

Estudio bioquímico, enzimático y genético de la deficiencia de hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa (HPRT)

R. Torres Jiménez *, F. Mateos Antón *, T. Ramos Hernández *, J. Arcas Martínez **, A. Buño Soto *, J. García Puig**

Resumen. *Objetivos:* Este trabajo recoge el diagnóstico de la deficiencia de HPRT, estudio del metabolismo de las purinas, detección de portadoras y diagnóstico prenatal en 16 familias españolas.

Métodos: Determinación de las concentraciones de ácido úrico, creatinina y oxipurinas en sangre y orina, las actividades APRT y HPRT en hemolisado y HPRT en eritrocito intacto y la excreción de adenina 8-C¹⁴. Diagnóstico de portadoras mediante el análisis de la actividad HPRT en folículo piloso y de la presencia de un alelo mutante en el ADN extraído de sangre periférica.

Resultados: Los análisis realizados permitieron el diagnóstico y la clasificación de 20 pacientes. Se realizó el diagnóstico del riesgo de ser portadora del defecto en 23 mujeres y un feto femenino de 9 semanas.

Conclusiones: Los resultados de este estudio indican que la deficiencia de HPRT promueve un aumento de la degradación de nucleótidos purínicos que conduce a un incremento de la concentración plasmática y urinaria de hipoxantina, xantina y ácido úrico cuya magnitud no está relacionada con la gravedad clínica. El estudio de las actividades enzimáticas HPRT y APRT en folículo piloso permite establecer el estado de portadora en la mayoría de los casos, pero no es posible determinar el estado de no portadora con absoluta seguridad. Cuando se conoce la mutación que origina el defecto de HPRT, el análisis de los cambios originados por la mutación (con o sin mutagénesis dirigida) en el patrón de restricción del gen de la HPRT, posibilita un diagnóstico rápido y fiable del estado de portadora y de la deficiencia de HPRT.

An Esp pediatr 1998;48:355-362.

Palabras clave: HPRT; Acido úrico; Diagnostico prenatal

BIOCHEMICAL, ENZYMATIC AND GENETIC STUDY OF HYPOXANTHINE-GUANINE PHOSPHORIBOSYL TRANSFERASE DEFICIENCY (HPRT)

Abstract. *Objective:* The objective of this study was to analyze the diagnosis of HPRT deficiency, perform a thorough purine metabolism study and to establish the carrier and prenatal diagnosis in 16 HPRT deficient families.

Patients and methods: Plasma and urinary concentrations of uric acid, creatinine and oxypurines, APRT and HPRT activities in hemolysates and HPRT in intact erythrocytes and adenine 8-C¹⁴ urinary excretion were analyzed. Carrier diagnosis was made by hair root enzyme analysis and genetic studies.

*Servicio de Bioquímica Clínica. **Servicio de Medicina Interna. Hospital "La Paz". Facultad de Medicina. Universidad Autónoma. Madrid. España.

Correspondencia: Dra. F. Mateos Antón. C/ Clara del Rey 4, 2º A y B. 28002 Madrid.

Recibido: Junio 1997

Aceptado: Octubre 1997

Results: These studies allowed the diagnosis of HPRT deficiency in 20 patients. Carrier diagnosis could be performed in 23 women at risk and in a 9 week old female fetus.

Conclusions: The study results suggest that HPRT deficiency accounts for increased purine nucleotide degradation. This increase results in elevated urinary and plasma concentrations of hypoxanthine, xanthine and uric acid. The clinical severity of the disease is not related to the degree of urinary or plasma concentrations of oxypurines. Hair root analysis generally allows the diagnosis of carrier status, but the carrier state cannot be fully excluded in women at risk. When the familial mutation causing the defect in HPRT is known, analysis of the differences in the restriction pattern of the HPRT gene (natural or due to directed mutagenesis) allow a rapid and reliable diagnosis of carrier status and HPRT deficiency.

Key words: HPRT. Uric acid. Prenatal diagnosis.

Introducción

La enzima hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa (HPRT, EC 2.4.2.8.) convierte a las bases púricas hipoxantina y guanina en sus correspondientes nucleótidos (IMP y GMP, respectivamente) con el concurso del fosforribosilpirofosfato (PRPP) que actúa como cosustrato⁽¹⁾. La deficiencia de HPRT origina un descenso en la reutilización de bases púricas y un aumento en la síntesis de purinas de novo promoviendo un incremento de la síntesis de ácido úrico⁽²⁻⁴⁾. La deficiencia de HPRT también determina una elevación de la concentración de hipoxantina y xantina en los fluidos biológicos contribuyendo al aumento de la síntesis de ácido úrico. Clínicamente, el síndrome de Lech-Nyhan se caracteriza por retraso mental, coreatetosis, espasticidad, automutilación e hiperuricemia asociada o no a gota y litiasis renal^(5,6). Sin embargo, todas estas características clínicas no siempre están presentes, pudiendo aparecer un cuadro parcial, o síndrome de Kelley-Seegmiller, en el que la hiperuricemia se acompaña o no de alteraciones neurológicas menos dramáticas⁽⁷⁾. Aunque se ha descrito una relación inversa entre la gravedad de los síntomas neurológicos y la actividad residual de HPRT en cultivos de fibroblastos⁽⁸⁾, la actividad HPRT determinada en hemolisado no siempre se correlaciona con la gravedad del cuadro clínico. Tampoco la sobreproducción de ácido úrico parece relacionarse con la magnitud del defecto enzimático⁽²⁾.

