

## Tamizaje genético del gen HMBS para porfiria intermitente aguda.

Ana M. Acero Ortega\*; María C. Lattig\*\*; John M. González\*\*\*

\*Estudiante de Microbiología y Biología – Departamento de Ciencias Biológicas (Facultad de Ciencias) Universidad de los Andes.

\*\*Profesor Asociado – Departamento de Ciencias Biológicas (Facultad de Ciencias) Universidad de los Andes.

\*\*\*Profesor Titular – Departamento de Medicina (Facultad de Medicina) Universidad de los Andes.

### Resumen

La porfiria se refiere a desordenes genéticos que afectan la biosíntesis del grupo *heme* causando acumulación de precursores de la ruta de síntesis de las porfirinas. La Porfiria Aguda Intermitente es una enfermedad autosómica dominante con penetrancia incompleta, que resulta de una deficiencia en la enzima porfobilinógeno deaminasa (PBGD). El gen HMBS contiene la información para la síntesis de la enzima PBGD y un déficit de esta causa acumulación de ácido delta-aminolevulínico y porfobilinógeno en el hígado. En este gen se han encontrado más de 300 mutaciones que llevan al fenotipo de porfiria aguda intermitente. Este proyecto busca encontrar la relación entre el fenotipo y el genotipo de una familia colombiana diagnosticada previamente con porfiria intermitente aguda a lo largo de sus generaciones. Se usaron muestras de sangre de la familia para la extracción de ADN con el cual se realizó la amplificación de las muestras por PCR de los exones 11, 12, 13, 14 y 15 del gen HMBS. A partir de esto se identificó la posible variante patogénica situada en la región conservada de fin del splicing antes del exón 15 en el individuo 1 y 3 de la familia.

Palabras clave: Porfiria, gen HMBS, mutación, splicing.

### Abstract

Porphyria refers to genetic disorders that affect the heme biosynthesis causing accumulation of precursors of the porphyrin synthesis pathway. Acute Intermittent Porphyria is an autosomal dominant disease with incomplete penetrance, which results from a deficiency in the porphobilinogen deaminase enzyme (PBGD). The HMBS gene contains the information for the synthesis of the enzyme PBGD and a deficit of this cause accumulation of delta-aminolevulinic acid and porphobilinogen in the liver. In this gene, more than 300 mutations have been found that lead to the phenotype of acute intermittent porphyria. This project seeks to find the relationship between the phenotype and the genotype of a Colombian family previously diagnosed with acute intermittent porphyria throughout their generations. Blood samples from the family were used for the extraction of DNA with which the amplification of the samples was carried out by PCR of exons 11, 12, 13, 14 and 15 of the HMBS gene. From this, the possible pathogenic variant located in the conserved region of end of splicing in the exon 15 in individual 1 and 3 of the family was identified.

Key words: Porphyria, HMBS gene, mutation, splicing.

## 1. Introducción

El término porfiria, encierra desordenes genéticos que afectan la biosíntesis del grupo heme pues causa acumulación de precursores de la ruta de síntesis de las porfirinas, como lo son el ácido delta-aminolevulínico (ALA) y porfobilinógeno (PBG) (Grupos AR y C, 2016). Los primeros casos se reportaron en 1874 como “penfigus leprosus” por Schultz y Baumstark. Además, Waldenström caracterizó los síntomas de la porfiria aguda como cólicos abdominales, neuropatía periférica, parálisis, psicosis y coma (Argüello, et al., 1978). Desde 1889 se empezaron a informar casos de porfiria intermitente aguda (PIA), la cual actualmente es la más común del grupo de las porfirias en Estados Unidos y Europa (Argüello, et al., 1978). Esta enfermedad tiene una prevalencia de 1 a 5 habitantes por cada 100000, por lo cual se esperan por lo menos 450 casos en Colombia, de los cuales la minoría están informados. (Rago & Batista, 2011)

