagnóstico de PIA en la familia. La información suministrada es de carácter confidencial y solo el investigador principal tendrá acceso a esta. Se centró en presencia de síntomas o signos en ataques previos, hospitalizaciones y que se haya detectado porfirinas en orina.

### ***Genealogía***

A partir de los datos obtenidos para la familia se procedió a realizar el árbol genealógico y determinar el patrón de herencia

### ***Análisis molecular***

#### ***- Extracción de ADN***

Se recolectaron muestras de sangre y se depositaron en tubos con EDTA. Posteriormente se separaron los glóbulos blancos para la extracción de ADN. Para la extracción de ADN se utilizó el kit para aislamiento de ADN humano CorpoGen DNA 2000 y se procedió siguiendo las instrucciones del fabricante. Al finalizar el protocolo de extracción se cuantificó el ADN obtenido para cada muestra, utilizando el equipo NanoDrop 2000.

#### ***- Amplificación y secuenciación***

Se amplificaron los 15 exones del gen HMBS mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para esto se utilizaron 8 parejas de primers (Tabla 1.), los cuales fueron diseñados teniendo como referencia reportes previos (Schreiber et al., 1994).

EXÓN A AMPLIFICAR	Nombre	PRIMER	Tamaño fragmento
1	HMBS.E1	5'TGGTCGAATGGGGAGGTCCA 5' CCAATCGCTGCACGGCTCGT	190bp
2 Y 3	HMBS.E2_3	5' ACCTGGCTGTGCACAGCACT 5' GATGCTGTGAGCATCATAAC	322bp
4	HMBS.E4	5' TAAAGAGTCTGAGCCGTGCC 5' TGTTGTGTTCTCTCCTCTGC	73bp
5 Y 6	HMBS.E5_6	5' GCTAGGCTCAGTAAATGCTG 5' ATACTAGGGTCCCAGCAAGA	191bp
7	HMBS.E7	5' TGAAGGCTGGCTGCTCATAAC 5' AGGTTACATGATGCCTACC	78bp
8 Y 9	HMBS.E8_9	5'GAGAGAGAATAGAGGTGATC 5' CTGCTGTCTCCGCTCACTCTT	276bp
10	HMBS.E10	5' AGATTGCCCGACACTGTGGT 5'AAGGAGATGCAGATGAGCTG	114bp
11 A 15	HMBS.E11_15	5' GCTTTTAGACACCCCGTGT 5' AGCAACCCAGGCATCTGTGC	1423bp

**Tabla 1.** Primers utilizados para amplificar los 15 exones del gen HMBS.

Hubo algunos exones que se juntaron de a parejas en un mismo amplicon; 2-3, 5-6, 8-9, 11-15. La mezcla de PCR llevó 10uL de GoTaq Hot Start Green Master Mix, 1uL de cada primer (Forward y Reverse), 1 a 2uL de ADN templado dependiendo de la concentración arrojada al cuantificar con el equipo NanoDrop 2000, y se aforó con 6 a 7uL de agua desionizada para obtener un volumen total de 20uL. La temperatura de anillaje en las condiciones de los ciclos fueron establecidas diferencialmente para varios grupos de fragmentos a amplificar: Una denaturación inicial de 94°C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos de 94°C por 45 segundos, 60°C por 45 segundos de temperatura de anillaje, 72°C por 1 minuto; por último una elongación final a 72°C por 10 minutos, estas condiciones de termociclaje fueron implementadas para amplificar los exones 5-6, 7, 8-9, 10 y 11-15. Para el exón 1 se tuvo en cuenta una temperatura de 59°C por 45 segundos, con el mismo número de ciclos, para su amplificación. Los fragmentos que contienen los exones 2-3 y 4 todavía no se han podido amplificar y se está calibrando la temperatura de anillaje óptima para su amplificación. Después de su amplificación, los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis en un gel de agarosa al 1% con un voltaje de 80V y por un periodo de corrido de 30 minutos. Los productos de PCR, junto con los primers forward pertinentes a cada fragmento, fueron enviados al Centro de Secuenciación del Departamento de Ciencias Biológicas para su secuenciación.