La deficiencia de HPRT es la consecuencia de una mutación en el gen que codifica la enzima HPRT. El gen de la HPRT está localizado en el locus q26-q27 del cromosoma X⁽⁹⁾. Dada la falta de recursos terapéuticos útiles para combatir la sintomatología

logía neurológica, la detección de portadoras adquiere en este defecto genético una importancia extraordinaria. Las mujeres afectadas son heterocigotas asintomáticas y, de acuerdo con la hipótesis de Lyon⁽¹⁰⁾, muestran mosaicismo en sus células somáticas (células HPRT⁻ y células HPRT⁺)⁽¹¹⁾. Sin embargo, este mosaicismo no está presente en todas las células estudiadas y, así, no suele ser posible diagnosticar el estado de portadora si el estudio se realiza en eritrocitos o linfoblastos⁽¹⁾ y es necesario utilizar fibroblastos o folículos pilosos⁽¹²⁻¹⁵⁾. Cuando es posible, el estudio de portadoras de la deficiencia de HPRT se puede llevar a cabo mediante análisis de ADN, que aporta resultados más fiables^(16,17).

Teóricamente, el 50% de los hijos varones de una mujer portadora podrían padecer el defecto enzimático por lo que el diagnóstico prenatal deberá proporcionarse a las mujeres portadoras embarazadas que deseen conocer si el feto es un varón afecto de la deficiencia de HPRT. El diagnóstico prenatal se puede realizar cuantificando la actividad HPRT en vellosidad corial, amniocito o eritrocitos obtenidos por funiculocentesis, mediante análisis de ADN extraído de cultivos de amniocitos o vellosidad corial^(16,18,19) o mediante la cuantificación de oxipurinas en líquido amniótico⁽²⁰⁾.

Este trabajo recoge el diagnóstico de la deficiencia de HPRT, estudio del metabolismo purínico, detección de portadoras y diagnóstico prenatal en 20 pacientes pertenecientes a 16 familias españolas estudiadas por nosotros en los últimos 13 años.

Sujetos y métodos

Sujetos

El estudio incluye a 20 enfermos de 16 familias Españolas que tenían al menos un varón afectado por la deficiencia enzimática HPRT. Todos los pacientes fueron estudiados en el Hospital "La Paz" en un período de 11 años (1984-1997) (Figura 1).

Todos los pacientes fueron enviados al Hospital "La Paz" por presentar hiperuricemia y/o hiperuricosuria, y en la mayoría de los casos, por presentar un retraso psicomotor de intensidad variable (Figura 1) (Familia V: III-7 y IV-4 y 5. Familia H: IV-1. Familia LP: II-4. Familia R: II-1. Familia PP: II-2. Familia C: III-2 y IV-1. Familia B: II-2. Familia A: II-2. Familia M: II-1. Familia AnD: II-2. Familia S: III-6. Familia F: II-2. Familia G: III-2. Familia Z: III-1. Familia SA: III-2 y III-3. Familia Z₂: III-1).

En las 16 familias había 59 mujeres vivas en el momento en que acudieron al Hospital "La Paz" como se muestra en la figura 1. Diez eran portadoras obligadas o conocidas y 49 tenían el riesgo de serlo. Nosotros tuvimos la oportunidad de estudiar a 23 de estas mujeres con riesgo de ser portadoras. Se realizó el diagnóstico prenatal en un feto femenino de 9 semanas de gestación (Familia V: IV-3) cuya madre era portadora del defecto enzimático (Familia V: III-5).

Diagnóstico del déficit de HPRT. Estudio del metabolismo de las purinas

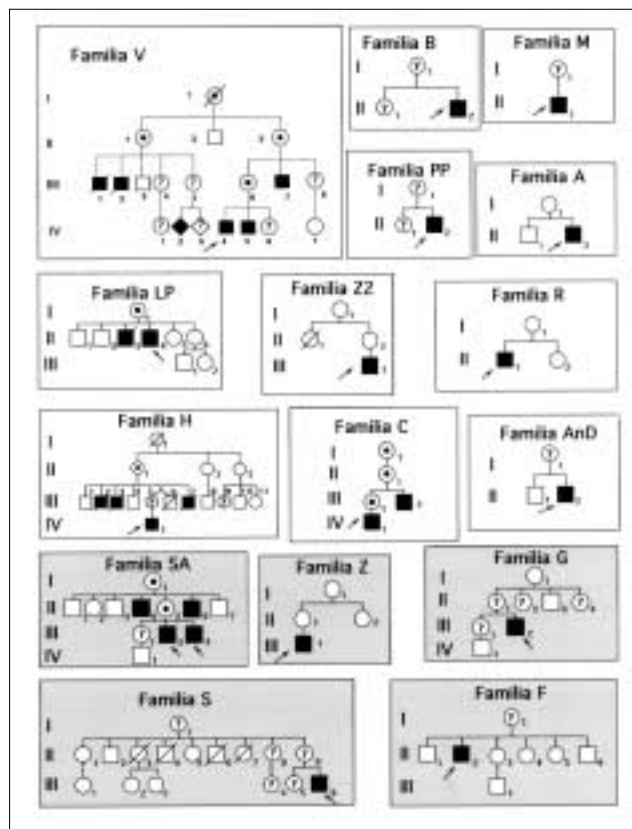


Figura 1. Árboles de las 16 familias españolas con deficiencia de hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HPRT).

Los árboles familiares no sombreados indican familias con uno o más miembros afectados por el síndrome de Lesh-Nyhan ("deficiencia completa de HPRT"). Los árboles familiares sombreados indican familias con uno o más miembros afectados por el síndrome de Kelley-Seegmiller ("deficiencia parcial de HPRT"). Los cuadrados negros indican los miembros afectados en cada familia (diagnóstico enzimático). En las 16 familias existían 59 mujeres vivas de las cuales 10 eran portadoras conocidas u obligadas (círculo negro en el interior de otro círculo blanco) por haber tenido 2 o más hijos afectados o ser madre y abuela de al menos un paciente (por ejemplo Familia V: II-3) y 49 mujeres podían ser portadoras del defecto enzimático (círculos blancos). El diagnóstico del estado de portadora de la deficiencia de HPRT se realizó en 23 mujeres (interrogación en el interior de un círculo blanco). Los cuadrado blancos indican varones sanos. Los rombos indican abortos. Las flechas indican los propósitos motivo del estudio. Las líneas diagonales indican sujetos fallecidos.

