

**ANÁLISIS MOLECULAR DEL INTRÓN 3 Y DE LOS EXONES 3 y 6 DEL GEN
HPRT PARA UNA FAMILIA COLOMBIANA AFECTADA POR EL SINDROME DE
LESCH-NYHAN**

ADRIANA MARIA GIL ZAPATA

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
ESCUELA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BASICAS
MAESTRIA EN CIENCIAS BASICAS BIOMEDICAS
BUCARAMANGA
2007**

**ANÁLISIS MOLECULAR DEL INTRÓN 3 Y DE LOS EXÓNONES 3 Y 6 DEL GEN
HPRT PARA UNA FAMILIA COLOMBIANA AFECTADA POR EL SÍNDROME DE
LESCH-NYHAN**

ADRIANA MARIA GIL ZAPATA

**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TITO DE MAGISTER EN CIENCIAS
BASICAS BIOMEDICAS CON ENFASIS EN GENETICA HUMANA**

**Director
FERNANDO RODRIGUEZ SANABRIA
QUIMICA-BIOLOGÍA Msc**

**Codirectora
ADRIANA CASTILLO PICO
BACTERIOLOGA Msc**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
ESCUELA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BASICAS
MAESTRIA EN CIENCIAS BASICAS BIOMEDICAS
BUCARAMANGA
2007**

*A Dios porque siempre esta conmigo.
A mis padres por su apoyo incondicional.
A mis sobrinos y demás familiares por animarme en todo momento y a mis amigos cercanos por su ayuda y motivación permanente.*

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor Fernando Rodríguez, por permitirme continuar con su proyecto y por sus orientaciones. A mi tutora Adriana Castillo Pico por su asesoría y apoyo permanente; a la Dra. Leonor Gusmao no solo por los conocimientos aportados para el desarrollo de este trabajo, sino también por los reactivos y secuenciación de las muestras de los pacientes con el SLN.

A las personas que laboran en el Laboratorio de Genética de la Facultad de Salud de la UIS por su valiosa colaboración en el desarrollo de esta investigación.

A mis pacientes que integran la Familia afectada por el SLN, todo mi aprecio porque sin ellos hubiera sido imposible la realización de esta investigación.

A Estela Di-zeo, por su valiosa colaboración en la toma de muestras de algunos pacientes en el Banco Magdalena.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	20
1. OBJETIVOS	22
1.1 OBJETIVO GENERAL	22
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
2. MARCO TEÓRICO	23
2.1. ETIOLOGIA DEL SLN	23
2.2 SIGNOS Y SÍNTOMAS EN EL SLN	24
2.3 BASES BIOQUIMICAS	25
2.4 MUJERES CON SLN	26
2.5 GEN <i>HPRT</i>	27
2.6 MUTACIONES Y ALTERACIÓN ENZIMÁTICA	29
2.7 CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO	29
2.8 DIAGNÓSTICO	30
2.9 TRATAMIENTO	32
3. METODOLOGIA	33
3.1 GRUPO FAMILIAR ESTUDIADO	33
3.2 ESTUDIOS PREVIOS REALIZADOS AL GRUPO FAMILIAR	33

	Pág.
3.3 ASPECTOS ÉTICOS	34
3.4 TOMA DE MUESTRA	34
3.5 EXTRACCIÓN DEL ADN	35
3.6 ANÁLISIS DEL EXÓN 3 DEL GEN <i>HPRT</i>	34
3.6.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	35
3.6.2 Digestión del exón 3 del gen <i>HPRT</i> con la enzima Pvu II	36
3.6.3 Electroforesis	36
3.7 ANÁLISIS DEL EXÓN 6 DEL GEN <i>HPRT</i>	37
3.7.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	37
3.7.2 Digestión del exón 6 del gen <i>HPRT</i> con la enzima Bam HI.	37
3.7.3 Electroforesis	37
3.8 ANÁLISIS DEL INTRON 3 DEL GEN <i>HPRT</i>	37
3.8.1 PCR	37
3.8.2 Electroforesis capilar STR HPRTB	38
4. RESULTADOS	39
4.1 Estudio de los exones 3 y 6 del gen <i>HPRT</i>	39
4.2 Búsqueda de mutaciones en el exón 3 del gen <i>HPRT</i>	39
4.3 Búsqueda de mutaciones en el exón 6 del gen <i>HPRT</i>	39
4.4 Secuenciación de los productos PCR de los exones 3 y 6 del gen <i>HPRT</i>	42
4.5 Análisis del intrón 3 del gen <i>HPRT</i>	43

	Pág.
4. 5.1 PCR DEL intrón 3 del gen <i>HPRT</i>	43
4.5.2. Análisis predictivo del riesgo de transmisión de la mutacion con el STR del cromosoma X: <i>HPRTB</i>	43
5. DISCUSIÓN	47
5.1 Integridad de los exones 3 y 6 del gen <i>HPRT</i>	47
5.2 Probable caso de ligamiento ente el SLN y el marcador <i>HPRTB</i> .	48
6. CONCLUSIONES	50
7. RECOMENDACIONES	51
BIBLIOGRAFIA	52
ANEXOS	57

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Tamaño en pb de los exones e intrones del gen <i>HPRT</i>	28
Tabla 2. Clases de mutaciones en la deficiencia de HGPRT	31
Tabla 3. Diseño de primers exones 3 y 6 gen <i>HPRT</i>	35
Tabla 4. Listado de reactivos, PCR exones 3 y 6, gen <i>HPRT</i>	36
Tabla 5. Programa del termociclador , PCR exones 3 y 6, gen <i>HPRT</i>	36
Tabla 6. Programación del termociclador para el STR HPRTB	37
Tabla 7. Montaje electroforesis capilar del STR HPRTB ABI PRISM 310	38
Tabla 8. Parámetros de la electroforesis capilar ABI PRISM 310 del STR HPRTB	38
Tabla 9. Probabilidad de trasmisión de la mutación de las mujeres de la familia estudiada SLN.	44
Tabla 10. Relaciones de parentesco familia Colombiana afectada por el SLN	45

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Arbol genealógico de la familia con el SLN	34
Figura 2. Amplificación del exón 3 del gen <i>HPRT</i>	40
Figura 3. Digeridos del exón 3 con PvuII	41
Figura 4. Amplificación del exón 6 del gen <i>HPRT</i>	41
Figura 5. Digeridos del exón 6 con Bam HI	42
Figura 6. Arbol genealógico con los genotipos del STR del cromosoma X: HPRTB	44
Figura 7. Electroferogramas del STR del cromosoma X: HPRTB.	46

ANEXOS

	Pág.
ANEXO A. Consentimiento Informado	57
ANEXO B. Diseño de Primers del Exón 3 del gen <i>HPRT</i>	59
ANEXO C. Diseño de Primers del Exón 6 del gen <i>HPRT</i>	60
ANEXO D. Secuenciación Exón 3 (Reverse) LN02/LN07 gen <i>HPRT</i>	61
ANEXO E. Secuenciación Exón 3 (Forward) LN02/LN07 gen <i>HPRT</i>	63
ANEXO F. Secuenciación Exón 3 (Forward) LN04/ LN08 gen <i>HPRT</i>	65
ANEXO G. Secuenciación Exón 3 (Reverse) LN04/LN08 gen <i>HPRT</i>	67
ANEXO H. Secuenciación Exón 6 (Forward) LN04/ LN01 gen <i>HPRT</i>	69
ANEXO I. Secuenciación Exón 6 (Reverse) LN04/ LN07 gen <i>HPRT</i>	71
ANEXO J. Decaplex Strs cromosoma X para la familia afectada SLN.	73
ANEXO K. Primers Decaplex del Cromosoma X	74

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Acido Desoxirribonucleico.

AMP: Adenosina Monofosfato.

APRT: Adenina Fosforribosil Transferasa.

ARN: Acido Ribonucleico.

GMP: Guanina Monofosfato.

HGPRT: Hipoxantina Guanina Fosforribosil Transferasa.

HPRT: Hipoxantina Fosforribosil Transferasa.

HPRTB: STR del cromosoma X

IMP: Inosina Monofosfato.

IPATIMUP: Instituto de Inmunologia y Patologia Molecular de la Universidad de Porto.

Portugal

LN: Lesch Nyhan.

MPM: Marcador de peso molecular.

pb: pares de bases.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PRPP: Fosforribosilpirofosfato.

SLN: Síndrome de Lesch-Nyhan.

STR: Repeticiones cortas en tándem. (STR, del inglés Short tandem repeats).

µl : Microlitro

μM : Micromolar

mM: Milimolar.