En los síntomas de las porfirias agudas se presenta dolor abdominal, con un 85% de recurrencia, y síntomas psiquiátricos y neurológicos. La fase inicial puede llegar a ser mortal pues predominan las convulsiones, el estado de coma y la parálisis bulbar pues hay una elevación de la porfirina ALA y de PBG. La PIA resulta de una deficiencia de porfobilinógeno deaminasa (PBGD), la cual cataliza el paso de la biosíntesis responsable de formar hidroximetilbilano (HMB), paso intermedio para la formación de uroporfirinógeno I. En los ataques de Porfiria Intermitente Aguda, el sistema de regulación en el hígado para el grupo hemo se acaba y se estimula la síntesis de ácido delta-aminolevulínico sintasa 1; encargada de limitar la síntesis del grupo hemo en el hígado, dando como resultado una acumulación de ALA y PBG. Las manifestaciones neurológicas se desencadenan por la neurotoxicidad de los intermediarios o productos de la vía heme. Las causas posibles pueden ser el aumento de concentración de ALA, el decrecimiento de la generación de hemoproteínas o la disminución de óxido nitroso por fallos en su producción. Otro síntoma característico de la PIA es la orina oscura la cual se produce por la degradación de la PBG para formar porfobilina. (Rago & Batista, 2011)

La porfiria intermitente aguda presenta un mecanismo de herencia autosómico dominante. A pesar de esto, la mayoría de las personas con una mutación presente en la PGBD nunca desarrollan síntomas o son muy leves. Esto, lleva a la conclusión de que en la enfermedad también existe un patrón de penetrancia incompleta, pues puede que no se desarrolle en generaciones o que solo pueda ser diagnosticada en un individuo de la familia. Además, el índice de sospecha para el diagnóstico es alto pues los síntomas son inespecíficos e imitan otras enfermedades (Rago & Batista, 2011). Por lo anterior, la falta de reconocimiento clínico y la posible demora a la hora de diagnosticar a un paciente, aumenta la mortalidad. La sospecha puede confirmarse con exámenes para los niveles de PBG, ALA o porfirinas totales en orina y sangre. Después de confirmarse la sospecha, se utiliza como tratamiento más efectivo la hemina intravenosa. (Lozano, Tovar & Ortiz, 2008)

El gen HMBS contiene la información para la síntesis de la enzima porfobilinógeno deaminasa o hidroximetilbilano sintasa, una de las encargadas de la producción de las moléculas hemo. Esta molécula es esencial para órganos como: sangre, médula ósea e hígado. En este gen se han encontrado más de 300 mutaciones que llevan al fenotipo de porfiria aguda intermitente. Estas mutaciones pueden darse por inserciones, deleciones o mutaciones no sinónimas. El gen se encuentra en la posición 11q23.3 es decir, en el brazo largo del cromosoma 11, más específicamente, entre los pares de bases 119,084,871 a 119,093,549 del cromosoma 11 (NIH, 2009).