El diagnóstico de la deficiencia de HPRT se sospechó en los enfermos que presentaban hiperuricemia e hiperuricosuria, tras seguir durante al menos 5 días una dieta pobre en purinas (menos de 75 g/d). La hiperuricemia se definió por una concentración sérica de uratos mayor de 7,0 mg/dl (417 μmol/L) en adultos y superior a 6,0 mg/dl (387 μmol/L) en niños. La presencia de hiperuricosuria se estableció cuando la excreción renal de ácido úrico fue mayor de 700 mg/d/1,73 m², o bien cuando el cociente ácido úrico/creatinina en orina fue superior al límite alto de la normalidad para su edad⁽²¹⁾. En los 20 pacientes se obtuvieron hemáties de sangre periférica para cuantificar las activi-

Tabla I Mutaciones de la HPRT en 6 familias españolas

Familia	Fenotipo	Denominación	Modificación del DNA	Alteración en la proteína	Tamaño de la proteína
S.	S. KS ^a	HPRTMadrid	Exon 3 G16680 por T	Gly71 por Val	Normal
PP.	S. LN ^b	HPRTSevilla	Intrón G (splice-site) A40031 por G	Error de procesamiento del mRNA	182 aa
B.	S. LN	HPRTMurcia	Exón 4 AG 27907-08 del.	Tras Ser 109, cambio de secuencia. Tras Arg119 codón de parada	119 aa
V	S. LN	HPRTRJK974	Exon 7 C39837 por T	Arg 170 por TGA (codón de parada)	169 aa
AND.	S. LN	HPRTAndorra	Exón 4 (delección)		196 aa
SA.	S. KS	HPRTSalamanca	Exón 2 T14881 por G G14883 por A	Met 43 por Arg Asp 44 por Asn	Normal

^aSíndrome de Kelley-Seegmiller (deficiencia parcial de HPRT)
^bSíndrome de Lesh-Nyhan (deficiencia completa de HPRT)

dades enzimáticas HPRT y adenina fosforribosiltransferasa (APRT).

En todos los pacientes se realizó un examen riguroso del metabolismo de las purinas. Cinco lactantes fueron estudiados de forma ambulatoria y siguiendo su alimentación habitual. Tres pacientes (Familia C: IV-1 y Familia SA: III-2 y III-3) acudieron a nosotros en tratamiento con alopurinol. Siete pacientes fueron estudiados en un ambiente de Unidad Metabólica tras obtener su consentimiento y una vez que se explicaron los procedimientos a realizar. En el caso de los enfermos con evidente retraso mental o menores de edad, el consentimiento se obtuvo de sus padres. Cualquier medicación que pudiese interferir con el metabolismo del ácido úrico se suspendió 2 a 4 semanas antes de comenzar el estudio del metabolismo de las purinas. Los enfermos con gota recibieron colchicina (0,5 a 1,0 mg/d) para prevenir episodios de artritis gotosa. Cada estudio duró 10 días y se efectuó en régimen de hospitalización para asegurar el cumplimiento dietético (dieta isocalórica, pobre en purinas [<75 mg/d] con un contenido proteico del 10-15%), la recogida de orina de 24 horas, cuando fue factible, y el menor ejercicio posible antes de proceder a las extracciones sanguíneas. Dos pacientes fueron estudiados en sus domicilios. Para ello, miembros del equipo investigador se trasladaron a sus lugares de residencia. Tras 5 días de equilibrio, cada sujeto recogió orina de 24 horas preservada con timol (3 g) durante los 5 días restantes. En los pacientes que no pudieron recoger orina de 24 horas se obtuvieron muestras aleatorias de orina durante 5 días. Las alícuotas se guardaron a -20°C hasta su procesamiento para determinar creatinina, ácido úrico, hipoxantina y xantina. En al menos tres días diferentes se obtuvieron sendas muestras de sangre venosa, tras 8 horas de reposo nocturno y ayuno, para cuantifi-

car las concentraciones de creatinina, uratos, hipoxantina y xantina. En todos los casos la extracción de sangre y el procesamiento del plasma se efectuaron siguiendo el procedimiento previamente descrito⁽²²⁾. El catabolismo de los nucleótidos de adenina se examinó en 6 enfermos mediante la infusión de $25\ \mu\text{Ci}$ de adenina $[8\text{-C}^{14}]$ y cuantificación de la excreción de radiactividad urinaria durante los 5 días siguientes⁽²³⁾. Los resultados de las actividades enzimáticas HPRT y APRT y del metabolismo de las purinas se compararon con los obtenidos en 20 sujetos varones normales con una edad media de 60 años (intervalo, 39 a 79 años).

Las actividades enzimáticas eritrocitarias HPRT y APRT se determinaron en hemolisado, evaluando la síntesis de los nucleótidos correspondientes mediante separación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y detección ultravioleta (Waters. Mod:441)^(24,25). Además, se determinó la actividad HPRT en eritrocito intacto calculando el porcentaje de hipoxantina C^{14} que se transforma en IMP C^{14} , en condiciones de enriquecimiento de PRPP. Brevemente, los eritrocitos se incubaron 40 minutos a 37°C en HEPES 10 mM, ClNa 125 mM, ClK 2,6 mM, Glucosa 5,5 mM, Cl_2Ca 1mM, Cl_2Mg 50 mM, NaH_2PO_4 18 mM, hipoxantina C^{14} 10 μM . Una vez finalizada la incubación se separaron el IMP y la hipoxantina marcados mediante HPLC, se cuantificó la radiactividad de cada pico cromatográfico y se calculó el porcentaje. Las concentraciones de ácido úrico en plasma y orina se determinaron por un procedimiento enzimático y la creatinina por colorimetría en un autoanalizador (Hitachi, Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, EE.UU.). Las concentraciones de hipoxantina y xantina en plasma y orina se cuantificaron mediante HPLC⁽²⁶⁾.