GLOSARIO

ADN: (Ácido Desoxirribonucleico), molécula de doble hélice constituida por una espina dorsal de nucleótidos formados a su vez por un azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada (adenina, citosina, guanina y timina). El ADN es el soporte de toda información genética que se transmite de generación en generación. El ADN de una persona es el mismo en cada núcleo de cada una de sus células.

Afectado: Una persona que manifiesta los síntomas de una enfermedad.

Asesoramiento genético: Es la consejería que se da a la pareja o a una familia que padece una enfermedad con el fin de informar sobre el curso, evolución y pronóstico del padecimiento o malformación, así como en establecer, en forma clara, cuales son los riesgos de su aparición o recurrencia.

Codón: Triplete de tres bases, en una molécula de ADN o ARN, que codifica un aminoácido específico.

Consentimiento informado: El permiso dado por una persona para proseguir con una prueba específica o procedimiento, con un acuerdo sobre los riesgos, beneficios, limitaciones e implicaciones potenciales del procedimiento mismo o de sus resultados

Correlación de genotipo-fenotipo: la asociación entre la presencia de cierta mutación o mutaciones (genotipo) el cual da como resultado anomalías (fenotipo)

Cromosoma: Está compuesto por una molécula de ADN lineal asociada a proteínas, son los portadores de la información genética. Se hallan en el núcleo de la célula y están constituidos por un brazo corto p y un brazo largo q, unidos por un centrómero.

Delección: Forma de aberración de los cromosomas, en la cual se pierde una parte de éstos.

Diagnóstico de preimplantación: Procedimiento que permite conocer y reducir el riesgo de una condición genética especial, donde se toma una célula de embriones concebidos por la fecundación in vitro, los cuales no deben haber heredado la mutación en cuestión y son transferidos al útero de la madre.

Diagnóstico prenatal: Procedimiento que permite conocer tempranamente in útero el estado del feto cuando éste tiene riesgos de presentar una afección genética.

Duplicación: la presencia de un segmento adicional de ADN, restando en copias redundantes de una parte de un gen *HPRT*, un gen *HPRT* entero, o a series de genes, generalmente causada por cross-over desigual durante la meiosis.

Ensayo enzimático: la medición de la actividad de enzima con un substrato especial; puede ser dado de muchas maneras incluyendo cuantificación del producto final o el análisis colorimétrico.

Error innato del metabolismo: o metabolopatía congénita corresponden a trastornos genéticos poco comunes generalmente causados por defectos en proteínas específicas (enzimas), que traen como consecuencia una enfermedad.

Exón: Segmento del ADN que se transcribe a ARNm y posteriormente se traduce a una secuencia de aminoácidos.

Fenotipo: las características físicas y/o bioquímicas observables de la expresión de un gen *HPRT*; la presentación clínica de una persona individual con un genotipo especial, es la interacción del genotipo con el medio ambiente.

Genotipo: La serie completa de genes que lleva un individuo. El término se usa a veces en un sentido más limitado para indicar los alelos existentes en uno o más loci.

Heterocigoto: Individuo que tiene dos alelos diferentes en un determinado locus de un par de cromosomas homólogos.

Homocigoto: una persona que tiene dos alelos idénticos en un punto especial, uno sobre cada cromosoma de un par

Inserción: una anomalía cromosómica en la que parte de un cromosoma es insertado en otro cromosoma no homólogo; una mutación en la que un segmento de ADN es insertado en un gen *HPRT* u otro segmento de ADN, afectando potencialmente la secuencia de codificación.

Intrón: Porción del ADN que se transcribe a ARN pero que es eliminada enzimáticamente de esta molécula antes de que el ARNm pase al citoplasma y se traduzca.

La prueba diagnóstica: Es la prueba diseñada para confirmar o excluir un trastorno genético conocido o sospechado en una persona sintomática o, prenatal, en un feto en riesgo para cierta condición genética

La terapia génica: El tratamiento experimental de un trastorno genético para reemplazar, complementar, o manipular la expresión de genes anormales con genes funcionando normalmente.

Ligado al cromosoma X: Los genes situados en el cromosoma X o los caracteres determinados por estos genes se hallan ligados al cromosoma X Sinónimo de ligado al Sexo.

Marcador: Un segmento identificable de ADN (por ejemplo., RFLP, VNTR, microsatellite) con la suficiente diferencia entre personas que su herencia y coherencia con alelos de un gen *HPRT* en particular.

Microsatélite: Tipo de ADN satélite que consiste en pequeñas unidades repetidas, por lo usual de 2, 3 o 4 pb, que aparecen en tándem.

Mutación: Cualquier alteración en un gen *HPRT* de su estado natural; puede causar una enfermedad o variabilidad.

Mutación de la línea germinal: la presencia de un gen *HPRT* cambiado dentro del huevo o (célula de microbio) de espermatozoides, de forma que el gen *HPRT* cambiado puede ser heredado a las generaciones siguientes

Mutación puntual: Una alteración en la secuencia de ADN causada por un cambio de base de solo un nucleótido, la inserción, o la delección.

Mutación en el marco de lectura: Como el código genético se lee desde un extremo en bloques consecutivos de tres bases, cualquier delección o inserción de una base origina un desfase en el marco de lectura, y la traducción del gen *HPRT* resta completamente alterada.

PCR: (Reacción en cadena de la polimerasa), técnica de amplificación in vitro que genera un gran número de copias de una secuencia específica de ADN flanqueada por otras complementarias a las de dos cebadores oligonucleótidos. Se procede a calentamiento y enfriamiento alternantes del ADN en presencia de ADN polimerasa y nucleótidos libres, de modo que el segmento de ADN especificado es desnaturalizado, hibridado con cebadores y extendido mediante la ADN-polimerasa.

Pedigrí: Un diagrama de las relaciones genéticas y la historia médica de una familia, el cual usa símbolos y terminología determinada.

Portador: Individuo que lleva un gen *HPRT* recesivo, autosómico o ligado al sexo, junto con su alelo normal, es decir un heterocigoto. No manifiesta la patología pero la transmite.

Portador obligado: Individuo heterocigoto, que en su descendencia tiene hijos afectados por un rasgo recesivo, autosómico o ligado al cromosoma X.

Propositus: Miembro de la familia que es el primero en llamar la atención sobre el árbol genético de un determinado carácter. Denominado también caso índice o probando.

Región codificante: Todos los exones de un gen *HPRT* que después del proceso de transcripción y traducción formarán la proteína.

Secuencia de ADN: Orden de las bases de ADN a lo largo de un cromosoma.

Test de portador: (sinónimos: detección de portador, la prueba de heterocigoto) prueba que se usa para identificar a personas generalmente asintomáticas que tienen una mutación de un gen *HPRT* para un gen *HPRT* recesivo de autosómico o ligado a X.

RESUMEN

TITO: ANÁLISIS MOLECULAR DEL INTRÓN 3 Y DE LOS EXONES 3 Y 6 DEL GEN *HPRT* EN UNA FAMILIA COLOMBIANA AFECTADA POR EL SÍNDROME DE LESCH-NYHAN.*

AUTORES: Gil A, Castillo A, Gusmao L, Rodríguez F.**

PALABRAS CLAVES: Lesch-Nyhan, gen *HPRT*, Enzimas de restricción, Afectado, Portador, Consejería genética.

DESCRIPCION:

El síndrome de Lesch Nyhan (SLN) es un error innato del metabolismo recesivo ligado a X. SLN es una enfermedad rara que afecta fundamentalmente a los hombres mientras que las mujeres pueden ser sanas y las que heredan el genotipo responsable se comportan como portadoras. El SLN es causado por muy diversas mutaciones que se pueden presentar en el gen Hipoxantina fosforribosil transferasa (*HPRT*) y que hacen que la actividad enzimática, de la enzima codificada esté muy disminuida en la mayoría de los pacientes, ocasionando diferentes trastornos en el metabolismo de las purinas, lo cual trae como consecuencia trastornos neurocognitivos y comportamentales en los pacientes. No existe tratamiento para este trastorno y por ello es muy importante la consejería genética.

En este trabajo se realizó el análisis molecular del intrón 3, del gen *HPRT* con el marcador del cromosoma X STR *HPRTB*; y la amplificación de los Exones 3 y 6 con posterior digestión con las enzimas PvuII y BamHI respectivamente.

