

Determinación de la Condición Heterocigota del Síndrome de Lesch-Nyhan Utilizando un Método Radioquímico

Fernando Rodríguez S.¹, Alvaro Gómez T.¹, Luis A. Barrera A.²

El análisis de las raíces de cabello procedentes de una mujer, madre de dos niños con diagnóstico comprobado de Síndrome de Lesch-Nyhan, mediante el método radioquímico, sirvió para comprobar que éste procedimiento es válido como herramienta para la determinación de portadores de dicha patología. El método radioquímico permitió la visualización de los productos de las reacciones catalizadas por las enzimas Adenina Fosforribosil Transferasa (APRT) e Hipoxantina-Guanina Fosforribosil Transferasa (HGPRT) y la determinación de la actividad biológica de las enzimas en forma total ó parcial. En las raíces de la paciente se encontró que la enzima mostraba diferentes niveles de actividad que variaban desde valores equivalentes a los controles normales hasta aquellos considerados como ausencia absoluta de la misma. En el presente trabajo se demuestra, por primera vez en Colombia, en una paciente asintomática, su condición de heterocigota analizando la expresión fenotípica del gen de la HGPRT. *Salud UIS* 2000; 32(1): 44-47

PALABRAS CLAVE: Síndrome de Lesh-Nyhan, Condición heterocigótica, Deficiencia HGPRT, Método radioquímico.

La deficiencia total de la enzima Hipoxantina-Guanina Fosforribosil Transferasa (HGPRT E.C. 2.4.2.8) está asociada al Síndrome de Lesch-Nyhan (S.L.N.)^{1,2} mientras que una deficiencia parcial de ésta conduce a un aumento de la cantidad de fosforribosil pirofosfato intracelular lo que se traduce en un incremento de la actividad de la enzima Amido Fosforribosil Transferasa (AMPRT), y posteriormente a una síntesis acelerada de purinas que trae como consecuencia final un incremento en la producción de ácido úrico²⁻⁵.

El Síndrome descrito es de herencia recesiva ligada al cromosoma X, por lo tanto, el varón hemicigotó afectado hereda el alelo mutante de la madre que es asintomática⁶⁻⁸.

Las mujeres portadoras no pueden ser detectadas por la sola evaluación clínica sino que se debe recurrir al análisis del DNA o en su defecto a métodos que permitan distinguir

dos poblaciones celulares (HGPRT+ y HGPRT-). Varios estudios, han mostrado que el alelo mutante no está presente con la frecuencia esperada en linfocitos o eritrocitos de las mujeres portadoras, al parecer por una selección celular en la médula ósea que destruye aquellas que no tengan actividad de la HGPRT, por esta razón las células utilizadas para la detección del estado heterocigoto son los fibroblastos y las células de raíz de cabello⁹⁻¹³.

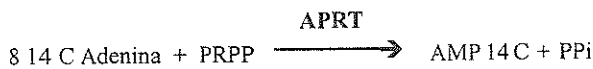
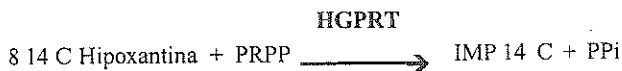
Se ha demostrado que las raíces de cabello tienen crecimiento clonal y en varios estudios realizados en folículos pilosos de mujeres portadoras del S.L.N. se ha confirmado la presencia de tres tipos de comportamiento enzimático: a) raíces con actividad normal de la enzima, b) células que no presentan actividad enzimática y c) un tercer tipo de células que presentan actividad intermedia de la enzima HGPRT.¹⁴⁻¹⁷

El objetivo del presente estudio es mostrar, mediante la utilización del método radioquímico descrito por Page, T. y cols.(16), y modificado por los autores; los diferentes tipos de actividad enzimática de la HGPRT medidos en raíces de cabello provenientes de una mujer asintomática madre de los dos primeros casos comprobados del síndrome de Lesch-Nyhan clásico descritos en Colombia por los autores¹⁸.