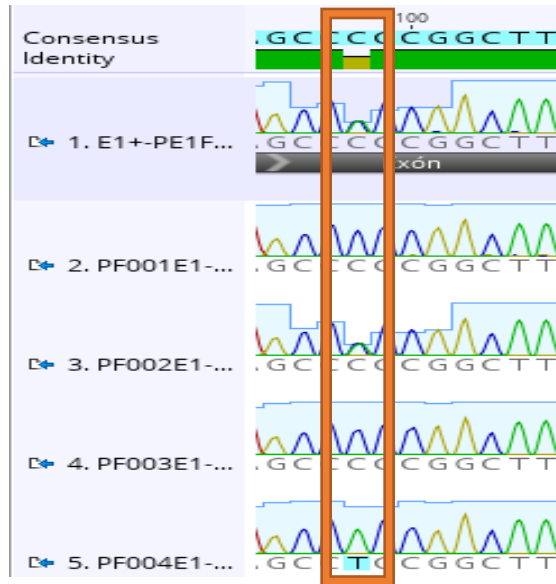
- ***Análisis de secuencias***

Las secuencias obtenidas del Centro de Secuenciación del Departamento de Ciencias Biológicas fueron limpiadas, ensambladas, y se obtuvo la secuencia consenso de cada muestra mediante el programa Geneious®10.0.6.

## **RESULTADOS**

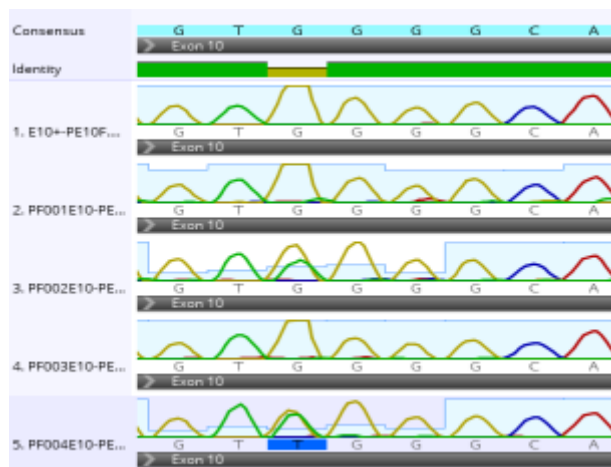
De acuerdo con el ensamblaje de secuencias por exón, se pudo establecer que en el caso del exón 1 se presenta un SNP para una de las muestras (PF004E1), en donde se cambia una citosina (C) por una Timina (T)(Figura 1.). De todas maneras, al traducir el ADN codificante a proteína, se observó que no se produjeron cambios en la secuencia de aminoácidos de la proteína, por lo que se considera a la variación de la base como un SNP sinónimo. Además, ya se había reportado este polimorfismo antes en la base de datos de NCBI y acá lo clasifican como una variación sin importancia clínica.