La secuenciación de los exones 3 y 6 del gen *HPRT* no mostró ninguna mutación. Sin embargo el marcador del cromosoma X *HPRTB* permitió identificar el alelo asociado a la mutación causante del SLN, en varios miembros de la familia. Este hallazgo demuestra la utilidad de esta técnica para la identificación de las mujeres portadoras y su utilidad en la consejería genética como método preventivo dado que en la actualidad no existe un tratamiento efectivo, la terapia génica sigue siendo de gran valor como método preventivo para los miembros de una familia con individuos afectados por la enfermedad.

*Tesis de Grado.

**Facultad de salud de la UIS, Ciencias Básicas Biomédicas, Castillo A, Rodríguez F.

SUMMARY

TITLE: MOLECULAR ANALYSIS OF INTRON 3 AND EXONS 3 AND 6 OF *HPRT* GENE FOR A COLOMBIAN FAMILY AFFECTED BY LESH-NYHAN SYNDROME*

AUTHORS: Gil A, Castillo A, Gusmao L, Rodríguez F**

KEY WORDS: Lesch-Nyhan, gene, Restriction Enzymes, Affected, Carrier, Genetic Counseling.

DESCRIPTION: Lesch Nyhan Syndrome (SLN) is an inborn error of metabolism and is considered an X-linked recessive inherited disorder. Therefore is very rare, and males turn out to be more affected than women, which can be either healthy or asymptomatic carriers. Diverse mutations in the hypoxanthine phosphoribosyl transferase gene (*HPRT*) makes the enzymatic activity decrease in most of the patients causing different upheavals in the purine metabolism, which brings out neurocognitive and behavioral consequences. There is no treatment for this condition and why it is so important genetic counseling.

The genetic studies confirmed the clinical and bio-chemical diagnostic for SLN in this family. This thesis performed the molecular analysis of intron 3 with the X chromosome's STR and, the amplification of exon 3 and 6 of the encoding gene and digestion with the restriction enzymes PvuII and BamHI respectively.

Direct sequencing of the exons 3 and 6 of the gene was done and no mutation was found. Nevertheless the fluorescent markers *HPRTB* allowed to define the state of being or not a carrier in every woman of the family. In future studies is relevant amplify all the other exons in the *HPRT* gene, in order to characterize the mutation in this family of SLN. At the moment an effective treatment does not exist, therefore the genetic therapy is a perspective towards the future and genetic counseling is still valuable as a preventive in the carrying women.

* Thesis

**Faculty of health UIS, Biomedical Basic sciences, Castillo A, Rodriguez F.

INTRODUCCIÓN

El síndrome de Lesch-Nyhan (SLN) es un error innato del metabolismo de las purinas que se produce por la deficiencia de la enzima Hipoxantina-Guanina-Fosforribosil Transferasa (HGPRT), la cual está involucrada en la vía metabólica que convierte a las purinas hipoxantina, guanina y al fosforribosilpirofosfato (PRPP) en los nucleótidos inosina monofosfato (IMP) y guanina monofosfato (GMP) necesarios para la síntesis de los ácidos nucleicos.¹

En el sistema nervioso central, esta reacción de la “vía de salvamento o rescate de las purinas” es imprescindible para una correcta síntesis del ADN y del ARN, debido a que las purinas que llegan desde el hígado no son suficientes para la demanda de nucleótidos requerida por el cerebro. Esta enfermedad fue descrita en el año de 1964 por Lesch- Nyhan y se caracteriza por una sobreproducción de ácido úrico, incapacidad neurológica, varios grados de incapacidad cognitiva, anormalidades del comportamiento como agresividad con los demás y auto agresión (auto- mutilación).²

El gen *HPRT* que codifica para la enzima HGPRT está localizado en el brazo largo del cromosoma X, en la región X q26.1 y está constituido por nueve exones y ocho intrones, con un total de 57 kb³. El gen *HPRT* es transcrito en un mRNA de 1.6 kb, el cual codifica para una proteína de 218 aminoácidos. Con el desarrollo de técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el ADN complementario, genómico y la secuenciación, se ha hecho posible el estudio molecular y la ubicación exacta de las diferentes mutaciones asociadas a SLN, las cuales son heterogéneas y van desde sustitución de una sola base, mutaciones sin sentido, inserciones hasta deleciones sobre todos los exones. Una altísima proporción de estas mutaciones se encuentran sobre el exón 3 donde existen los llamados “puntos calientes”, es decir, sitios dentro de dicha región con altas frecuencias de mutación.⁴

El síndrome de Lesch-Nyhan es una concordancia de género, recesiva ligada al cromosoma X, con una frecuencia de 1/380.000. Los hombres pueden estar afectados o sanos debido a su condición de hemicígotos; es decir tienen una sola copia del cromosoma X, lo cual permite que exista una mayor proporción de hombres afectados por este rasgo. Las mujeres presentan dos copias del cromosoma X. Si una de las copias lleva el gen *HPRT* con la mutación asociada a la enfermedad son portadoras y sanas si ninguna de las dos copias lo presentan.

¹SCRIVER, CR, BEAUDET, AL, SLY The metabolic & molecular bases of inherited disease. Eight ed. Volume II. 2001. p.2537.

²RODRÍGUEZ F, BARRERA A. Actividad de la enzima HGPRT en Eritrocitos de una familia afectada por el síndrome de Lesch Nyhan. En: Salud UIS 2001; 33. p. 32.

³ARGOS,P. HANEI,M., WILSON,J.M. and KELLEY,W.N. The National Center for Biotechnology Information (NCBI) Nucleotide [database on internet] En: M26434. Reports Human hypoxanthin...[gi:184369] Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank, 2001.

⁴ELICE M, et al. Molecular description of three macro deletions and an Alu-Alu recombination-mediated duplication in the gene in four patients with Lesch Nyhan disease. En: Mutation Research 476 2001. p.43.

Actualmente adelantamos estudios bioquímicos y moleculares en una familia afectada por el SLN. Previamente se ha realizado mediante el diagnóstico bioquímico, la cuantificación de la actividad de HGPRT en las 2 personas de la familia afectadas por SLN y que fueron el propositus u objeto de éste estudio. Se analizó no sólo los eritrocitos sino también el folículo piloso. En este estudio se realizó el análisis molecular de los Exones 3 y 6 del gen *HPRT* al igual que el análisis del intrón 3 del gen *HPRT* utilizando el STR del cromosoma X *HPRTB*.

Debido a que actualmente, no existe tratamiento para la enfermedad, la importancia de este estudio, radica la posibilidad de realizar consejería genética a 6 mujeres que integran esta familia. Para ello es necesario establecer el estado de portadora o no portadora en cada una de ellas, con el fin de evitar la aparición nuevos casos de esta enfermedad, la cual es muy dramática en sus manifestaciones clínicas, y la expectativa de vida es de 44 años. Las perspectivas hacia futuro son la terapia génica ó bioquímica del metabolismo de las purinas y neurotransmisores.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Realizar el estudio molecular del intrón y de los exones 3 y 6 del gen *HPRT* en una familia con diagnóstico clínico y bioquímico del síndrome de Lesch- Nyhan.

1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Realizar el análisis de los genotipos del STR del cromosoma X (*HPRTB*), ubicado en el Intrón 3 del gen *HPRT* .
- Analizar los exones 3 y 6 del gen *HPRT* para buscar mutaciones, en la familia afectada por el síndrome de Lesch – Nyhan.
- Establecer el estado de portadora o no portadora del gen asociado al SLN, en las mujeres pertenecientes a una familia colombiana con dos hijos afectados por la enfermedad,

2. MARCO TEÓRICO

2.1 ETIOLOGIA DEL SLN

El SLN surge de una anomalía genética recesiva y ligada al cromosoma X, con una incidencia aproximada de 1:380.000⁵. Es un desorden metabólico causado por una deficiencia casi completa de la actividad de la enzima hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa (HGPRT; EC.2.4.2.8) la cual recupera las bases purínicas hipoxantina y guanina en la vía de salvamento de las purinas.⁶ En 1964, Lesch y Nyhan describieron 2 hermanos con hiperuricemia y un síndrome con características neurocomportamentales que incluían disfunción motora y comportamiento injurioso con ellos mismos.