REPORTE DE CASO

Se tomaron como control raíces de cabello de personas sanas, de ambos sexos, y de la portadora del síndrome las cuales se procesaron individualmente. Estos folículos se utilizaron para la determinación de las actividades de las enzimas Adenina Fosforribosiltransferasa (APRT) y HGPRT.

Para desarrollar esta investigación se utilizó el método radioquímico descrito por Theodore Page¹⁶ modificado, el cual se basa en las siguientes reacciones:



Cada raíz de cabello se colocó en un tubo al cual se le adicionó 50 uL del amortiguador Hepes para luego lissarlas por choque térmico con nitrógeno líquido. Se agregaron 5uL de una mezcla de Hipoxantina y Adenina marcadas con el isótopo carbono 14 (Hipoxantina 14 C 1.09 mM, 38.3 mCi y Adenina 14 C 0.89 mM, 45mCi), 5uL de PRPP 10 mM, se incubó tres horas a 37°C, posteriormente 20 uL de esta mezcla se depositaron en una cromatoplaça en capa fina de Celulosa. Se sembró un control positivo y uno negativo para cada ensayo. Se colocó la cromatoplaça durante doce horas dentro de una cámara de Cromatografía con una solución volumen a volumen de Metanol - agua. La placa se dejó secar a temperatura ambiente y se procedió a realizar cuatro corridas cromatográficas en amortiguador Formato de Sodio así: treinta segundos en Buffer 50mM pH 4.5, treinta segundos en buffer 0.5 M pH 4.6, dos minutos en buffer 2M pH 4.6 y hasta el final de la placa en buffer 4M pH 4.7. Después la placa se analizó por autorradiografía. El proceso de impresión de la película se realizó a -70°C durante cinco días al final de los cuales, el control positivo mostró las manchas correspondientes al IMP (Rf 0.69) y AMP (Rf 0.53) que son los productos de la actividad de las enzimas HGPRT y APRT respectivamente. Por último, los sitios sobre la cromatoplaça que coincidían con las manchas en la película de rayos X fueron cortados e introducidos en el líquido de centelleo para posteriormente cuantificar la radioactividad en un contador de centelleo Beta. La radiación emitida por las muestras se consideró proporcional a la actividad enzimática. Se cuantificó la radioactividad de las manchas correspondientes al AMP y el IMP y los resultados se expresaron como un cociente AMP/IMP. El coeficiente de variación del método fue de 9.27%.

RESULTADOS

Se procesaron, utilizando el método descrito, 32 raíces de cabello correspondientes al control normal femenino en las cuales se determinó la actividad de las enzimas APRT y HGPRT por medio de la cuantificación de los productos AMP e IMP (Figura 1) obteniéndose un promedio de 1.27 con una desviación estándar de 0.247 para el cociente AMP/IMP.

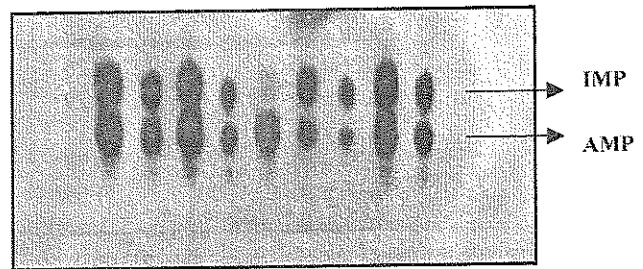


Figura 1

Autorradiografía de las raíces de cabello de un control normal femenino procesadas por el método radioquímico. 1-4 y 6-9 muestras del control. La mancha inferior corresponde al AMP y la mancha superior al IMP. 5 Control negativo.

Así mismo se analizaron raíces de cabello tomadas de siete hombres y ocho mujeres normales obteniéndose para estos un promedio de 1.23 y 1.24 respectivamente para el cociente AMP/IMP. (Figura 2). Al comparar los valores obtenidos para los cocientes AMP/IMP de los controles normales, utilizando una prueba t para muestras independientes no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los sexos masculino y femenino ($t = 0.0497$, $p = 0.961$).