La significación de las diferencias entre el metabolismo de

Tabla II Características clínicas y enzimáticas en los 20 pacientes estudiados con deficiencia de hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa

Paciente	Edad (años,m)	Características clínicas	HPRT*	APRT*	% transf. C ¹⁴ IMP&
Fenotipo Síndrome de Lesh-Nyhan					
1) V: III-7	31	Coreoatetosis, espasticidad, automutilación, retraso mental, tofos.	< 0,01	80	ND
2) V: IV-4	6	Coreoatetosis, espasticidad, automutilación, retraso mental.	< 0,01	45	0,1
3) V: IV-5	5	Coreoatetosis, espasticidad, automutilación, retraso mental.	< 0,01	54	0,1
4) LP:II-4	28	Coreoatetosis, espasticidad, automutilación, retraso mental, tofos	0,14	80	ND
5) B:II-2	4	Coreoatetosis, espasticidad, automutilación, retraso mental.	< 0,01	45	0,5
6) A: II-2	3	Coreoatetosis, espasticidad, automutilación, retraso mental.	< 0,01	ND	ND
7) M: II-1	6	Coreoatetosis, espasticidad, automutilación, retraso mental.	< 0,01	86	ND
8) R: II-1	19	Coreoatetosis, espasticidad, automutilación, retraso mental.	< 0,01	ND	ND
9) PP: II-2	19m	Retraso psicomotor, cristalurina	< 0,01	68	0,5
10) AND: II-2	11m	Hipertonía, retraso psicomotor	< 0,01	52	0,2
11) H: IV-1	5m	Hipertonía, retraso psicomotor	< 0,01	60	0,15
12) C: IV-1	18m	Hipertonía, retraso psicomotor	< 0,01	40	0,5
13) C: III-2	27	Coreoatetosis, espasticidad, automutilación, retraso mental.	< 0,01	61,3	0,1
14) Z2: III-1	3	Coreoatetosis, espasticidad, retraso mental.	< 0,01	60	0,6
Fenotipo Síndrome de Kelley-Seegmiller					
15) G: II-2	13	Fracaso renal agudo, distonía	0,28	48	9,2
16) S: III-6	7m	Retraso psicomotor, cristalurina	< 0,01	58	0,2
17) F:II-2	30	Artritis gotosa	< 0,01	90	ND
18) Z: II-1	5m	Hiperuricemia, cristalurina	9,38	45	54,1
19) SA: III-2	35	Retraso mental, hiperuricemia	< 0,01	41	1,4
20) SA: III-3	33	Retraso mental, hiperuricemia	< 0,01	47	1,3

* Expresado en nmol/h/mg Hb. Valores normales HPRT = 82,1 ± 6,4 ; APRT = 25,7 ± 5,1.
& Valores normales = 98-100%

las purinas de los pacientes con deficiencia de HPRT y sujetos normales se evaluó mediante el test de Mann-Whitney. Para determinar la asociación entre variables seleccionadas se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson. Todas las pruebas estadísticas fueron de dos colas y se consideró significativo un valor de p igual o menor a 0,05. El estudio estadístico se realizó empleando el programa Statview SE en un ordenador Macintosh II.

Diagnóstico de portadoras mediante el análisis de los folículos pilosos

Se realizó en 23 mujeres con riesgo de ser portadoras mediante el análisis de las actividades enzimáticas HPRT y APRT en folículos pilosos. Se extrajeron 35 folículos pilosos viables de forma aleatoria en distintas zonas del cuero cabelludo de cada mujer. El

estudio de las actividades enzimáticas HPRT y APRT en folículos pilosos se realizó con una técnica enzimo-isotópica y lectura de los nucleótidos generados mediante autorradiografía⁽²⁷⁾.

Estudios genéticos

En seis familias se realizaron estudios de genética molecular para conocer la mutación responsable del defecto enzimático. En cinco de estas familias (Familias: S, PP, B, V y And) el estudio se realizó en colaboración con otros grupos de trabajo europeos^(28,29). En la familia SA el diagnóstico genético había sido realizado con anterioridad⁽³⁰⁾. (Tabla I).

El diagnóstico genético de la posible deficiencia de HPRT se realizó en un recién nacido de la familia SA (IV-1). El diagnóstico de portadoras mediante el análisis del ADN genómico se realizó en tres familias. En la Familia V estudiamos a siete

Tabla III Metabolismo de las purinas en pacientes con deficiencia de hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HPRT)

	Controles (n=20)	Fenotipo Lesh-Nyhan (n=13)	Fenotipo Kelley-Seegmiller (n=4)
Plasma			
Creatinina (mg/dl)	1,0±0,2	0,81±0,32 (n = 13)	0,76±0,33 (n = 4)
Uratos (mg/dl)	5,1±1,0	10,9±4,9 (n = 13)	9,3±1,5 (n = 4)
Hipoxantina (µmol/L)	2,2±1,1	6,9±3,4 (n = 10)	7,0±2,9 (n = 4)
Xantina (µmol/L)	0,7±0,2	2,6±1,7 (n = 10)	2,3±0,6 (n = 4)
Orina			
Acido úrico/creatinina (mg/mg)	0,30±0,05	3,09±1,26 (n = 12)	2,45±1,21 (n = 4)
Hipoxantina (µmol/ g creat.)	47±14	649±381 (n = 12)	558±321 (n = 4)
Xantina (µmol/g creat.)	29±9	278±177 (n = 12)	136±50 (n = 4)

*Todos los parámetros son significativamente superiores en los pacientes con deficiencia de HPRT que en los sujetos controles (U de Mann-Whitney; $p < 0,001$), a excepción de la concentración de creatinina en sangre. No hay diferencias significativas entre los pacientes con fenotipo Lesh-Nyhan versus Kelley-Seegmiller.

mujeres (II-1; III-4, 5 y 6; IV-1 y IV-6) y un feto femenino de 9 semanas de gestación (IV-3). En la Familia PP se estudiaron dos mujeres (I-2 y II-1). En la familia SA estudiamos a dos mujeres (II-5 y III-1). En todos los casos sirvieron como controles los propósitos (controles con el defecto genético) y un varón sano de la misma familia (control sano).