La deficiencia de la enzima en la vía del salvamento de las purinas (HGPRT) causa tres síndromes clínicos, que dependen de la actividad residual de la enzima. Las variantes del SLN en pacientes con menos de 8% de actividad residual de la enzima muestran una marcada sobreproducción de ácido úrico, asociada con hiperuricemia, nefrolitiasis y gota. Pacientes con 1.5 a 8% de actividad residual muestran una sobreproducción de ácido úrico con incapacidad neurológica de varias formas menores de debilitamiento extrapiramidal y disfunción motor piramidal. Finalmente, los pacientes con el SLN que presentan menos del 1.5% de actividad residual tienen una sobreproducción de ácido úrico, debilitamiento e incapacidad neurológica, varios grados de incapacidad cognitiva, y anomalías del comportamiento que incluyen trastornos motores y automutilaciones. La edad de manifestación más común es entre los 3 y 12 meses de vida.⁷ Actualmente 302 mutaciones están registradas en una amplia base de datos, relacionadas con fenotipos clínicos tanto del SLN como de sus variantes.⁸

La enzima HGPRT es codificada por el gen *HPRT* de aproximadamente 57 kb, ubicado en el brazo largo del cromosoma X (locus Xq26.1), el cual consta de 9 exones y 8 intrones. Varias mutaciones en el gen *HPRT* han dado origen a diversos grados de deficiencia enzimática. La enzima HGPRT, convierte las bases purínicas hipoxantina y guanina en sus correspondientes nucleótidos (IMP y GMP, respectivamente) con el concurso del fosforribosilpirofosfato (PRPP) que actúa como cosustrato. La deficiencia de HGPRT origina un descenso en la reutilización de bases purínicas y un aumento en la síntesis *de novo*, promoviendo un incremento de la síntesis de ácido úrico.⁹

⁵CRAWHALL JC, HENDERSON JF, KELLEY WN. Diagnosis and treatment of the Lesch-Nyhan syndrome. En: *Pediatr Res* 6:504, 1972. p. 504

⁶LESCH M, NYHAN W.L. A familial disorder of uric acid metabolism and central nervous system function. *Am J Med* 36: 561, 1964. p. 61.

⁷SCRIVER, CR., *Op. cit.* p. 2539.

⁸JINNAH HA, HARRIS JC, NYHAN WL, O'NEILL JP. Department of Neurology, Johns Hopkins Hospital, Baltimore, Maryland 21287, USA. The spectrum of mutations causing deficiency: an update *Nucleosides Nucleotides*. En: *Nucleic Acids*. 2004 Oct;23(8-9). P. 1153.

⁹ROSENBLUM FM, et al. Biochemical basis of accelerated purine biosynthesis *de novo* in human fibroblasts lacking hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase. En: *J. Biol Chem*. 1968; 243. p. 1166.

2.2 SIGNOS Y SINTOMAS EN EL SLN

Los signos en el SLN son piramidales y extrapiramidales. El mayor signo de disfunción Piramidal es la espasticidad, hiperreflexia y reflejo del extensor plantar; por lo tanto, el desarrollo motor está retrasado y los signos típicos piramidales y extrapiramidales empiezan a desarrollarse entre 1 y 2 años.¹⁰ Los signos extrapiramidales son distonía, coreatetosis y espasticidad; otros signos extrapiramidales pueden aparecer como espasmos del extensor o del tronco, espalda arqueada y son atribuibles a disfunción del ganglio basal.¹¹ Al afectado por el SLN le es imposible gatear y termina confinado a una silla; éstos signos hacen que en un principio se vea como una parálisis cerebral, hasta que se detecta la hiperuricemia o la agresividad tanto con los demás, como para ellos mismos.

Todos los pacientes con SLN exhiben una incapacidad motora profunda, usualmente reconocida entre los 3 a 9 meses de vida, cuando el infante carece de la habilidad para sostener la cabeza o no soporta el estar sentado por la hipotonía muscular.¹² En otros pacientes, los primeros síntomas son la presencia de movimientos involuntarios o un incremento en el tono muscular. El SLN es una enfermedad que se manifiesta por una producción excesiva de purinas pero solo algunos pacientes muestran manifestaciones neurológicas. La producción excesiva de purinas en la deficiencia de HGPRT es atribuida a la acumulación del 5 Fosforribosil 1 Pirofosfato (PRPP), el cual es un co-substrato para la enzima HGPRT.¹³ La Automutilación es probablemente la manifestación que más ha interesado a los investigadores. Los pacientes presentan esta manifestación en forma relativamente temprana y gradual; frecuentemente tratan de controlarla, pero no fácilmente resisten ésta tendencia compulsiva. En otras enfermedades con manifestaciones autodestructivas como el autismo y otros trastornos del desarrollo se presenta de una forma menos dramática.

Otras manifestaciones clínicas en el SLN son la anemia megaloblástica, el retraso en el crecimiento y la hipertermia. La anemia megaloblástica no se presenta en todos los pacientes.¹⁴ Existe retardo en el crecimiento de los pacientes con SLN. Varios estudios han confirmado que estos pacientes tienen un crecimiento más lento, la pubertad está retardada o ausente y la atrofia testicular es común. La disfunción testicular parece estar relacionada con la importancia que la vía del salvamento de purinas media en este

¹⁰HOEFNAGEL D. et al. Hereditary choreoathetosis, self- mutilation, and hyperuricemia in young males. En: N Engl J Med 273. 1965. p 130.

¹¹VISSER JE, BAER P, JINNAH HA. Lesch Nyhan syndrome and the basal ganglia. Brain Res Rev 32: 2000. p. 449.

¹²MARCUS S, et al. Mutation analysis and prenatal diagnosis in a Lesch – Nyhan family showing non- random x- inactivation interfering with carrier detection. En: Hum Genet 89: 1992. p. 395.

¹³TORRES JIMÉNEZ, R. F et al. Estudio Bioquímico, enzimático y genético de la deficiencia de hipóxantina guanina fosforibosiltransferasa (). En: An Esp pediatr 1998; 48. p.355.

¹⁴VAN DER ZEE, SPM. SCHRETLEN, EDAM. MONNENS LAH. Megaloblastic anemia in the Lesch-Nyhan syndrome. Lancet a. 1968. p. 1427.

tejido.¹⁵ La fiebre ha sido un signo constante en pacientes con SLN; probablemente no sea consecuencia directa del metabolismo sino debido a otras circunstancias. Por ejemplo, la dificultad para digerir los alimentos y el vómito recurrente, predisponen a la aspiración y a la bronconeumonía.¹⁶ El depósito de cristales de ácido úrico en las articulaciones o tejidos subcutáneos pueden producir cambios inflamatorios con fiebre, al igual que el incrementado riesgo de nefrolitiasis, pielonefritis o infecciones en otra parte del sistema urogenital.

2.3 BASES BIOQUÍMICAS

Las purinas son moléculas con diversas funciones en la fisiología de las células; ellas juegan un papel esencial en las reacciones que requieren energía, en la síntesis de ácidos nucleicos, como cofactor de reacciones y en la señalización inter e intracelular.¹⁷ Los nucleótidos de purina se pueden sintetizar mediante dos vías distintas. En primer lugar, las purinas se sintetizan *de novo*, a partir de materiales sencillos como aminoácidos y bicarbonato. Las bases púricas se van construyendo ya unidas al anillo de ribosa. La segunda vía está relacionada con la recuperación de las bases púricas liberadas durante la degradación hidrolítica de ácidos nucleicos y nucleótidos.

La biosíntesis *de novo* de las purinas necesita PRPP, el cual constituye el pilar sobre el cual se irán construyendo, paso a paso las bases. El paso limitante en la síntesis de los nucleótidos de purina es la formación de la 5-fosforribosilamina a partir del PRPP y glutamina. La glicina se une a la fosforribosilamina para formar glicinamida ribonucleótido. La glicina es formilada, los derivados del folato sirven como intermediarios activados en varias etapas de la formación de nucleótidos. El CO₂, el formiltetrahidrofolato y el aspartato, aportan los carbonos necesarios para la síntesis del esqueleto de la purina. El inosinato, es el precursor del AMP y del GMP. La conversión del PRPP en fosforribosilamina por la glutamina PRPP amidotransferasa, está retroinhibida por muchos ribonucleótidos púricos, al

Igual que los productos finales de esta vía como el AMP y el GMP.¹⁸

La vía de rescate o recuperación de las bases púricas libres surge de la degradación hidrolítica de los ácidos nucleicos y de los nucleótidos. A partir de las bases preformadas pueden sintetizarse nucleótidos púricos por una reacción de reciclaje, mucho menos costosa desde el punto de vista energético que la vía *de novo*. En esta reacción el componente ribosa fosfato del PRPP se transfiere a la purina para formar el nucleótido correspondiente. La vía de salvamento de las purinas en los humanos está mediada por tres diferentes enzimas: HGPRT, APRT y adenosina Kinasa.

¹⁵SKYLER JS, et al. Growth retardation in the Lesch- Nyhan syndrome. *Acta Endocrinol* 75. 1974. p.3.