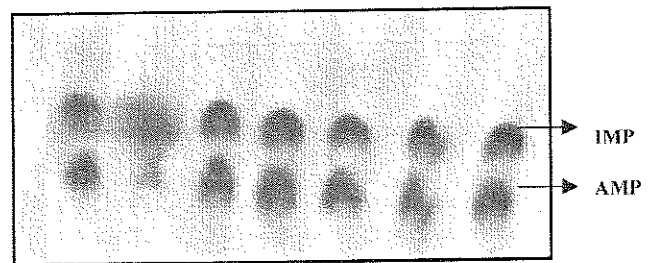


Figura 2

Autorradiografía de las raíces de cabello de controles normales de diferente sexo procesados por el método radioquímico.

Se tomaron de la paciente 8 raíces de cabello que fueron analizadas por el método descrito. Los resultados se pueden ver en la tabla 3.

TABLA 3

Determinación de la actividad enzimática de la APRT y HGPRT por el método radioquímico en raíces de cabello de la paciente en estudio.

Actividad de la enzima APRT (U/L).	Actividad de la enzima HGPRT (U/L).	Cociente AMP/IMP
1.29 x 10 ⁻²	1.47 x 10 ⁻²	0.87
1.82 x 10 ⁻²	1.43 x 10 ⁻²	1.21
4.04 x 10 ⁻³	1.18 x 10 ⁻³	3.42
2.85 X 10 ⁻³	1.26 x 10 ⁻³	2.26
1.35 x 10 ⁻³	1.04 x 10 ⁻³	1.29
1.42 x 10 ⁻²	1.23 x 10 ⁻²	1.15
8.00 x 10 ⁻³	1.74 x 10 ⁻³	4.59
1.35 x 10 ⁻³	8.75 x 10 ⁻⁴	1.54
Rango de referencia:		0.66-1.88

El promedio obtenido para el cociente AMP/IMP fue de 2.04 mientras que el promedio de los controles normales fue de 1.27.

Adicionalmente en la comparación de la actividad enzimática de las muestras de la paciente vs las raíces del control normal, encontramos que los valores obtenidos para la paciente, en términos del cociente AMP/IMP, registraron una diferencia significativa en cuanto los valores de la paciente fueron mayores ($t=3,149$, $p=0,003$).

En la figura 3 se puede observar la autorradiografía que muestra las manchas correspondientes al AMP e IMP de las raíces de cabello de la portadora en la que se puede observar que algunas no presentan la mancha correspondiente al IMP que es el producto de la actividad de la enzima HGPRT.

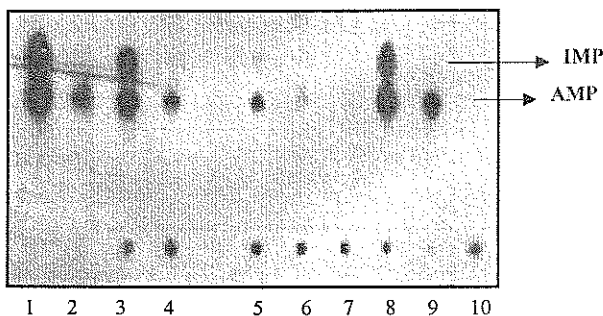


Figura 3

Autorradiografía de las raíces de cabello de la paciente procesadas por el método radioquímico. 1. Control normal: Manchas de AMP (Inferior) e IMP (Superior) 2. Control negativo: Solo presenta la mancha correspondiente al AMP. 3-9. Actividad de las raíces correspondientes a la paciente en estudio. Al comparar los cocientes AMP/IMP para los grupos control negativo, control positivo y la paciente en estudio, utilizando un análisis de varianza, se encontró que la diferencia entre ellos era significativa, siendo mayor para el grupo de control negativo ($F_{2,42} = 73,232$; $p > 0.001$).