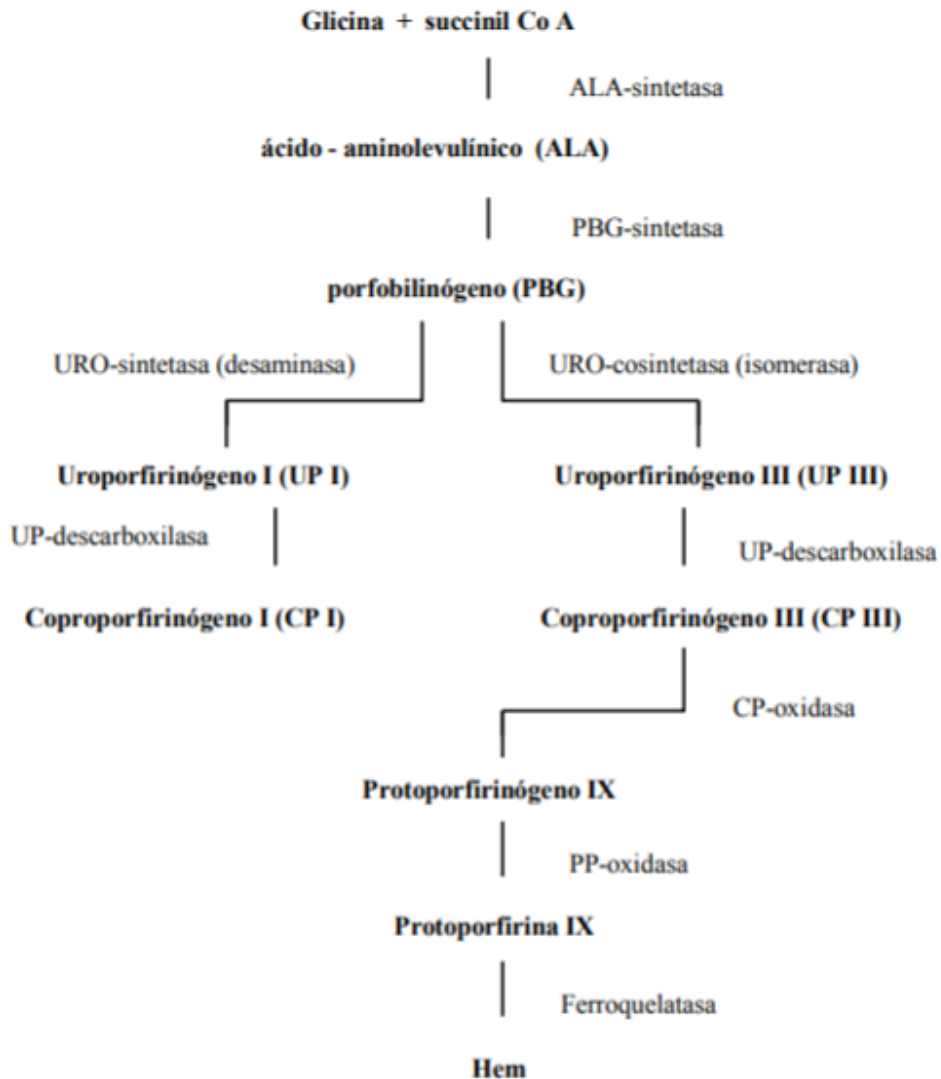


Figura 1. Ciclo metabólico de las porfirinas para la síntesis del grupo heme. Tomado de: <https://www.uv.es/derma/CLindex/CLporfirias/Porfirias.pdf>

Este proyecto busca encontrar la relación entre el fenotipo y el genotipo del gen HMBS de una familia diagnosticada previamente con porfiria intermitente aguda a lo largo de sus generaciones. De esta forma identificar la mutación o variante patogénica en los exones del gen HMBS responsable del fenotipo de la familia. Para por último verificar que el genotipo y el fenotipo coincidan. Por último, este estudio es la continuación de un trabajo de grado iniciado por Daniel Nariño en el 2016 llamado “Aproximación genética en una familia colombiana con porfiria intermitente aguda”.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Población de estudio

Se usaron muestras de sangre de 4 individuos en una familia de 38 individuos pertenecientes a 4 generaciones, las cuales fueron recolectadas previamente en el 2016 en tubos con EDTA.

## 2.2. Aspectos éticos

Este estudio fue evaluado por el comité de ética de la Universidad de los Andes. Además, fue basado en principios éticos fundamentales: *respeto por las personas, justicia y beneficencia*. El estudio está clasificado como de menor riesgo según 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”.

## 2.3. Análisis molecular

### 2.3.1 Extracción de ADN.

A partir de las muestras de sangre recolectadas se separaron los glóbulos blancos por centrifugación 20 min a 13000 rpm. Luego, se utilizó el kit CorpoGen DNA 2000 para lograr el aislamiento del ADN siguiendo las instrucciones detalladas del fabricante. Por último, a partir de la utilización del equipo NanoDrop 2000 se midió la cantidad de ADN obtenida en cada muestra para verificar la viabilidad de esta para realizar la PCR.

