

Nota clínica

Fenotipo variante del síndrome de Lesch-Nyhan

Rosa Torres Jiménez *, Marta García García y Juan García Puig

Unidad Metabólicovascular, Servicio de Bioquímica Clínica y Medicina Interna, IdiPaz, Hospital Universitario la Paz, Madrid, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 23 de marzo de 2010

Aceptado el 6 de mayo de 2010

On-line el 19 de junio de 2010

Palabras clave:

Síndrome de Lesch-Nyhan

Hipoxantina-guanina-

fosforribosiltransferasa

Hiperuricemia

Distonía Lesch-Nyhan

RESUMEN

Fundamento y objetivo: El síndrome de Lesch-Nyhan (SLN) y sus «variantes» se deben a mutaciones del gen *HPRT1*, que ocasionan una deficiencia de la actividad enzimática hipoxantina-guanina-fosforribosiltransferasa (HPRT). El fenotipo variante se ha asociado a mutaciones puntuales y a deficiencia parcial. Presentamos un paciente con fenotipo variante pero con una mutación que afectaba al procesamiento del ácido ribonucleico (ARN). Nos preguntamos si el fenotipo podía deberse a que se procesara normalmente una pequeña cantidad de ARN mensajero (ARNm) con cierta actividad residual HPRT.

Paciente y método: Analizamos la presencia y la cantidad de ARNm normal de la enzima HPRT en este paciente y en 2 enfermos con las características del SLN, y mutaciones que afectaban al procesamiento.

Resultados: Los 3 enfermos tenían una pequeña cantidad de ARNm de HPRT normalmente procesado.

Conclusiones: Este enfermo constituye la primera descripción de un defecto genético importante con expresión fenotípica variante de la deficiencia de HPRT. Nuestros resultados ponen en duda que un ARNm normalmente procesado sea la causa de un fenotipo parcial de la deficiencia de HPRT.

© 2010 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Variant phenotype of Lesch-Nyhan syndrome

ABSTRACT

Keywords:

Lesch-Nyhan syndrome

HPRT

Hyperuricemia

Dystonia

Background and objective: Lesch-Nyhan syndrome (LNS) and LNS variants are due to mutations in the *HPRT1* gene causing HPRT enzymatic activity deficiency. We report a patient presenting a variant phenotype and a major genetic defect. The mutation has been previously reported as always associated with complete Lesch-Nyhan phenotype.

Patient and methods: We analyzed the presence of complete HPRT mRNA in this patient, in two patients with the complete Lesch Nyhan syndrome phenotype, and in control subjects.

Results: We found a minor amount of normal HPRT mRNA in the present patient but also in the two patients with splice mutation and the complete Lesch Nyhan syndrome phenotype.

Conclusions: To our knowledge, this patient is the first report of a major genetic defect, with no detectable enzymatic activity, and a partial HPRT deficiency phenotype. Our results question the hypothesis of a normally spliced HPRT cDNA as the sole cause of the patient partial phenotype.

© 2010 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

El síndrome de Lesch-Nyhan (SLN) es un trastorno congénito del metabolismo de las purinas por la deficiencia completa de la actividad enzimática hipoxantina-guanina-fosforribosiltransferasa (HPRT) (OMIM® 300322)^{1,2}. Se caracteriza por una sobreproducción de ácido úrico y manifestaciones neurológicas singulares que incluyen distonía de acción, coreoatetosis, balismo, disminución de las funciones cognitivas y comportamiento automutilante³. La deficiencia parcial de HPRT (OMIM® 300323) también condiciona

una excesiva síntesis de ácido úrico, pero se asocia a un espectro continuo de manifestaciones neurológicas que, en los casos más leves, pueden pasar inadvertidas⁴⁻⁶. Estos enfermos representan aproximadamente el 30% de todos los pacientes con deficiencia de HPRT⁵ y se han denominado «variantes» del SLN. El SLN y sus variantes se producen por diversas mutaciones del gen que codifica la enzima HPRT y que se localiza en el brazo largo del cromosoma X (Xq26)⁷. Los estudios de asociación genotipo-fenotipo han concluido que el fenotipo se relaciona mejor con la actividad residual que con el tipo de mutación. Las mutaciones que determinan una ausencia total de la actividad enzimática HPRT causan el SLN, mientras que las mutaciones que permiten cierta actividad se asocian a formas clínicas menos graves (variantes del SLN)⁷⁻⁹. Desde 1984, hemos atendido y diagnosticado a 36 pacientes con deficiencia de

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: rtorres.hulp@salud.madrid.org (R. Torres Jiménez).