DISCUSIÓN

La utilización de la técnica radioquímica descrita por Page y cols.¹⁶, citada anteriormente no pudo ser reproducida en su totalidad pues se plantea que la autorradiografía debe ser leída 24 horas después de su montaje. En nuestro trabajo se encontró actividad posible de cuantificar a los cinco días de realizado el montaje de la prueba, situación que se convierte en una modificación importante a la técnica original para ser aplicada en nuestro medio. De la modificación realizada a la técnica descrita, para lograr reproducir los resultados, se puede plantear la posibilidad de encontrarnos ante una enzima que muestra más baja afinidad por su sustrato, lo que se correlaciona con una actividad catalítica más lenta en la transformación del mismo; situación que nos deja el interrogante de si puede ser una variante genética, en nuestra población, de la misma enzima reportada en los estudios originales. Cuando la muestra de raíz de cabello es de suficiente tamaño que garantice su procesamiento el método tiene una buena precisión para la cuantificación de la actividad de las enzimas APRT y HGPRT como fue demostrado en el presente trabajo al obtener un coeficiente de Variación de 9.27%. Así mismo, de los resultados mostrados anteriormente planteamos que la deficiencia en la actividad enzimática demostrada para la paciente obedezca a un defecto parcial en el trabajo de la enzima, consecuencia de una alteración en el gen correspondiente a la HGPRT en algunas de las raíces estudiadas. No obstante, la detección de escasa radioactividad en la zona correspondiente al IMP, de las raíces deficientes (Figura 3), pudiese ser el resultado de la conversión espontánea de AMP en IMP¹⁹, lo que genera cocientes AMP/IMP con valores cercanos a los observados para los controles positivos.

En resumen una vez estandarizada la modificación realizada a la técnica original se puede concluir que el promedio obtenido del cociente AMP/IMP para los controles normales^{1,27}, es semejante al reportado por otros autores¹⁶, lo que nos garantiza la reproducibilidad de la misma, su sensibilidad así como la posibilidad de poder aplicarla en nuestro medio en los estudios de diagnóstico e investigación a nivel bioquímico de este grupo de patologías asociadas a errores innatos en el metabolismo de los nucleótidos purínicos. A partir de este método y con los resultados obtenidos podemos concluir que se trata de una paciente con una deficiencia parcial en la actividad de la HGPRT, mostrada a partir de una buena actividad en algunas raíces de cabello y de una actividad muy baja en otras (Figura 3), condición que nos lleva a concluir que estamos ante un caso de heterocigocidad para la enzima HGPRT. Este es el primer reporte hecho en Colombia de una heterocigota para el síndrome de Lesch-Nyhan, lo que nos plantea la necesidad de identificar la mutación específica sobre el gen que codifica para la enzima en estudio, con el

fin de analizar toda la familia de esta paciente, identificando los posibles portadores del defecto en mención para

establecer medidas de consejería genética que evite la presentación de nuevos casos.

SUMMARY

A radiochemical method for hair root analysis to detect asymptomatic Lesh-Nyhan syndrome patient was evaluated in one woman, mother of two children with confirmed diagnostic of this syndrome. This method allows the measurement of the enzymatic reaction products using adenine phosphoribosyltransferase (APRT) and hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT) suggesting partial or total activity. In the patient's hair roots were found that these enzymes had different levels of activity and a great variability between normal activity and absolute lack of it. In this work, is presented for first time in Colombia, one asymptomatic patient with a heterocigotic condition for Lesh-Nyhan syndrome using the phenotypic expression of HGPRT gene. *Salud UIS* 2000; 32(1): 44-47

KEY WORDS: Lesh-Nyhan syndrome, Heterocigotic condition, HGPRT deficiency, Radiochemical method.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan un especial agradecimiento al Dr. Carlos A. Conde C., MD. PhD., por su desinteresada colaboración en el manejo y procesamiento de la información.