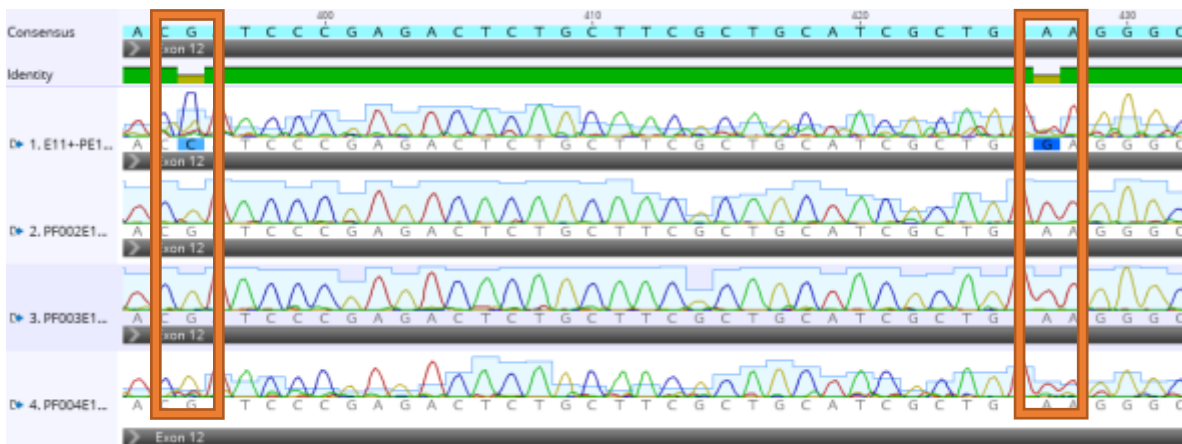


**Figura 1.** Alineamiento de secuencias para el exón 1 donde se muestra un SNP en la secuencia PF004E1

Para el caso del exón 5-6 no se presentaron variaciones en bases en ninguna de las secuencias alineadas, todas las secuencias tienen regiones intrónicas y exónicas idénticas. En las secuencias del exón 7 y 8-9 tampoco se encontraron variaciones de bases significativas en el alineamiento, se muestra la región del exón idéntica en todas las secuencias. Para el exón 10 se pudo evidenciar una variación en la secuencia PF004E10 donde se cambia una guanina (G) por una timina (T) (Figura 2.), y se tuvo en cuenta en el análisis ya que se mostraba un solapamiento de picos en el cromatograma. Cuando se revisó si esta variación de base generaba algún cambio a nivel de codón en la secuencia de aminoácidos de la proteína, ésta resultó ser sinónima.



**Figura 2.** Alineamiento de secuencias para el exón 10 donde se muestra un SNP en la secuencia PF004E10

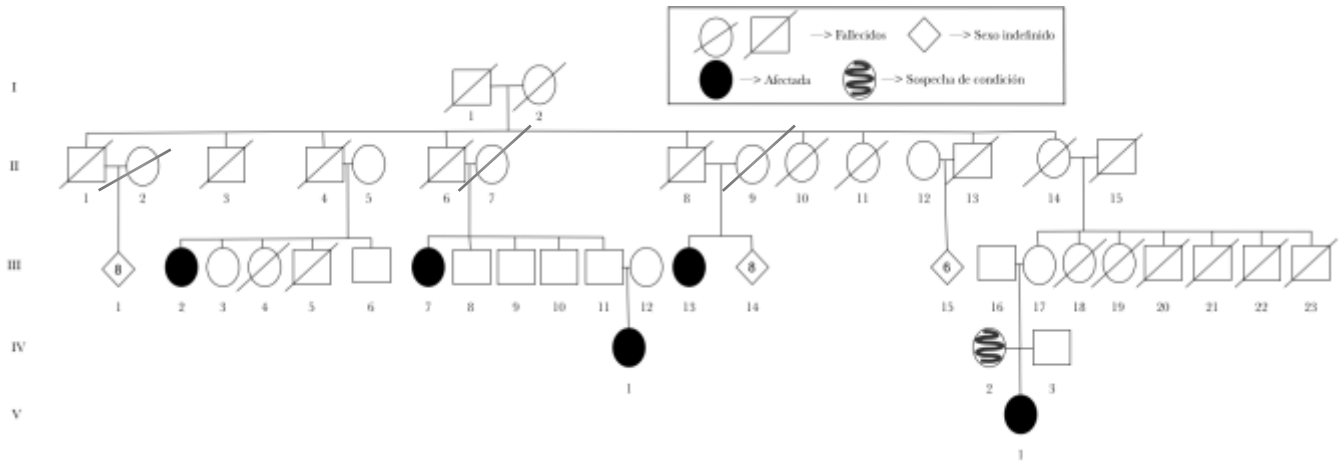


**Figura 3.** Alineamiento de secuencias para el exón 12 donde se muestran dos posibles SNPs

En el exón 11 no se presentan polimorfismos en ninguna de las secuencias analizadas. El exón 12 presenta una variación en la posición 395, de guanina a citosina;  $G \rightarrow C$ , en la secuencia E11-PF1115 (Control) (Figura 3.). Además, hay otra variación en la posición 427, de adenina a guanina;  $A \rightarrow G$ , para la secuencia control (Figura 3.). De todas maneras los picos y la calificación que arroja el programa indica que ambas variaciones son de baja calidad. El exón 13 no alcanza a verse totalmente secuenciado. Y los exones 14 y 15 no aparecen secuenciados. Lo anterior se debe al gran tamaño del fragmento amplificado. Próximamente se procederá a enviar el amplificado del fragmento del exón 11 al 15 nuevamente a secuenciar, pero esta vez se utilizará el primer reverse con la intención de poder secuenciar los exones 15, 14 y 13.