El ADN genómico se obtuvo a partir de sangre venosa periférica o vellosidad corial (Familia V: IV-3). En el recién nacido el ADN se obtuvo de sangre de cordón umbilical (Familia SA: IV-1). En la familia V se procedió directamente a la amplificación mediante PCR del fragmento del ADN genómico en el que se encontraba la mutación. En las familias PP y SA se procedió igualmente a la amplificación por la PCR del fragmento del ADN genómico que contenía la mutación, pero introduciendo un cambio de base mediante *mutagénesis dirigida* para posibilitar el diagnóstico. Seguidamente se procedió a la digestión de los fragmentos amplificados por la enzima de restricción correspondiente mediante los protocolos establecidos. Por último se identificaron los fragmentos de ADN resultantes mediante electroforesis⁽³¹⁾.

Resultados

Diagnóstico de la deficiencia enzimática HPRT.

Metabolismo de las purinas

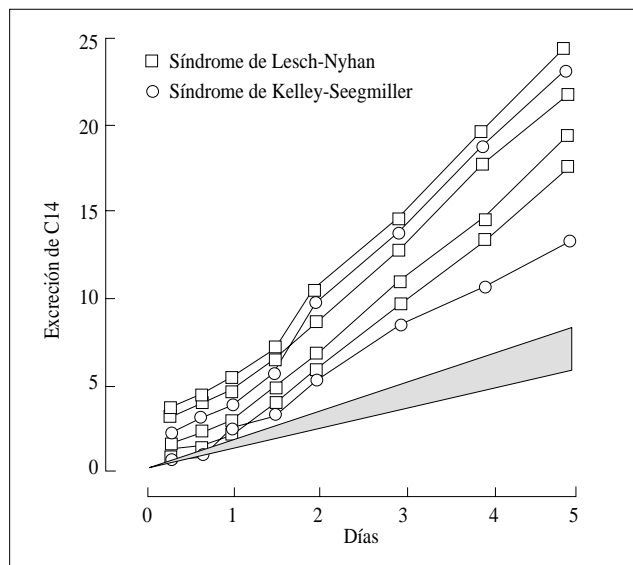


Figura 2. Excreción de radiactividad urinaria en 5 días en sujetos normales (área sombreada) y 6 pacientes con deficiencia de hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa.

La tabla II recoge las características clínicas y actividades enzimáticas, HPRT y APRT en hemolisado y HPRT en eritrocito intacto, en los 20 pacientes estudiados en el Hospital "La Paz". Catorce presentaban el cuadro clínico característico del síndrome de Lesh-Nyhan. Seis pacientes no presentaban las características clínicas inequívocas del síndrome de Lesh-Nyhan y fueron diagnosticados, desde una perspectiva clínica, de síndrome de Kelley-Seegmiller. En todos los pacientes la actividad HPRT en hemolisado se halló muy descendida y en 18 enfermos la actividad APRT se halló muy elevada. Estos datos enzimáticos permiten establecer el diagnóstico de la deficiencia de HPRT de forma inequívoca. Todos los pacientes con síndrome de Lesh-Nyhan presentaron actividad HPRT en eritrocito intacto $< 1,0\%$. En los pacientes con síndrome de Kelley-Seegmiller la actividad en eritrocito intacto estaba relacionada con la gravedad de los síntomas neurológicos.

La tabla III recoge los resultados del estudio del metabolismo purínico en 17 pacientes sin tratamiento hipouricemiante. Todos los enfermos con deficiencia de HPRT presentaron unas concentraciones plasmáticas de uratos, hipoxantina y xantina muy elevadas. De forma similar, la excreción renal de ácido úrico, hipoxantina y xantina se hallaron muy incrementadas. Así, la eliminación de ácido úrico fue en todos los casos superior a la de creatinina (cociente úrico/creatinina mayor de 1,0). Los parámetros del metabolismo de las purinas fueron similares en los enfermos con síndrome de Lesch-Nyhan y en los pacientes con síndrome de Kelley-Seegmiller. Estos datos sugieren una extraordinaria sobreproducción de purinas en todos los enfermos con deficiencia de HPRT. La excreción renal de ácido úrico y de hipoxantina se hallaron inversamente relacionadas con la edad de los pacientes ($r=0,569$ y $r=0,610$, respectivamente; $p < 0,01$).

Para examinar si este aumento de la producción de purinas se debía a un incremento de la degradación de nucleótidos de adenina, se determinó la excreción de radiactividad urinaria tras la administración de adenina [$8\text{-}^{14}\text{C}$] en 6 enfermos (4 con síndrome de Lesch-Nyhan y 2 con síndrome de Kelley-Seegmiller). Los 6 enfermos evidenciaron un marcado incremento de la excreción de radiactividad urinaria ($18,9\pm 4,6\%$ de la dosis de radiactividad administrada) en comparación con la eliminación de 10 sujetos normales ($5,0\pm 1,3\%$) (Fig. 2).

Diagnóstico de portadoras mediante el análisis de folículos pilosos

De las 23 mujeres con riesgo de ser portadoras del defecto enzimático en las que estudiamos las actividades enzimáticas HPRT y APRT en folículos pilosos, 6 mostraron actividad HPRT y APRT en todos los folículos viables. Trece mujeres exhibían dos poblaciones celulares: una HPRT⁺ y otra HPRT⁻ y, en de acuerdo con estos resultados fueron diagnosticadas como portadoras del defecto. El número de folículos no viables impidieron establecer el diagnóstico en cuatro mujeres (Familia G: II-2 y 4. Familia PP: II-1 y Familia H: III-9) (Figura 1).