BIBLIOGRAFÍA

1. Lesch M. and Nyhan, W L . A Familial Disorder of Uric Acid Metabolism and Central Nervous System Function. *Am J Med*; 1964; 36:561-570.
2. Kelley W N.; Rosenbloom F M. Henderson F Seegmüller J E. A Specific Enzyme Defect in Gout Associated with Overproduction of Uric Acid. *Proc Natl Acad Sc USA* 1967; 57:1735-1739.
3. Emmerson B T Wyngaarden J B Purine Metabolism in Heterozygous, Carriers of Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase Deficiency. *Science* 1969; 166:1533-35.
4. Sculley, D.G. A review of the molecular basis of Hypoxanthine guanine Phosphoribosyltransferase (HPRT) Deficiency. *Human Genetics*. 1992; 90:195 -207.
5. Holmes E W. McDonald J A. McCord J M. Wyngaarden, James B. Kelley W N. Human Glutamine Phosphoribosylpyrophosphate Amidotransferase: Kinetic and Regulatory Properties. *J Biol Chem* 1973; 248: 144-150.
6. Drayna D White, R. The Genetic Linkage Map of the Human X Chromosome. *Science* 1985; 230: 753-58.
7. Nicklas J A. Hunter T C. O'Neill J. P Albertini R J. Fine Structure Mapping of the Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT) Gene Region of the Human X Chromosome (Xq26). *Am J Hum Genet* 1991; 49: 267-278.
8. Page, Th Nyhan W L. Morena de Vega, V Syndrome of Mild Mental Retardation, spastic; Gait, and Skeletal Malformations in a Family With Partial Deficiency of Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase. *Pediatrics* 1987; 79, 5:713-17.
9. Hakoda M. Selection Against Blood Cells Deficient in Hypoxanthinephosphoribosyltransferase (HPRT) in Lesch-Nyhan Heterozygote Occurs at the Level of the Multipotent Stem Cells. *Human Genetics* 1995; Dec 96: 674-80.
10. Alford, R.L. et al. Lesch-Nyhan Syndrome: Carrier and Prenatal Diagnostic. *Prenat-Diagn* 1995; Apr: 15: 329-38.
11. Arnold W J. Meade J C. Kelley W N. Hypoxanthine-guanine Phosphoribosyltransferase: Characteristics of the Mutant Enzyme in Erythrocytes from Patients with The Lesch-Nyhan Syndrome. *J Clin Invest* 1972; 51: 1805-12.
12. Emmerson B T. Thompson C J. Wallace D C. Partial Deficiency of the Hypoxanthine-guanine Phosphoribosyltransferase: Intermediate Enzyme Deficiency in Heterozygote Red Cells. *Ann. Intern. Med* 1972; 76: 285-87.
13. Bakay B. Tucker-Pian Ch Seegmiller J E. Detection of Lesch-Nyhan Syndrome Carriers: Analysis of Hair roots for HGPRT by Agarose Gel Electrophoresis and Autoradiography. *Clin Genet* 1980; 17: 369-74.
14. Silvers David N Cox R P. Balis M Dancis, J. Detection of the Heterozygote in Lesch-Nyhan Disease by Hair Root Analysis. *N Engl J Med* 1972; 286: 390-93.
15. Stout J T Caskey C T Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase Deficiency: The Lesch-Nyhan Syndrome and Gouty Arthritis En: Scriver C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. Sixth Edition 1989: 1007-1028.
16. Page Th Bakay B Nyhan W L. An Improved Procedure for Detection of Hypoxanthine.guanine Phosphoribosyltransferase Heterozygotes. *Clin Chem* 1982; 28, 5: 1181-84.
17. Gartler S M. Scott R D. Goldstein J L Campbell B Lesch-Nyhan Syndrome: Rapid Detection of Heterozygotes by Use of Hair Follicles. *Science* 1971; 172: 572-73.
18. Barrera A Rodríguez F Gómez A Aspectos clínicos y Bioquímicos del Síndrome de Lesch-Nyhan. *Acta Médica Colombiana* 1992; 17:447- 453.
19. Mathews C. Van Holde K E *Bioquímica*. 2a. ed. Mac GrawHill Interamericana Madrid 1998