**Tabla 2.** Resumen de las variaciones encontradas en las muestras analizadas.

Muestra	Exón	Cambio de nucleótido	Cambio de aminoácido	Registro
PF004	1	98C $\rightarrow$ T	No	Ya ha sido reportado (NCBI: rs589925)
PF004	10	73G $\rightarrow$ T	No	Ya ha sido reportado (NCBI: rs1131488)
E11+-PF1115	12	427A $\rightarrow$ G	No	Ya ha sido reportado (NCBI: rs753280372)



**Figura 4.** Genealogía de la familia colombiana con individuos afectados con porfiria intermitente aguda.

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El patrón de herencia autosómico dominante no es claro en la genealogía de esta familia colombiana. Se le otorga una gran importancia a la penetrancia incompleta que presenta la enfermedad. Además, sería de bastante utilidad analizar muestras de los individuos III:17 y IV:2 (Figura 2.) con el fin de establecer con mayor claridad el patrón de herencia. Además, resultaría útil analizar una muestra del individuo II:12 ya que es la única mujer viva de esa generación y al no estar afectada con la enfermedad se podría usar su información como un control. Hasta el momento todos los SNPs han sido variantes sinónimas y han sido reportadas, por lo que no se ha encontrado la mutación responsable de la PIA en esta familia. Sin embargo, todavía hace falta analizar 7 exones con la esperanza de encontrar la mutación causante de la enfermedad en esta familia.

## Referencias

- Bonkovsky, H., Guo, J.-T., Hou, W., Li, T., Narang, T., & Thapar, M. (2013). Porphyrin and Heme Metabolism and the Porphyrins. *Comprehensive Physiology*, 365-401.
- Gázquez Sisteré, I., Luján Mavilla, K., Chordá Ribelles, J., & Touzón López, C. (2010). La porfiria aguda intermitente, un problema diagnóstico. *Gastroenterología y Hepatología*, 436-439.
- Gómez Gonzaga, A. D., da Fonte de Amorim, L. M., Monteiro Fonseca, A. B., Santos Nogueira, T. L., Diniz Pereira, O. M., Nagai, M. A., . . . Severo Ribeiro, G. (2015). Hydroxymethylbilane Synthase Gene Mutations and Polymorphisms in Brazilian Families with Acute Intermittent Porphyrin. *Annals of Human Genetics*, 162-172.
- Grandchamp, B., Picat, C., Mignotte, V., Wilson, J. H., Te Velde, K., Sandkuyl, L., . . . Nordmann, Y. (1989). Tissue-specific splicing mutation in acute intermittent porphyria. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 661-664.
- Jiao, H., Xianfeng, Z., Hui, H., MaLizhen, Yuhong, Z., & Chu, Z. (2015). A novel mutation, IVS2-2A-->G, associated with acute intermittent porphyria in a Chinese family. *J Pak Med Assoc*, 898-900.
- Lahiry, D., & Nurnberger, J. (1991). A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Research*, 5444.
- Macalusa, J. P. (17 de Agosto de 2011). *El Rincón de la Medicina Interna*. Recuperado el 8 de Marzo de 2016, de <http://www.elrincondelamedicinainterna.com/2011/08/porfiria-aguda-intermitente.html>
- Maeda, N., Horie, Y., Adachi, K., Namba, E., Kawasaki, H., Daimon, M., . . . Kondo, M. (2000). Two deletion mutations in the hydroxymethylbilane synthase gene in two unrelated Japanese patients with acute intermittent porphyria. *Japanese Society of Human Genetics*, 263-268.
- Porfirias. (2013). *Universidad de Valencia*. Recuperado el 2 de Mayo de 2016, de Facultad de Medicina: <http://www.uv.es/derma/CLindex/CLporfirias/Porfirias.pdf>
- Rodríguez Alvarez, M., Rodríguez de Alba, M., & Panadero, F. (2007). Porfirias. *Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos*, 1-14.