¹⁶CHRISTIE R, et al. Lesch- Nyhan disease: Clinical experience with nineteen patients. *En: Devel Med Child Neurol* 24: 1982. p 293.

¹⁷PATTERSON, D. De novo purine and pyrimidine biosynthesis, in Bottesman MM. *En: Molecular Cell Genetics*. New York, John Wiley. 1985. p. 267.

¹⁸STRYER Lubert, BERG Jeremy M. Tymoczko John L. *Bioquímica*, 5ed. Ed. Reverté, 2004. Capito 25. p.698.

El 90% de las purinas libres generadas durante el metabolismo intracelular es reciclado en lugar de degradado o excretado. La enzima HGPRT sirve para reciclar la hipoxantina y la guanina a IMP y GMP, respectivamente. APRT, la cual es estructural y funcionalmente similar a HGPRT, recicla la adenina a AMP. La Adenosina Kinasa no se considera una enzima estricta de esta vía; sin embargo, previene la difusión de la adenosina libre por la fosforilación del AMP producido. El inosinato es el punto de ramificación en la síntesis de AMP y GMP. El AMP inhibe la conversión del inosinato en adenilsuccinato, su precursor inmediato; de modo similar, el GMP inhibe la conversión de inosinato en xantilato, su precursor inmediato. En la síntesis de adenilato se requiere GTP, mientras que en la síntesis de GMP se necesita ATP. Este uso recíproco de los nucleótidos por parte de las vías da lugar a la regulación.

El mecanismo final que contribuye a mantener las purinas celulares involucra la captación de bases purínicas libres y la producción de nucleótidos provenientes de la dieta. La digestión de los alimentos libera purinas a través de la degradación del ADN y del ARN; una porción de estos componentes es tomada en la corriente sanguínea e incorpora purinas utilizadas por el hígado. El hígado produce bases purínicas y las exporta a través del flujo sanguíneo para ser utilizadas por otros tejidos.¹⁹ La incorporación de estas purinas se realiza gracias a la actividad de las enzimas HGPRT y APRT; por lo tanto, su ausencia resulta en una incapacidad para reciclar purinas a través del metabolismo intracelular al igual que las purinas derivadas de la fuente extracelular. La degradación de las purinas se da por acción de 5'-nucleotidasa, adenosina deaminasa, purina nucleósido fosforilasa, guanasa y xantina oxidasa.

Las consecuencias bioquímicas de una ausencia prácticamente total de HGPRT son una elevada concentración de PRPP, un notable aumento en la velocidad de biosíntesis de purinas mediante las vías *de novo* y una sobreproducción de urato. Determinadas células del cerebro podrían depender de las vías de recuperación para sintetizar IMP y GMP. En los individuos afectados, el nivel de transportadores del neurotransmisor de dopamina es reducido.

2.4 MUJERES Y SLN

Raramente las mujeres presentan el SLN. Las mujeres son normales o puede ser portadoras si genotípicamente son heterocigotas, presentando en ambos casos un fenotipo normal. Sin embargo alrededor de seis mujeres clínicamente afectadas han sido descritas; en la mayoría de los casos reportados ocurrió una mutación en uno de los alelos del gen *HPRT* y una inactivación no randomizada del cromosoma X que llevaba el gen *HPRT* normal. Un solo caso describe una mutación *de novo* debido a una traslocación entre el cromosoma X y un autosoma²⁰.

¹⁹SCRIVER, CR., Op. cit. p. 2546.

²⁰CHONI RINAT A., et al. Molecular, biochemical, and genetic characterization of a female patient with Lesch–Nyhan disease
En: Molecular Genetics and Metabolism 87 (2006) p. 249.

La primera mujer afectada tenía todos los síntomas que se aprecian en los hombres afectados; como hiperuricemia, incapacidad neurológica piramidal y extrapiramidal, y comportamientos agresivos. El análisis genético mostró una microdeleción del cromosoma X de la madre y una inactivación no randomizada derivada del cromosoma X del padre. En otros casos, se reportó una mutación puntual en uno de los alelos con una expresión reducida del ARN mensajero.²¹ También se han reportado casos de gemelas monocigóticas discordantes; es decir, una de ellas portadora de la enfermedad y la otra afectada. Ambas tenían un cromosoma X mutado debido a un error de *splicing* en el ARN. En el caso de la gemela con SLN, la otra copia del cromosoma X tenía una inactivación no randomizada proveniente del padre.

De los trabajos realizados sobre mujeres afectadas por el SLN, en uno solo se ha reportado una mutación *de novo*, porque no se encontró en sus padres. En dicho caso la transcripción del alelo normal fue inhibida debido a una inactivación no randomizada del cromosoma X. En el cromosoma X homólogo no ocurrió la transcripción del gen *HPRT* debido a un bloqueo por una traslocación entre el cromosoma X y el cromosoma autosómico 22:46, XX,t(X:22)(q26:p25). A ésta paciente con 2 meses de edad no se le detectó actividad residual de la enzima HGPRT.²²

2.5 GEN *HPRT*

Se encuentra ubicado en el locus q 26.1 del cromosoma X, y el número de acceso a la base de datos Genbank es M26434. *HPRT1* y es sinónimo de *HPRT*, aunque en otros reportes lo describen como *HGPRT*. La longitud completa del gen *HPRT* es de 57 kb. La secuencia de *HPRT* incluye el segmento comprendido entre la base 1676 5' y la base del extremo 3' 15238 del exón 1 hasta el 9 respectivamente; en la tabla 1 se aprecia el tamaño de cada uno de los exones y los 8 intrones del gen *HPRT*.

El exón 3 del gen *HPRT* es el de mayor tamaño (183 pb); va desde la posición 16603 a la 16786. Muchos estudios han reportado todo tipo de mutaciones agrupadas en los llamados puntos calientes.²³ Por lo tanto, es uno de los exones más estudiados. En el exón 6 se ha localizado el sitio de unión al PRPP; tiene un tamaño de 82 pb y se ha visto que mutaciones puntuales hace que cambie la hidrofobicidad de los aminoácidos allí codificados, afectando las características estructurales de la enzima.

²¹ARAL B, et al. Novel nonsense mutation in the hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase gene and nonrandom X-inactivation causing Lesch-Nyhan syndrome in a female patient. *En: Hum Mutat* 7: 1996. p .52.

²²DE GREGORIOA, Laura et al. Lesch-Nyhan disease in a female with a clinically normal monozygotic twin. University of California San Diego. *En: Molecular Genetics and Metabolism*, 2005. p.70

²³JINNAH, H.A. et al. The spectrum of inherited mutations causing deficiency: 75 new cases and a review of 196 previously reported cases. *En: Mutat. Res.* 463 (2000). p. 309.

El gen *HPRT* contiene 49 repeticiones Alu, con otro tipo de secuencias repetitivas.²⁴ Se han identificado 4 pseudogenes: uno localizado en el cromosoma 3, otro en el cromosoma 5 y dos están localizados en el cromosoma 11.²⁵

Tabla 1. Tamaño en pb de los exones e intrones del gen *HPRT*

Exones	Tamaño (pb)	Intrones	Tamaño (pb)
1	26	1	13075
2	106	2	1715
3	183	3	11103
4	65	4	3659
5	17	5	3301
6	82	6	4794
7	46	7	170
8	78	8	1343
9	47		

pb: pares de bases.

Fuente: elaborado por el autor.

En esta tabla se aprecia el tamaño en pb de los 9 Exones y de los 8 Intrones del gen *HPRT* (Hipoxantina Fosforibosil Transferasa). El exón de mayor tamaño es el 3 con 183pb.

- Secuencias cortas repetidas en Tándem

En el SLN se ha analizado los loci STRs(del inglés Short tándem repeats). Son secuencias cortas (2 a 7 pb) repetidas en tándem, una por cada 5.000 a 10.000 pb ubicadas tanto en regiones génicas como extragénicas del genoma humano. Los STRs localizados en regiones génicas se presentan tanto en intrones y en regiones flanqueantes como en regiones codificantes.

El tamaño de los alelos de los STRs es menor a 350 pb y son susceptibles de ser amplificados mediante PCR multiplex, donde es posible realizar un análisis simultáneo de distintos loci STRs.²⁶ La determinación de STRs se puede realizar con resolución de una base mediante electroforesis capilar.

Un gran número de estas regiones STRs presentan un alto polimorfismo genético con base en la secuencia y longitud. Un STR puede utilizarse como marcador de segregación de un gen con una mutación específica. Esta condición permite la aplicación de diferentes métodos tales como secuenciación, electroforesis, PCR para su

²⁴YAMADA Y., et al. Molecular mechanisms of the second female Lesch-Nyhan patient. *Adv Exp Med Biol* 370: 1994. p. 337.