HPRT^{5,10,11}. De ellos, 11 presentaban un fenotipo clínico variante del SLN. En estos 11 enfermos identificamos una mutación puntual que ocasionaba un cambio de aminoácido y que no alteraba el tamaño de la proteína. En este trabajo presentamos un paciente con fenotipo variante del SLN, en quien identificamos una mutación que truncaba la proteína y determinaba una ausencia total de actividad HPRT.

Pacientes y método

Paciente

Enfermo de 16 años remitido a la Unidad Metabolicovascular (UMV) del Hospital Universitario La Paz (HULP) por hiperuricemia ocasional (9,4 mg/dl) y un cociente úrico/creatinina elevado (1,45 mg/mg; normal menor de 0,6 mg/mg). Nació tras 40 semanas de un embarazo sin complicaciones y un parto normal. Desde el primer mes de vida se mostró muy irritable y en alguna ocasión, durante episodios febriles, la madre notó orinas de color naranja, como polvo de ladrillo. A la edad de un año se lo diagnosticó de parálisis cerebral distónica y se le recomendó fisioterapia, que mejoró su irritabilidad. Se realizó una resonancia magnética que se consideró normal. Desde entonces había realizado tratamiento rehabilitador y, de forma habitual, utilizaba una silla de ruedas para desplazarse. Sin embargo, en ciertas circunstancias, como cuando estaba en la playa, era capaz de levantarse y caminar sin ayuda. Su madre refería que desde siempre tenía la costumbre de beber más de 3 l de líquidos cada día. Nunca había presentado litiasis renal ni inflamación articular. Tampoco presentaba alteraciones del comportamiento. Acudía a un colegio de educación especial con buen rendimiento escolar. Los padres eran universitarios, de un nivel socioeconómico medio-alto. Se lo diagnosticó de forma provisional de deficiencia parcial de HPRT con disfunción neurológica importante, grado 3⁵.

Determinaciones enzimáticas

Se determinaron las actividades enzimáticas HPRT y adenina fosforribosiltransferasa en hemolisado. La actividad HPRT en eritrocito intacto se cuantificó según los métodos descritos previamente⁵.

Estudio genético

A partir del ácido ribonucleico (ARN) aislado de la sangre periférica, tras una reacción de transcripción inversa seguida de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se obtuvo el ADN codificante (ADNc) de HPRT (PCR A), que se secuenció. A partir del ADN aislado de la sangre periférica, se amplificó mediante PCR y se secuenció el exón 5 del gen *HPRT1* (NG_012329.1) con sus secuencias intrónicas flanqueantes¹². Para amplificar el ADNc de HPRT sin exclusión del exón 5 a partir del ADNc total del paciente, se diseñaron cebadores específicos, incluyendo un oligonucleótido que hibridara con el exón 5 de *HPRT1*, que se empleó como cebador *forward*. La expresión del gen *HPRT1* se cuantificó mediante tecnología de PCR en tiempo real con un método de cuantificación relativa utilizando el gen *β-actina* como gen de referencia¹². Además del paciente estudiado (paciente 1), se analizó la expresión del gen *HPRT1* en 2 pacientes (pacientes 2 y 3) con el SLN por una mutación de procesamiento del mensajero. Ambos enfermos presentaban las características completas del SLN. El paciente 2 presentaba una mutación puntual en el intrón 4 (NM_000194.2: c.551 +1 G>A) que ocasionaba la exclusión del exón 4 en el ARN mensajero (ARNm) de HPRT. El paciente 3 presentaba una mutación puntual en el intrón 7 (NM_000194.2: c.700 -2 A>G) que ocasionaba la exclusión del exón 8 en el ARNm de HPRT. Se diseñaron cebadores específicos de los exones 5, 4 y 8,