### 2.3.2 Secuenciación

Se realizó la amplificación de las muestras de ADN por PCR de los exones 11, 12, 13, 14 y 15 del gen HMBS. Para esto, se utilizaron primers específicos usados en el estudio previo (Nariño, 2016), con el fin de lograr la secuenciación de los exones de interés. La mezcla de 20 uL para la PCR utilizó 10 uL de de Master Mix Promega, 1uL de primer Forward, 1 uL de primer Reverse, 6uL de agua desionizada y 2 uL del ADN extraído en el paso anterior. Además, el ciclo de termociclado comprende una denaturación de 94°C por 5 minutos, luego 32 ciclos de: 94°C por 45 segundos, 60°C por 45 segundos para el anillaje y 72°C por 1 minuto, por último, la elongación final se realizó a 72°C por 10 minutos. Al finalizar la amplificación, se realizó la electroforesis de los amplicones de la PCR en un gel de agarosa al 1.5% y 80V de voltaje por 30 minutos para evaluar la cantidad de producto obtenido. Finalmente, se secuenció por el método de Sanger en el Centro de Secuenciación del Departamento de Ciencias Biológicas para identificar variantes patogénicas como posibles responsables de la porfiria en esta familia, siguiendo las normas del Colegio Americano de Genética Medica. Esto se realizó en todos los individuos simultáneamente con el fin de encontrar una variante en común.

Tabla 1. Información sobre los primers utilizados para la amplificación.

EXONES A AMPLIFICAR	PRIMER	SECUENCIA	TAMAÑO FRAGMENTO
11, 12, 13, 14, 15	Forward	5' GCTTTTAGACACCCCGTGT 3'	1244
	Reverse	5' AGCAACCCAGGCATCTGTC 3'	

### 2.3.3 Análisis de resultados

En el Centro de Secuenciación del Departamento de Ciencias Biológicas se realizó la purificación de las secuencias. El producto final de cada muestra se analizó por el programa BioEdit.