Estudios genéticos

El diagnóstico final que establecimos en 19 sujetos se resume en la figura 3. El diagnóstico de portadora de la deficiencia de HPRT, que establecimos en 8 mujeres mediante estas técnicas de biología molecular, coincidió plenamente con el mismo diagnóstico previamente efectuado mediante el análisis de la actividad enzimática HPRT en folículos pilosos (Familia V: II-1; III-4,5 y 6; IV-1. Familia PP: I-2. Familia SA: II-5; III-1). En una niña (Familia V: IV-6) diagnosticada previamente con bastante probabilidad de no portadora por folículos pilosos, las técnicas de biología molecular confirmaron el diagnóstico de no portadora. La niña de la familia PP (II-1) en la que el gran número de folículos pilosos no viables impidió establecer el diagnóstico por técnicas enzimáticas, resultó no portadora del defecto genético con el análisis del ADN. Pudimos realizar el diagnóstico de portadora en un feto femenino (Familia V: IV-3) de 9 semanas de gestación en el que se amplificaron un fragmento de 361 pb correspondiente al alelo normal y un fragmento de 294 pb correspondiente al alelo mutado. En la sangre del cordón umbilical de un recién nacido varón (Familia SA: IV-1), hijo de madre portadora, se amplificó un alelo de 92 pb correspondiente al alelo sano y se pudo excluir con seguridad y precozmente que presentara la mutación responsable del defecto enzimático en dicha familia.

Discusión

Los resultados de este estudio indican que la presencia de hiperuricemia e hiperuricosuria en un mismo paciente puede indicar la existencia de un defecto de la actividad enzimática HPRT.

Todos los pacientes mostraron en el hemolisado, una actividad enzimática HPRT muy descendida y una actividad APRT muy superior a la observada en sujetos controles. En el hemoli-

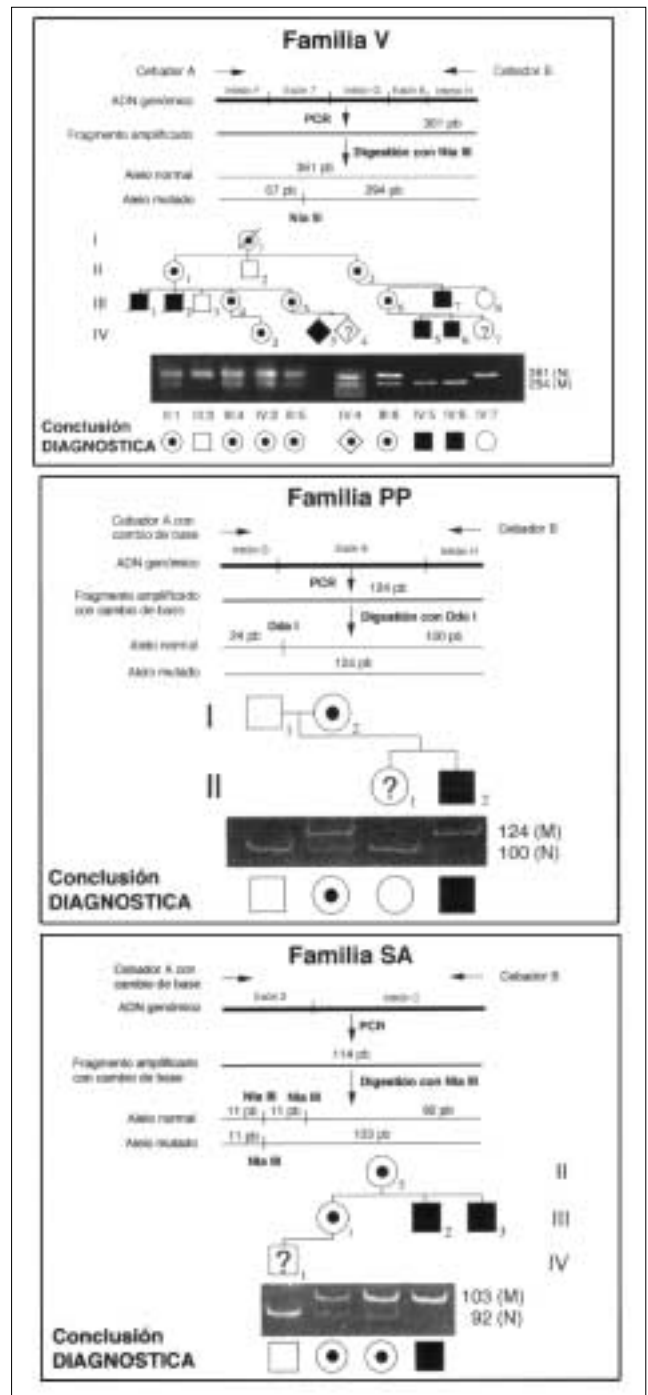


Figura 3. Diagnóstico de la deficiencia de HPRT y del estado de portadora mediante endonucleasas de restricción. Los símbolos representan lo mismo que en la Figura 1.

sado la actividad HPRT no se correlaciona con las manifestaciones neurológicas (Tabla II). Es probable que el eritrocito no refleje correctamente la actividad HPRT residual de otros tejidos. Se han descrito casos con una actividad HPRT moderadamente reducida y fenotipo característico del síndrome de Lesch-

Nyhan⁽³²⁾, y enfermos con actividad HPRT indetectable sin manifestaciones neurológicas⁽³³⁾. Los resultados de la presente serie tampoco apoyan que la actividad HPRT eritrocitaria permita clasificar a los pacientes en un determinado fenotipo. La actividad HPRT en eritrocito intacto tampoco permite diferenciar entre ambos síndromes, pero existe una mayor relación entre el porcentaje de hipoxantina marcada que es transformado en IMP y la sintomatología neurológica.