respectivamente, para amplificar el ARNm de HPRT que incluía dicho exón. La expresión se cuantificó también en 6 sujetos control. En todos los sujetos se aisló el ARN total y se generó el ADNc mediante reacción de transcripción inversa seguida de PCR, como se describe anteriormente. La reacción de la PCR en tiempo real se realizó en un aparato LightCycler[®] (Roche) usando SYBR Green Premix Ex-Taq[®]. Los fragmentos resultantes se purificaron y secuenciaron para comprobar la presencia del exón que se quería amplificar (los exones 5, 4 y 8, respectivamente). Los resultados se expresaron en forma del cociente de cada transcrito/ β -actina. La media de la expresión de los controles se consideró el 100% de expresión.

Resultados

La actividad HPRT en el hemolisado del paciente descrito (paciente 1) fue indetectable. Por el contrario, la actividad adenina fosforribosiltransferasa estaba incrementada (81 nmol/h/mg de hemoglobina; normal de 19-38 nmol/h/mg de hemoglobina). En los eritrocitos intactos tampoco se detectó actividad residual HPRT.

El análisis del ADNc completo (fig. 1; PCR A) del paciente 1 mostró un amplificado de 736 pb, en lugar de los 754 pb habituales, con una secuencia normal excepto por la exclusión del exón 5. Al secuenciar los intrones que flanquean a este exón en el ADN genómico se encontró una mutación puntual en el intrón 4 con un cambio de base A por G que explicaría el error de procesamiento del ARNm y la exclusión del exón 5 (NM_000194.2: c.552 -2 A>G) (fig. 1; genómico). La amplificación selectiva de HPRT codificante con exón 5 dio como resultado un fragmento con el tamaño esperado que, al secuenciarse, se confirmó que incluía el exón 5 del gen *HPRT1* (fig. 1; PCR B).

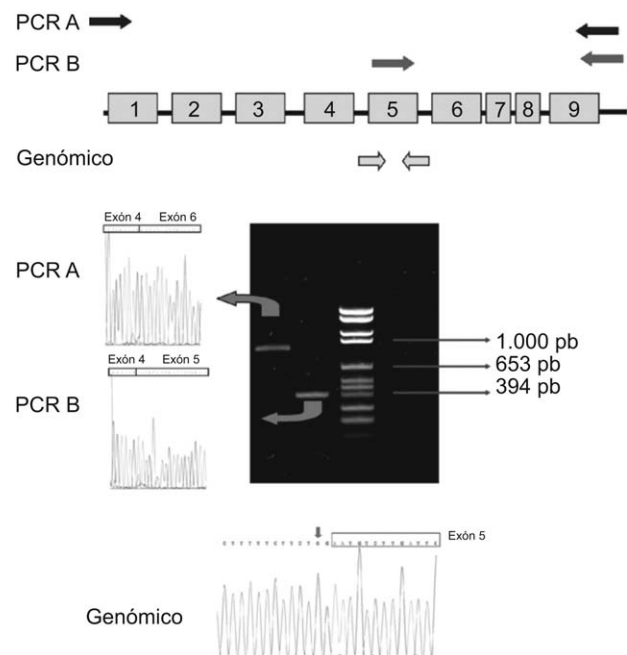


Figura 1. Análisis molecular del paciente descrito: se muestra la localización de los cebadores empleados para la amplificación del ADN codificante completo a partir del ácido ribonucleico del paciente (reacción en cadena de la polimerasa [PCR] A) para la amplificación selectiva de hipoxantina-guanina-fosforribosiltransferasa codificante con exón 5 a partir del ácido ribonucleico del paciente (PCR B), y para la amplificación del exón 5 del gen *HPRT1* con sus secuencias intrónicas flanqueantes a partir del ADN del paciente (genómico). Además, se muestran los resultados de la electroforesis de los fragmentos obtenidos en la PCR A y la PCR B, junto con la electroforesis de los fragmentos obtenidos en ambas PCR (A y B) y en la realizada a partir del genómico.