### 3. Resultados

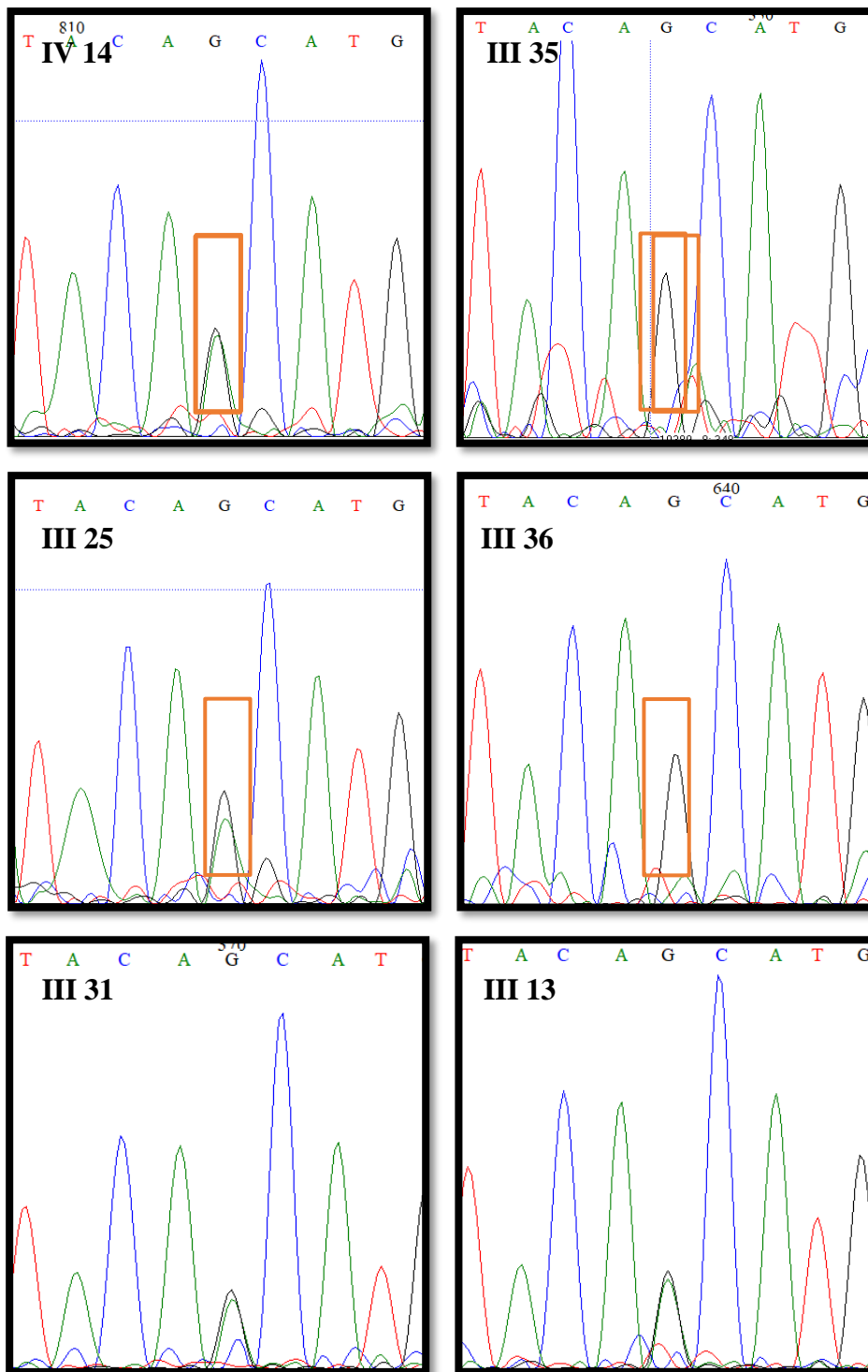


Figura 2. Secuencias de ADN de los individuos 1-6 con su posición en el árbol genealógico de la familia. Rectángulo naranja muestra el nucleótido de interés.

De acuerdo con las secuencias obtenidas, dentro de las secuencias codificantes que corresponden los exones 11 al 15 no se encontraron SNPs comunes entre los pacientes y que presentaran un candidato para la patogenicidad. Mientras que, por otro lado, se establece la

presencia de un SNP antes del nucleótido inicial del exón 15. En este SNP se ve un cambio de guanina a arginina en los pacientes 1 y 3 como puede verse en la figura 2. Se puede inferir que este cambio de nucleótido es importante ya que se encuentra en una región conservada de corte en el splicing. En las secuencias de los pacientes 1 y 3 se ven claramente las dos bandas que indican heterocigosidad en esa zona del genoma, la banda verde corresponde a arginina y la banda negra a guanina, mostrando que los pacientes poseen en un alelo la mutación mientras que el otro presenta el nucleótido correcto. Esto pudo verse comparando la secuencia de los pacientes con una secuencia control mostrada en la figura 3. La secuencia control, al igual que los pacientes 2 y 4 que son sanos, muestran un nucleótido de guanina homocigoto. variación sin importancia clínica.

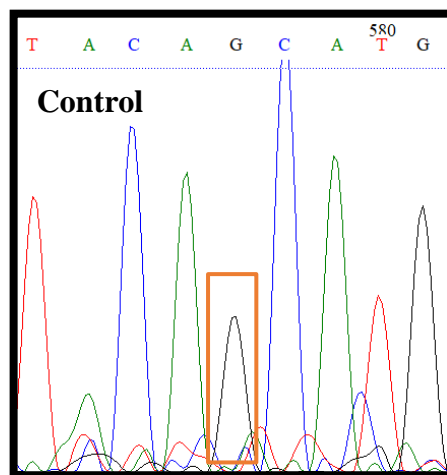


Figura 3. Secuencia de ADN de la muestra control. Rectángulo naranja muestra el nucleótido de interés.

Por otro lado, en el paciente 2 puede verse un cambio de nucleótido en la posición del quinto nucleótido del exón 15. Este cambio provoca una mutación de arginina a guanina, la cual es una mutación con cambio de sentido pues cambia el aminoácido ácido glutámico al aminoácido glicina.