²⁵EDWARDS, A. et al. Automated DNA Sequencing of the Human locus. *Genomics* 6:1990. p. 593.

²⁶BEGOÑA M. La prueba del ADN en medicina forense. Madrid. MASSON, 1999. p.73.

caracterización. En el polimorfismo de longitud esta dado por la variación en el número de unidades de repetición. El STR *HPRTB* está ubicado en el intrón 3 del gen *HPRT*; es de tipo tetranucleótido y en los últimos años se ha utilizado ampliamente en genética clínica para el diagnóstico de portadores en enfermedades ligadas a X, como Distrofia Muscular de Duchenne, Deficiencia de G6PD y Hemofilia entre otros.²⁷

2.6 MUTACIONES Y ALTERACIÓN ENZIMÁTICA

Las mutaciones del gen *HPRT* fueron caracterizadas a partir de la secuencia de la proteína aberrante HGPRT en pacientes afectados. Varios autores han propuesto que las mutaciones clínicamente relevantes se han detectado agrupadas en regiones que afectan importantes dominios funcionales de la enzima HGPRT, como la unión al PRPP.²⁸ Este sitio fué inicialmente inferido por comparación con secuencias normales y subsecuentemente confirmado por cristalografía de Rayos X.²⁹

Las mutaciones en el exón 6 se han relacionado con el sitio de unión al PRPP; un ejemplo puede ser el caso en el cual se cambia una prolina (aminoácido heterocíclico), por una serina (aminoácido hidrofílico), el cual está cerca del sitio de unión del PRPP, produciendo una alteración en la afinidad de la enzima por el sustrato, lo que disminuye la actividad residual de la enzima HGPRT.³⁰

Alteraciones estructurales en la enzima HGPRT han sido descritas; por ejemplo, cuando cambia un aminoácido neutral Glicina (Gly) por un aminoácido con carga como la arginina (Arg). Sin embargo en mutaciones puntuales en las cuales se cambia un aminoácido neutral por otro (Gln → Val), disminuye la actividad enzimática. En algunas mutaciones, es posible predecir un cambio en las estructuras secundarias helice alfa (A) y Beta plegada (B) de la proteína normal.³¹

Hasta el momento se han reportado 300 diferentes mutaciones en el gen *HPRT*, no sólo en los exones sino también en los intrones. En el SLN una misma mutación puede producir fenotipos diferentes.³² Una mutación puntual puede causar un SLN o un fenotipo menos severo, dependiendo del efecto residual de la actividad de la enzima HGPRT.

²⁷SZIBOR, R. X- chromosomal markers: Past, present and future. En: EFSI Genetics1 (2007). P. 93.

²⁸DAVIDSON BL. Et al. Identification of 17 independent mutations responsible for human hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase deficiency. En: Am J Hum Genet 48:1991p. 951.

²⁹B. LAMBERT, S. MARCUS. Pharmacogenetics 1992. p. 329.

³⁰ANTONELLO Cossua, et al. A new point mutation causing deficiency without Lesch–Nyhan disease *Biochimica et Biophysica Acta* 1762 (2006) p. 29.

³¹FUJIMORI S, et al. Identification of a single nucleotide change in a mutant gene for hypoxanthine – guanine phosphoribosyltransferase (*Ann Arbor*). En: Hum Genet 79:1988. p. 39.

³²YASUKAZU Y, Nombra N, Kenichiro Y, Wakamatsu N. Molecular análisis of deficiencias: An update of the spectrum of Asian mutations with novel mutations. En Molecular Genetics and Metabolism. 90 (2006) p. 70.

2.7 CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO

Las mutaciones son heterogéneas, cuando mutaciones puntuales, pequeñas deleciones o inserciones, están dispersas sobre todo el gen *HPRT*; en la Tabla 2 se resumen las diversas clases de mutaciones que han sido reportadas para cada uno de los fenotipos de la deficiencia de HGPRT.

Las determinaciones bioquímicas no se correlacionan totalmente con el fenotipo. En algunos pacientes con deficiencia parcial de HGPRT, puede no ser detectada la actividad residual de la enzima.³³ Existe una mejor correlación entre el genotipo y las manifestaciones clínicas. Fenotipos parciales son usualmente relacionados con mutaciones en las que la proteína mutada puede tener una mínima actividad enzimática.³⁴

El 98% de las mutaciones sin sentido en el SLN están acompañadas de una ausencia de la actividad de la enzima HGPRT. Algunas mutaciones puntuales no afectan el tamaño normal de la proteína, pero tienen cambios críticos en los aminoácidos que alteran la afinidad de la enzima por el sustrato, influyendo sobre la actividad de la enzima y la expresión o la estabilidad de la proteína mutada.³⁵

Los pacientes con deficiencia parcial de HGPRT y que padecen variantes del SLN tienen mutaciones cuyo estado se puede predecir y que permiten alguna actividad residual de la enzima. En estas personas no se observan mutaciones que originan una proteína truncada, deleciones, inserciones o rearrreglos más complejos.³⁶

2.8 DIAGNÓSTICO

Dada la falta de recursos terapéuticos para combatir la sintomatología neurológica, la detección de mujeres portadoras adquiere en este defecto genético una importancia extraordinaria. Las mujeres portadoras son heterocigotas asintomáticas y de acuerdo con la inactivación del cromosoma X, muestran mosaicismo en las células somáticas HGPRT- y HGPRT+. Sin embargo, éste mosaicismo no está presente en todos los tejidos y suele ser imposible diagnosticar el estado de portadora si el estudio se realiza en eritrocitos o linfoblastos. Así, es necesario utilizar fibroblastos o folículos pilosos.³⁷

³³EMMERSON BT. THOMPSON CJ. GUALLACE DC. Partial Deficiency of the Hypoxanthine-guanine Phosphoribosyl transferase: Intermediate Enzyme Deficiency in Heterozygote Red Cells Ann. Intern. Med 1972; 76; p. 285.

³⁴Ibid. p. 286.

³⁵PUIG, J G.et al. The Spectrum of Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl/ transferase () Deficiency: Clinical Experience Based on 22 Patients from 18 Spanish Families. Medicine. 80(2), March 2001. p. 102.

³⁶JINNAH HA, op. cit. p. 1154.

³⁷EMMERSON, BT., Op. cit. 286.

Tabla 2. Clases de mutaciones en la deficiencia de HGPRT

MUTACIONES	SLN	Variantes	Total
Puntual:			
Sustitución	63	52	115
Temprana	23	2	25
Error de splicing	25	6	31
Delección:			
Secuencia codifica	56	5	61
Error Splicing	4	0	4
Inserción:			
Secuencia codifica	18	1	19
Error Splicing.	1	0	1
Otras:			
Duplicación	3	3	6
Sustitución	2	0	2
Doble mutación	0	2	2
Mujeres	5	0	5

Fuente: H. A. Jinnah, L. DE Gregorio, J.C. Harris, W. L. Nyhan and J.P. O'Neill. The spectrum of inherited mutations causing deficiency: 75 new cases and a review of 196 previously reported cases. En: Mutat. Res. 463 (2000). p.319.
 En esta tabla se registran las diferentes mutaciones relacionadas con la deficiencia de HGPRT en el SLN y sus variantes

Las mujeres portadoras no pueden ser detectadas por la sola evaluación bioquímica sino que se debe recurrir al análisis del ADN. 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, una selección celular en la médula ósea destruye aquellas células que no tengan actividad de HGPRT; por esta razón, las células utilizadas para la detección del estado heterocigoto son los fibroblastos y las células de raíz de cabello.³⁸

³⁸BAKAY B. et al. Utilization of purines by an variant in an intelligent, nonmutative patient with features of the Lesch –Nyhan syndrome. En:Pediatr Res. 13:1979. p. 1365.

Se ha demostrado que las raíces de cabello tienen crecimiento clonal; en varios estudios realizados en folículos pilosos de mujeres portadoras del SLN se ha confirmado la presencia de tres tipos:

- Raíces con actividad normal de la enzima.
- Células que no presentan actividad enzimática.
- Células que presentan actividad intermedia de la enzima HGPRT.