Tabla 1

Pacientes con deficiencia de hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa y mutaciones que afectan al procesamiento del ácido ribonucleico mensajero y que causan la exclusión del exón 5

Paciente	Mutación	Efecto sobre el ARNm	Fenotipo	Referencia
Paciente 1	ISV4-2A>G	Exclusión del exón 5	Variante del SLN	
Familia 28	ISV4-1G>A	Exclusión del exón 5	SLN	13
Paciente 4	ISV4-2A>C	Exclusión del exón 5	SLN	14

ARNm: ácido ribonucleico mensajero; SLN: síndrome de Lesch Nyhan.

Todos los enfermos descritos en la literatura médica con exclusión del exón 5 tenían un SLN completo. El paciente descrito mostraba un fenotipo variante sin automutilación, y podía incluso caminar sin ayuda.

Mediante PCR en tiempo real se detectó y cuantificó la expresión del transcrito que incluyó el exón 5 en el paciente descrito y en los controles. La secuenciación del fragmento amplificado confirmó la presencia del exón 5. La expresión del fragmento así amplificado, expresada como cociente fragmento con exón 5/ β -actina, en el paciente fue del 0,44% respecto a los sujetos control. En el paciente 2 se detectó un fragmento de ARNm de HPRT que incluía el exón 4. Dicho fragmento se secuenció y confirmamos la presencia del exón. Este enfermo presentaba una expresión de fragmento con exón 4 de un 0,19% en relación con los controles. En el paciente 3 también pudimos amplificar un fragmento de ARNm de HPRT con el exón 8, cuya inclusión se confirmó mediante la secuenciación del producto de la PCR. Su expresión en el paciente fue de un 3,0% con respecto a los controles.

Discusión

El enfermo que describimos presentaba un fenotipo característico de la deficiencia parcial de HPRT (variante del SLN) con un defecto genético importante que, hasta ahora, solo se había descrito asociado al fenotipo característico del SLN^{13–15} (tabla 1). En este paciente, capaz de caminar y sin comportamiento automutilante, no pudimos detectar actividad enzimática residual ni en el hemolisado ni en los eritrocitos intactos. La mutación ocasionaba la exclusión del exón 5. Esta se había descrito con anterioridad en 2 pacientes, pero ambos presentaban el fenotipo característico del SLN completo. Por tanto, el fenotipo del paciente descrito no se correspondía, aparentemente, con su genotipo (tabla 1). Nos planteamos la hipótesis de que el error de procesamiento podía soslayarse en cierto modo por parte de la maquinaria celular, que daba lugar a parte del ARNm con el exón 5 y, por tanto, a una mínima cantidad de proteína normal. En este estudio confirmamos la presencia de una pequeña cantidad de ARNm de HPRT normal. Sin embargo, también detectamos una cantidad similar de este ARNm en los otros 2 pacientes en los que la mutación puntual que ocasionaba un error de procesamiento se acompañó de las manifestaciones completas del SLN.

Este estudio describe por primera vez la presencia de ARNm de HPRT normal en pacientes con SLN por mutaciones que afectan al procesamiento. Además, en los pacientes estudiados no encontramos correlación entre el porcentaje de ARNm normal y su fenotipo. Nuestros resultados, por tanto, ponen en duda la hipótesis de que la existencia de un ADNc para HPRT normalmente procesado sea una circunstancia obligada para presentar un fenotipo parcial de la deficiencia de HPRT. Además, pequeñas cantidades de ARNm de HPRT normal no parecen evitar el fenotipo completo del SLN. Sin embargo, no podemos excluir que el procesamiento del ARNm sea diferente en distintos tejidos y que el paciente descrito presente más cantidad del transcrito normal en otros tejidos, como en el cerebro¹⁶.

El paciente descrito amplía el espectro fenotípico de la deficiencia de HPRT en relación con los defectos genéticos y suscita nuevas áreas de investigación, entre ellas la influencia del entorno cultural y educativo en la expresión fenotípica.

Financiación

Este trabajo se ha financiado con la ayuda del Fondo de Investigaciones Sanitarias 06/0019, el Fondo de Investigaciones Sanitarias 08/0009 y el Centro de Investigaciones Biomédicas en Red para el Estudio de las Enfermedades Raras. Marta García García es beneficiaria de un contrato para la formación de investigadores de la Fundación de Investigación Biomédica del Hospital Universitario La Paz. La Unidad Metabolicovascular y el Grupo MAPA-MADRID participan en la red de investigación Red Temática de Investigación Cooperativa en Enfermedades Cardiovasculares (RECAVA).