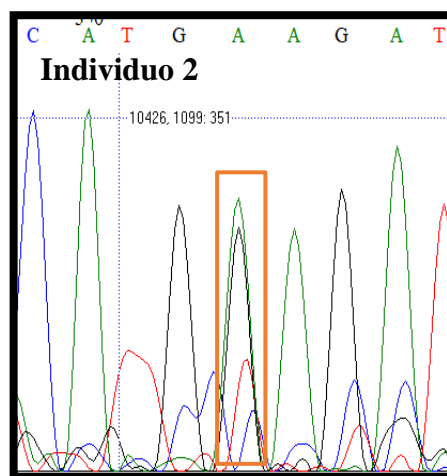


Figura 4. Secuencia de ADN del paciente 2. Rectángulo naranja muestra el nucleótido de interés.

#### 4. Discusión

El splicing es un proceso realizado en organismos eucariotas como uno de los pasos para el procesamiento del ARN mensajero. Su función es la eliminación de los intrones para evitar la producción de RNAm no funcional, evitar una secuencia incorrecta de los aminoácidos y por ende una proteína no funcional (Sadava, et.al., 2003). En los últimos años se ha encontrado que el splicing tiene dos sitios de reconocimiento fundamentales para el proceso y además la secuencia de estos sitios es conservada en la mayoría de los genes eucariotas. El proceso inicia con el reconocimiento en el lado 5' de una secuencia correspondiente a GT o GU desde la perspectiva del ARNm y con un reconocimiento de secuencia AG en el extremo terminal 3' (Foulquier & Protat, 2016). La predicción de los efectos en el splicing por SNPs que afectan los sitios de empalme GT y AG es directa, esperando que la proteína no sea funcional (Ohno, Takeda & Masuda, 2017).

En los últimos años se han estudiado los efectos de una mutación en los sitios de splicing con estimaciones que muestran que de un 15% al 60% son patogénicas (Krawczak, Reiss, & Cooper, 1992). Específicamente en el gen HMBS se han encontrado mutaciones que pueden causar efectos de splicing, cambios de aminoácidos, proteína truncadas, deleciones, inserciones y cambios en el marco de lectura. Además, de las mutaciones puntuales encontradas el 56% está involucrada con un cambio de guanina debido a la alta frecuencia de mutaciones en los sitios consenso de splicing (De Siervi, 1998). Por esto se esperaría que la mutación candidato encontrada en este estudio fuera la causa de la enfermedad en los pacientes 1 y 3 que presentan la mutación en el sitio consenso del splicing. Además, mutaciones en este sitio han sido reportadas, aunque el cambio de nucleótido era de G a C (Chen et al., 2018) y no de G a A, por lo que esta mutación puntual sería un reporte nuevo que corresponde a c.913-1 G>A.

Por otro lado, sobre el SNP encontrado en el paciente 2, se evaluó su patogenicidad a partir de PolyPhen 2.0 y se determinó que no es patogénica, por lo que la función de la proteína no se ve afectada y además este SNP no ha sido reportado en la base de datos de NCBI.

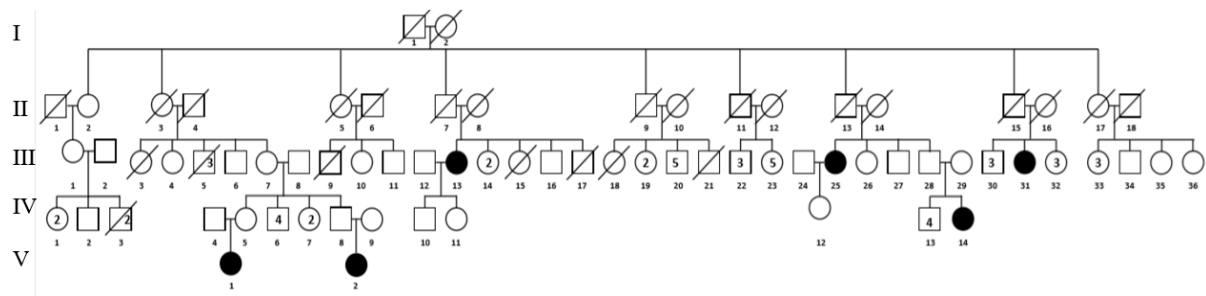


Figura 5. Genealogía de la familia mostrando individuos enfermos.