Teóricamente, el 50% de los hijos varones de una mujer portadora podrían padecer el defecto enzimático, por lo que el diagnóstico prenatal debería hacerse a las mujeres portadoras embarazadas. Cuando es posible, el estudio de portadoras de la deficiencia de HGPRT se puede llevar a cabo mediante análisis de ADN extraído de cultivos de amniocitos o vellosidades coriónicas, el cual aporta resultados más fiables.³⁹

2.9 TRATAMIENTO

La marcada sobreproducción de ácido úrico en el SLN y sus variantes conducen a una hiperuricemia asociada a riesgo de nefrolitiasis, falla renal, artritis gotosa y tofos. El Alopurinol, inhibe el catabolismo de la xantina y la hipoxantina a ácido úrico por medio de la xantina oxidasa.⁴⁰ La agresividad y autodaño que estos pacientes manifiestan, disminuye si el medio ambiente es adecuado. Por el momento la única ayuda terapéutica que se brinda es odontológica, con el fin de evitar la pérdida de los labios y los dedos.

Sustancias relacionadas con la dopamina se han utilizado para el tratamiento de las manifestaciones neurológicas en el SLN. Sin embargo, los resultados no han sido muy buenos debido a que los síntomas desaparecen por un corto tiempo; por todo lo anterior, la única perspectiva hacia futuro sigue siendo la terapia génica.

³⁹PAGE Th, BAKAU B., NYHAN W L. An Improved Procedure for Detection of Hypoxanthine guanine Phosphoribosyl transferase Heterozygotes. Clin Chem 1982. p.1181.

⁴⁰SMITH, GW, WRIGHT, V. Allopurinol Br J Clin Practice 41: 1987p. 710.

3. METODOLOGÍA

3.1 GRUPO FAMILIAR ESTUDIADO

Se seleccionó una familia que inicialmente fue estudiada con el fin de confirmar el diagnóstico clínico del SLN mediante análisis bioquímico.⁴¹ Este grupo familiar estaba conformado por 5 individuos, dos de ellos afectados, una hermana y sus progenitores, de los cuales a la madre se le definió el estado de portadora. Por lo tanto se planteó la necesidad de identificar la mutación específica sobre el gen *HPRT* que codifica para la enzima HGPRT, con el fin de analizar toda la familia para así poder identificar las posibles portadoras y a través de consejería genética, evitar nuevos casos.⁴² Para este trabajo, se pudo ampliar el grupo a 16 individuos, llegando hasta la cuarta generación. Las relaciones familiares se pueden apreciar en la figura 1; donde 2 de sus integrantes son el *propositus*, III-1 tiene 21 años y III-3 tiene 17. Ambos presentan hiperuricemia, trastornos cognitivos, neurocomportamentales como coreatetosis y automutilación; el resto del grupo está constituido por 6 mujeres y 5 hombres no afectados.

3.2 ESTUDIOS PREVIOS REALIZADOS AL GRUPO FAMILIAR

Al grupo familiar inicial se le realizaron estudios bioquímicos, en los que se evaluó la cinética enzimática de HGPRT en los glóbulos rojos por medio de espectrofotometría. En los resultados donde se registró una ausencia total de la actividad enzimática en los individuos afectados (III-1, III-3) mientras que la hermana III-2 y la madre (II-2) de estos niños presentaron una actividad normal.⁴³

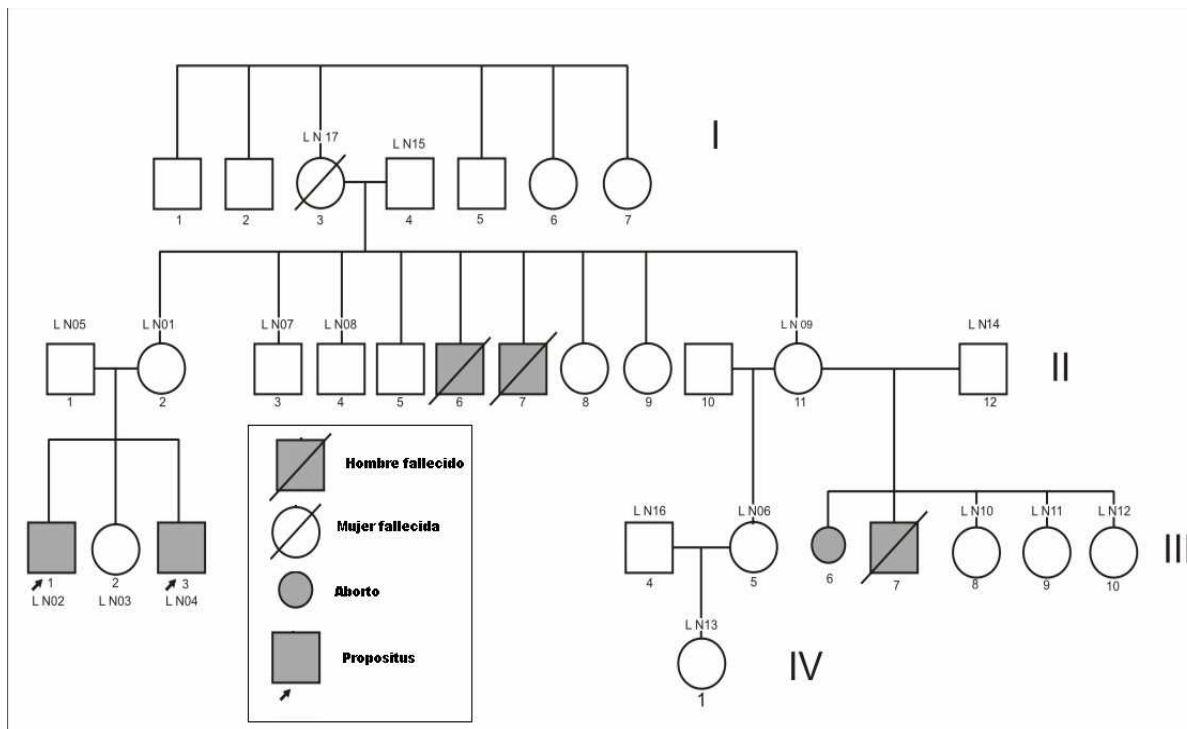
Posteriormente, en un segundo estudio se analizaron las células de raíz de cabello como fuente de la enzima, los productos se incuban con hipoxantina ^{-C14} y Adenina ^{-C14} y posteriormente son separados por medio de cromatografía en capa fina y se visualizan por autoradiografía. Con esta técnica radioquímica fué posible confirmar la ausencia total de la actividad enzimática en los niños afectados (III-1, III-3). Se pudo observar en la madre de los afectados (II-2) una deficiencia parcial en la actividad HGPRT, evidenciada por una buena actividad en algunas raíces del cabello y muy baja en otras. Estos resultados permitieron concluir un estado de heterocigosidad. Sin embargo, no fué posible determinar si la hermana de los afectados (III-2) era portadora debido a que por la fragilidad del folículo piloso, fué imposible extraerle las raíces del cabello.

⁴¹BARRERA, A, RODRÍGUEZ, F. y GÓMEZ, A. Aspectos clínicos y bioquímicos del síndrome de Lesch Nyhan. Acta medica colombiana 1992. ; 17: 447.

⁴²RODRÍGUEZ, F, Op. Cit. p. 32.

⁴⁴BARRERA, A, RODRÍGUEZ, F. y GÓMEZ, A. Op. Cit. p. 449.

Figura 1. Árbol genealógico de la familia con el SLN.



Fuente: elaborado por el autor.

Árbol genealógico de la familia en estudio hasta la cuarta generación. Cada persona se identificó con un código LN (Lesch-Nyhan) acompañado de un número arábigo. Los hombres se identifican con cuadros y las mujeres con círcos. Las flechas en los cuadros de LN02 y LN04 corresponden al propositus u objeto de este trabajo.

3.3 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander con el código # 0604. Este fue un estudio con riesgo mínimo, de acuerdo a la resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud, que establece las normas éticas para la investigación sobre seres humanos en Colombia.

3.4 TOMA DE MUESTRA

Antes de realizar la toma de muestra, se les explicó a cada uno de los pacientes cuál era su participación en este proyecto, y se les solicitó el consentimiento informado el cual después de leerlo lo aprobaron por escrito (Anexo A). Se procedió a realizar una venopunción a cada uno de los integrantes de esta familia con 2 tubos vacutainer con EDTA, al igual que se tomó una mancha de sangre en papel de filtro.

3.5 EXTRACCIÓN DEL ADN

La extracción del ADN se llevó a cabo por el método de Salting-out descrito por Miller et al. (1988), se tomaron 3 ml de sangre anticoagulada con EDTA y se realizó la lisis celular para obtener el ADN genómico.