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Agradecemos la colaboración de las enfermeras Gemma Santas Camino, Inés Narillos Sánchez, Arantxa Sánchez Martín y Cristina Martín García, y el enfermero Juan Miguel Castro Álvarez en el cuidado de los pacientes atendidos en la UMV del Hospital Universitario La Paz. Dña. Carolina Velasco García coordina las actividades de investigación de la Unidad Metabolicovascular. Agradecemos a Dña. Almudena Ligos Díaz su trabajo administrativo, que ha posibilitado el nuestro.

Bibliografía

- Lesch M, Nyhan WL. A familial disorder of uric acid metabolism and central nervous system function. *Am J Med*. 1964;36:561–70.
- Seegmiller JE, Rosenbloom FM, Kelley WN. Enzyme defect associated with a sex-linked human neurological disorder and excessive purine synthesis. *Science*. 1967;155:1682–4.
- Jinnah HA, Visser JE, Harris JC, Verdu A, Larovere L, Ceballos-Picot I, et al., Lesch-Nyhan Disease International Study Group. Delineation of the motor disorder of Lesch-Nyhan disease. *Brain*. 2006;129:1201–17.
- Kelley WN, Rosenbloom FM, Henderson JF, Seegmiller JE. A specific enzyme defect in gout associated with overproduction of uric acid. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1967;57:1735–9.
- Puig JG, Torres RJ, Mateos FA, Ramos TH, Arcas JM, Buño AS, et al. The spectrum of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) deficiency. Clinical experience based on 22 patients from 18 Spanish families. *Medicine (Balt)*. 2001;80:102–12.
- Jinnah HA, Ceballos-Picot I, Torres RJ, Visser JE, Schretlen DJ, Verdu A, et al., for the Lesch-Nyhan Disease International Study Group. Attenuated variants of Lesch-Nyhan disease. *Brain*. 2010;133:671–89.
- Jinnah HA, De Gregorio L, Harris JC, Nyhan WL, O'Neill JP. The spectrum of inherited mutations causing HPRT deficiency: 75 new cases and a review of 196 previously reported cases. *Mutat Res*. 2000;463:309–26.
- Torres RJ, Mateos FA, Molano J, Gathoff BS, O'Neill JP, Gundel RM, et al. Molecular basis of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase deficiency in thirteen Spanish families. *Hum Mutat*. 2000;15:383.
- Page T, Bakay B, Nissinen E, Nyhan WL. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase variants: Correlation of clinical phenotype with enzyme activity. *J Inher Metab Dis*. 1981;4:203–6.
- Torres Jiménez R, García Puig J. Experiencia en Enfermedades raras: el síndrome de Lesch-Nyhan. *Med Clin (Barc)*. 2004;122:358–9.
- García Puig J, López-Jiménez M, Mateos FA. Déficit de hipoxantina fosforribosiltransferasa. *Med Clin (Barc)*. 1985;85:300–1.
- García MG, Torres RJ, Prior C, Puig JG. Normal HPRT coding region in complete and partial HPRT deficiency. *Mol Genet Metab*. 2008;94:167–72.

13. Jinnah HA, Harris JC, Nyhan WL, O'Neill JP. The spectrum of mutations causing HPRT deficiency: An update. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2004;23:1153–60.
14. Mak BS, Chi CS, Tsai CR, Lee WJ, Lin HY. New mutations of the HPRT gene in Lesch-Nyhan syndrome. *Pediatr Neurol*. 2000;23:332–5.
15. Official website of the Lesch-Nyhan disease Study Group. [consultado 14/06/2010]. Disponible en: www.lesch-nyhan.org.
16. Guiraud-Dogan C, Huguet A, Gomes-Pereira M, Brisson E, Bassez G, Junien C, et al. DM1 CTG expansions affect insulin receptor isoforms expression in various tissues of transgenic mice. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1772:1183–91.