La sobreproducción de ácido úrico y sus consecuencias clínicas, artritis gotosa y nefrolitiasis, son las características clínicas comunes de la deficiencia de HPRT. El aumento de la sobreproducción de ácido úrico ha sido atribuido a un incremento de la síntesis de purinas *de novo*^(4,34). La observación de un incremento de la concentración de hipoxantina y xantina en sangre y orina, sugiere un catabolismo aumentado de los nucleótidos purínicos. En este sentido, el aumento de la excreción urinaria de radioactividad tras la inyección de adenina [⁸-C¹⁴] observada en nuestros pacientes indica una degradación exagerada de los nucleótidos purínicos⁽¹⁵⁾. Cuando existe un déficit de HPRT la reutilización de las bases púricas es defectuosa y la hipoxantina y xantina sólo pueden ser oxidadas a ácido úrico. Nuestros resultados son concordantes con los observados por otros autores que también cuantificaron la hipoxantina y xantina por HPLC en pacientes con deficiencia de HPRT⁽³⁵⁾ y contribuyen al conocimiento de la sobreproducción de ácido úrico en la deficiencia de HPRT.

La identificación de portadoras de la deficiencia de HPRT deberá realizarse en todas las mujeres de riesgo para establecer el consejo genético. Entre los métodos propuestos para el diagnóstico de portadoras, la cuantificación de HPRT y APRT en folículos pilosos individualizados es la técnica más extendida^(14,15). El método se basa en la hipótesis de Lyon y en el mosaicismo que existe en la raíz del pelo de las mujeres heterocigotas. Debido a que el número de folículos HPRT⁻ en las mujeres portadoras es escaso, el estudio se realizó en al menos 35 cabellos. Si todos los folículos eran HPRT⁺, repetimos el estudio una o dos veces más. Con tres ensayos (105 folículos viables) la posibilidad de falso negativo es de 1 en 300⁽¹⁵⁾. Con este procedimiento y de las 23 mujeres con riesgo de ser portadoras del defecto enzimático, en 13 se llegó al diagnóstico de que eran portadoras del defecto enzimático (57%), 6 se diagnosticaron como probables no portadoras (26%), y en cuatro mujeres el número de folículos no viables impidieron establecer el diagnóstico (17%). El estudio de las actividades enzimáticas HPRT y APRT en folículo piloso permite establecer el estado de portadora en la mayoría de los casos, si bien en las mujeres embarazadas diagnosticadas como probablemente no portadoras, no se puede asegurar si el feto varón padece o no la deficiencia enzimática. Con este método no es posible determinar el estado de no portadora con absoluta seguridad y, en algunos casos no es posible obtener folículos viables.

Por último, en estas familias aplicamos una metodología de biología molecular para conocer el estado de portadora de la deficiencia de HPRT⁽³¹⁾. Gracias a la metodología empleada en es-

te trabajo, y conocida la mutación responsable del defecto enzimático en una determinada familia, el diagnóstico de portadora puede realizarse de forma más rápida (24-48 horas) y fiable que mediante las técnicas bioquímicas utilizadas hasta ahora. El reducido número de observaciones no permite establecer porcentajes, si bien para los resultados obtenidos, estas técnicas de biología molecular tendrían una sensibilidad y una especificidad del 100%. El diagnóstico de no portadora puede realizarse con seguridad, lo que evita el diagnóstico prenatal en aquellas mujeres con 105 folículos pilosos o más HPRT⁺, y que con gran probabilidad, pero no total seguridad, eran diagnosticadas de no portadoras. Así mismo, y según nuestra experiencia, la biología molecular probablemente ofrezca un diagnóstico prenatal más rápido y seguro que el proporcionado por las determinaciones bioquímicas.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido posible gracias a los médicos del Sistema Nacional de la Salud que nos remitieron sus pacientes para una evaluación diagnóstica, y depositaron en nosotros su confianza. Trabajo realizado gracias a la Fundación Caja de Madrid y al Fondo de Investigación Sanitaria (FIS, 94/0218).

Bibliografía

- 1 Seegmiller JE. Diseases of purine and pyrimidine metabolism. In: Metabolic Control and Diseases. Bondy PK, Rosenberg LE, eds. Philadelphia: WB Saunders 1980; 777-937.
- 2 Rosenbloom FM, Henderson JF, Caldwell IC, Kelley WN, Seegmiller JE. Biochemical basis of accelerated purine biosynthesis *de novo* in human fibroblasts lacking hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase. *J Biol Chem* 1968; **243**:1166-1173.
- 3 Emmerson BT, Gordon RB, Johnson NA. Urate kinetics in hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase deficiency: their significance for the understanding of gout. *Q J Med* 1976; **45**:49-61.
- 4 Edwards NL, Recker D, Fox IH. Overproduction of uric acid in hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase deficiency: Contribution by impaired purine salvage. *J Clin Invest* 1979; **63**:922-930.
- 5 Lesch M, Nyhan WL. A familial disorder of uric acid metabolism and central nervous system function. *Am J Med* 1964; **36**:561-570.
- 6 Seegmiller JE, Rosenbloom FM, Kelley WN. Enzyme defect associated with a sex-linked human neurological disorder and excessive purine synthesis. *Science* 1967; **155**:1682-1684.
- 7 Kelley WN, Greene ML, Rosenbloom FM, Henderson JF, Seegmiller JE. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase deficiency in gout. *Ann Intern Med* 1969; **70**:155-206.
- 8 Page T, Bakay B, Nissinen E, Nyhan WL. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase variants: Correlation of clinical phenotype with enzyme activity. *J Inherit Metab Dis* 1981; **4**:203-206.
- 9 Pai GS, Sprenke JA, Do TT, Mareni CE, Migeon BR. Localization of loci for hypoxanthine phosphoribosyltransferase and glucose-6-phosphate dehydrogenase and biochemical evidence of non-random X-chromosome expression from human X-autosomal translocation. *Proc Nat Acad Sci USA* 1980; **77**:2810-2813.
- 10 Lyon MF. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature* 1961; **190**:688-689.
- 11 Migeon BR, Der Kaloustian VM, Nyhan WL, Young WJ, Childs B. X-linked hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase deficiency:

- Heterozygote has two clonal populations. *Science* 1968; **160**:425-527.
- 12 Fujimoto WY, Seegmiller JE. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase deficiency: activity in normal, mutant and heterozygote cultured human skin fibroblasts. *Proc Nat Acad Sci USA* 1970; **65**:577-584.
 - 13 Mckeran RO, Andrews TM, Howell A, Gibbs DA, Chinn S, Watts WE. The diagnosis of the carrier state for the Lesch-Nyhan syndrome. *Quart J Med* 1975; **44**:189-205.
 - 14 Gartler SM, Scott RC, Goldstein JL, Campbell B, Sparkes R. Lesh-Nyhan syndrome: Rapid detection of heterozygotes by use of hair follicles. *Science* 1971; **172**:572-574.
 - 15 Page T, Bakay B, Nyhan WL. An improved procedure for detection of hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase heterozygotes. *Clin Chem* 1982; **28**:1181-1184.
 - 16 Gibbs DA, Headhouse-Benson CM, Watts RWE. Family studies of the Lesch-Nyhan syndrome: the use of a restriction fragment length polymorphism (RFLP) closely linked to the disease gene for carrier state and prenatal diagnosis. *J Inher Dis* 1986; **9**:45-57.
 - 17 Igarashi T, Kamoshita S. Carrier detection of partial hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase deficiency by analysis with BamHI restriction fragment length polymorphisms and oligonucleotide probes. *Pediatr Res* 1990; **27**:417-421.
 - 18 Fujimoto WY, Seegmiller JE, Uhlendorf BW, Jacobson CB. Biochemical diagnosis of an X-linked disease in utero. *Lancet* 1968; **ii**:511-512.
 - 19 Gibbs DA, Mcfadyen IR, Crawford MD, Miunck Keizer EE, Headhouse-Benson CM, Wilson TM, Farrant PH. First trimester prenatal diagnosis of Lesch-Nyhan syndrome. *Lancet* 1984; **ii**:1180-1183.
 - 20 Mateos FA, Puig JG, Ramos TH, Jiménez ML, Romera NM, González AG. Prenatal diagnosis of Lesch-Nyhan syndrome by purine analysis of amniotic fluid and cordocentesis. *Adv Exp Med Biol* 1992; **309B**:45-50.
 - 21 Kaufman JM, Greene ML, Seegmiller JE. Urine uric acid to creatinine ratio: a screening test for inherited disorders of purine metabolism. *J Pediatr* 1968; **73**:583-592.
 - 22 Puig JG, Mateos FA, Jiménez ML, Ramos TH. Renal excretion of hypoxanthine and xanthine in primary gout. *Am J Med* 1988; **85**:533-537.
 - 23 Edwards NL, Recker D, Fox IH. Overproduction of uric acid in hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase deficiency. Contribution by impaired purine salvage. *J Clin Invest* 1979; **63**:922-930.
 - 24 Rylance RC, Wallace RC, Nuki G. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase assay using high performance liquid chromatography. *Clin Chim Acta* 1982; **127**:159-165.
 - 25 Rylance HJ, Wallace RC, Nuki G. Adenine phosphoribosyltransferase: assay using high performance liquid chromatography. *Clin Chim Acta* 1985; **148**:267-272.
 - 26 Mateos FA, Puig JG, Jiménez ML, Fox IH. Hereditary xanthinuria. Evidence for enhanced hypoxanthine salvage. *J Clin Invest* 1987; **79**:847-852.
 - 27 Page T, Bakay B, Nyhan WL. An improved procedure for detection of hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase heterozygotes. *Clin Chem* 1982; **28**:1181-1184.
 - 28 Gibbs RA, Nguyen PN, McBride LJ, Koepf SM, Caskey CT. Identification of mutations leading to the Lesh-Nyhan syndrome by automated direct DNA sequencing of in vitro amplified cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**:1919-1923.
 - 29 Bouwens-Rombouts AGM, Van Der Boogard MJH, Puig JG, Mateos FA, Hennekam RCM, Tilanus MGJ. Identification of two new nucleotide mutations (HPRT^{Utrecht} and HPRT^{Madrid}) in exon 3 of the human hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) gene. *Hum Genet* 1993; **91**:451-454.
 - 30 Sege Peterson K, Chambers J, Page T, Jones OW, Nyhan WL. Characterization of mutations in phenotypic variants of hypoxanthine phosphoribosyl transferase deficiency. *Hum Mol Genet* 1992; **1**:427-432.
 - 31 Torres Jiménez R, Mateos Antón F, Molano Mateos J, García Puig J. Diagnóstico genético de la deficiencia de hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HGPRT). Estudio de 12 casos. *Med Clin (Barc)* 1997; **108**:344-348.
 - 32 Rijkse G, Staal GEJ, Van Der Vlist MJM. Partial hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase deficiency with full expression of the Lesch-Nyhan syndrome. *Hum Genet* 1981; **57**:39-47.
 - 33 De Bruyn CHMM. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase deficiency. *Hum Genet* 1976; **31**:127-150.
 - 34 Puig JG, Jiménez ML, Mateos FA, Fox IH. Adenine nucleotide turnover in hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase deficiency: evidence for an increased contribution of purine biosynthesis de novo. *Metabolism* 1989; **38**:410-418.
 - 35 Simmonds HA, Cameron JS, Morris GS, Davies PM. Allopurinol in renal failure and the tumor lysis syndrome. *Clin Chim Acta* 1986; **160**:189-195