Por último, el patrón de herencia autosómico dominante no se ve definido en el árbol genealógico de la familia. Esto se puede verificar con la figura 5 donde, a pesar de que la familia es numerosa, no se ve un patrón del 50% de los hijos enfermos que se esperaría con una enfermedad mendeliana autosómica dominante. Esto puede deberse a la penetrancia incompleta presente en la enfermedad, pues se manifiesta apenas en el 10% de los pacientes (Cabrera Arandia, et.al., 2012). Por esto, en los próximos estudios deberían tomarse en cuenta los datos de toda la familia puesto que debe haber miembros con la mutación, pero a los que no se les ha diagnosticado la enfermedad. Así mismo, en la figura 5 se muestran hasta ahora

cinco enfermos de los cuales solo se han identificado dos y además se debería realizar el tamizaje de los hombres de la familia.

## 5. Referencias

Arguello, M., *et al.* (1978). *PORFIRIA INTERMITENTE AGUDA ESTUDIO DE 23 CASOS.*

Retrieved from <http://www.actamedicacolombiana.com/anexo/articulos/041978-04.pdf>

Cabrera Arandia, M., Ortiz Aparicio, F., Espinoza Balderrama, B., & Claire del Granado, R. (2012). Porfiria aguda intermitente la importancia de ampliar la perspectiva del diagnóstico diferencial. Retrieved from [http://www.scielo.org.bo/scielo.php?pid=S1817-74332012000200011&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.bo/scielo.php?pid=S1817-74332012000200011&script=sci_arttext)

Chen, B., Solis-Villa, C., Erwin, A., Balwani, M., Nazrenko, I., & Phillips, J. et al. (2018). Identification and characterization of 40 novel hydroxymethylbilan synthase mutations that cause acute intermittent porphyria. *Journal Of Inherited Metabolic Disease*. doi: 10.1007/s10545-018-0163-6

De Siervi, A. (1998). Genética molecular de la porfiria aguda intermitente: primer estudio en la población argentina. Retrieved from [http://digital.bl.fcen.uba.ar/download/tesis/tesis\\_n3043\\_DeSiervi.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/download/tesis/tesis_n3043_DeSiervi.pdf)

Foulquier, E., & Protat, C. (2016). Splicing sites. Retrieved from [http://www.imgt.org/IMGTeducation/Aide-memoire/\\_UK/splicing/](http://www.imgt.org/IMGTeducation/Aide-memoire/_UK/splicing/)

Grupos AR y C. (2016). *PORFIRIAS.* Retrieved from <https://www.uv.es/derma/CLindex/CLporfirias/porfirias.pdf>

Krawczak, M., Reiss, J., & Cooper, D. (1992). The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: Causes and consequences. *Human Genetics*, 90(1-2). doi:10.1007/bf00210743

Lozano, A., Tovar, O., & Ortiz, C. (2008). *PORFIRIA AGUDA: REPORTE DE CASO Y REVISIÓN DE TEMA.* *Scielo.* Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/med/v16n1/v16n1a14.pdf>

Nariño, D., et al. (2016). APROXIMACIÓN GENÉTICA EN UNA FAMILIA COLOMBIANA CON PORFIRIA INTERMITENTE AGUDA. Manuscrito no publicado. Universidad de los Andes. Bogotá.

NIH (2009). *HMBS gene.* *Genetics Home Reference.* Retrieved 25 October 2017, from <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/HMBS#resources>

Ohno, K., Takeda, J., & Masuda, A. (2017). Rules and tools to predict the splicing effects of exonic and intronic mutations. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 9(1), e1451. doi: 10.1002/wrna.1451



Rago, M., & Batista, I. (2011). *PORFIRIA Presentación de dos casos de Porfiria aguda intermitente en emergencia y revisión del tema*. Retrieved from <http://www.um.edu.uy/docs/Porfiria.pdf>

Sadava, D., Heller, H., Orians, G., Purves, W., & Hillis, D. (2003). *Vida. La ciencia de la biología* (6th ed.). Buenos Aires: Médica Panamerica.