La extracción de ADN se realizó por el método de la resina de Chelex al 5%; para ello se tomaron aproximadamente unos 3 mm del papel impregnado con la mancha de sangre, se picó finamente y se depositó en un eppendorff de 1,5 ml y se agregó 1 ml de agua. Se agitó vigorosamente cada 10 min hasta que el papel filtro se tornó blanco. Luego se centrifugó a 16000 rpm por 5 min, se descartaron 850 µl del sobrenadante y agregaron 150 µl al 5% de resina de chelex y se llevaron a 56 °C por 30 min. Después se colocó a 100 °C por 8 min, se agitó y se centrifugó a 16000 rpm. por 5 min. El sobrenadante se transfirió a otro tubo de microcentrifuga y se conservó a – 20 °C hasta su uso. (Promega, GenePrint PowerPlex 16 System. Technical Manual, USA. 2000)

3.6. ANÁLISIS DEL EXÓN 3 del GEN *HPRT*

3.6.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Antes de realizar la PCR se realizó el diseño de primers, la secuencia se observa en la tabla 3. La PCR del exón 3 con un volumen final de 50 µl, se realizó siguiendo el listado de reactivos de la tabla 4 y el programa del termociclador en la tabla 5. Posteriormente, se realizó una electroforesis manual y se utilizó como soporte 1.5 % agarosa, con unas condiciones de corrido de 85 V por 30 min. Finalmente se observó el amplificado previsto de 288 pb en un transiluminador.

Tabla 3. Diseño de primers de los exones 3 y 6 del gen *HPRT*

Exón	Primer	Secuencia de Nucleótido	Tm	Observaciones
EXÓN 3 (660pb)	Forward	5' -TTAAATTCCTGATTTTATTTCTGTAGG-3'	57.66	PAIR ANY COMPL: 5.00, PAIR 3' COMPL: 2.00
	Reverse	5' -TGGTTTGCAGAGATTCAAAGAA-3'	59.86	
EXÓN 6 (540pb)	Forward	5' -CATGGGGGTTTTGGTACTTT-3'	58.67	PAIR ANY COMPL: 5.00, PAIR 3' COMPL: 3.00
	Reverse	5' -CCCCCTTCAAATGAGGAAA-3'	59.85	

Fuente: elaborado por el autor.

Tm: Temperatura media ó Temperatura de fusión.

En esta tabla se aprecia el diseño de los primers para los diferentes exones del gen *HPRT* por medio del Programa PRIMER 3 software (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). (v.0.3.0) Pick primers from a DNA sequence

Tabla 4. Listado de reactivos, PCR exones 3 y 6, gen *HPRT*

[] Inicial	Cantidad por muestra (µl)	[] Final
H2O:	17.8	
Buffer: 10 X	5	1 x
MgCl ₂ : 25 mM	5	2.5 mM
dNTPs: 10 mM	0.5 c/u	100 µM
Taq: 500U	0.2	0.5 U
Primer: 5 µM	4 F	400 nM
	4 R	
Mix	38	
ADN	12	
TOTAL	50	

Fuente: elaborado por el autor

[]: Concentración

F: Forward. R: Reverse.

Se observan las cantidades y las concentraciones de los reactivos necesarios para la amplificación ó PCR de los exones 3 y 6 del gen *HPRT*.

Tabla 5. Programa del Termociclador, PCR exones 3 y 6, gen *HPRT*

Pasos	Temperatura °C	Tiempo min
Desnaturalización inicial	95	3
Hibridación:	94	1
35 ciclos	55	1
	72	1
Extensión	72	10

Fuente: elaborado por el autor.

Se observan las condiciones del termociclador para la PCR de los Exones 3 y 6 del gen *HPRT*

3.6.2 Digestión del Exón 3 del gen *HPRT* con la enzima Pvu II. El amplificado del exón 3 del gen *HPRT*, fué digerido con Pvu II. El gen *HPRT* mutado debe liberar dos fragmentos de 164 pb y el otro a 124 pb. Si no hay mutación, se conserva intacto el amplificado de 288 pb. Para realizar la digestión se tomaron 2µl de 10X Buffer, 2,5 µl de agua, 15 µl del amplificado y 0,5 µl de la enzima (10 U/µl) para un volumen final de 20 µl. Las balas se incubaron a 37 °C por 16 horas.

3.6.3 Electroforesis. El producto de la digestión se separó en un gel de 2.5% agarosa en buffer 1 X TBE, a 45 V por 90 min. El gel se visualizó en un transiluminador (Fotodyne) y se fotografió con una cámara digital.

3.7 ANÁLISIS DEL EXÓN 6 DEL GEN *HPRT*

3.7.1 PCR. Antes de realizar la PCR se realizó el diseño de primers, la secuencia se observa en la tabla 3. Se realizó la PCR del exón 6 en un volumen final de 50 µl y siguiendo el listado de reactivos de la tabla 4 y el programa del termociclador en la tabla 5. Posteriormente se realizó una electroforesis manual, y se utilizó como soporte agarosa al 1.5 %, con unas condiciones de corrido de 85 V por 30 min.

3.7.2 Digestión del Exón 6 del gen *HPRT* con la enzima Bam HI. El amplificado del exón 6 del gen *HPRT* fué digerido con Bam HI⁴⁴. El gen *HPRT* mutado debe liberar dos fragmentos de 111 pb y otro a 88 pb. Si no hay mutación, se conserva intacto el amplificado de 199 pb. Para realizar la digestión se tomaron 2 µl de 10X Buffer 2,4 µl de agua, 15 µl del amplificado y 0,6 µl de la enzima (10 U/µl) para un volumen final de 20 µl. Las balas se incubaron a 37 °C por 16 horas.

3.7.3 Electroforesis. El producto de la digestión se separó en un gel 2.5% de agarosa en buffer 1 X TBE, a 45 V por 90 min. El gel se visualizó en un transiluminador (Fotodyne) y se fotografió con una cámara digital.

3.8 ANÁLISIS INTRON 3 GEN *HPRT*

3.8.1 PCR. Se realizó una mezcla de primers cada uno con una concentración de 2 µM excepto DXS101 cuya concentración fue de 4 µM, la cantidad para cada muestra fue la siguiente: H₂O: 3 µl, Primer mix: 1 µl, 2 X master mix 5 µl, para un total de 9 µl de mix a la cual se le agregó 1 µl de ADN, el cual se adiciona a una concentración de 1ng/µl en volumen final de 10 µl. Las condiciones de amplificación se observan en la tabla 6.

TABLA 6. Programación del Termociclador para el STR *HPRTB*

Número de ciclos	Temperatura °C	Tiempo
1(inicio)	95	15 min
	94	30 s
10 X	60	90 s
	72	60 s
	94	30 s
20 X	58	90 s
	72	60 s
1(Extensión final)	60	60 min

Fuente: GOMEZ I, PRINZ M, PEREIRA R, MEYERS C, AMORIM A, CARRACEDO A, GUSMAO L. Genetic analysis of three US popation groups using an X-chromosomal STR decaplex. *En Int J Legal Med* DOI 10.1007/s00414-006-0146-2. 2006. Se relacionan las condiciones de tiempo y temperatura para realizar la PCR del STR *HPRTB* del Cromosoma X.

3.8.2 Electroforesis Capilar STR *HPRTB*

⁴⁴ AL EDWARDS, VOSS, H. RICE, P. CIVITELLO, A. STEGEMANN, J. et al. Automated DNA Sequencing of the Human locus. *En Genomics* 6, 593-608. 1990. p. 603.

Los amplicados del STR *HPRTB* se determinaron en un equipo de electroforesis capilar ABI PRISM 310, Applied Biosystems Genetic analyzer. Los parámetros de montaje y electroforesis se describen en las tablas 7 y 8 respectivamente. Los resultados se analizaron con las aplicaciones Genescan 2.1 y Genotyper.

Tabla 7. Montaje Electroforesis capilar STR *HPRTB* ABI PRISM 310

Reactivos	Cantidad (μl)
Formamida	13,4
GSRox 500	0,6
Total	14,0 + 1 de amplicado

Fuente: GOMEZ I, PRINZ M, PEREIRA R, MEYERS C, AMORIM A, CARRACEDO A, GUSMAO L. Genetic analysis of three US population groups using an X-chromosomal STR decaplex. *En Int J Legal Med* DOI 10.1007/s00414-006-0146-2. 2006. Se registran los reactivos, con las cantidades necesarias para realizar el montaje de la electroforesis capilar de los amplicados del STR B En el analizador genético ABI PRISM 310.

Tabla 8. Parámetros de la electroforesis capilar ABI PRISM 310 STR *HPRTB*:

Voltaje:	15000 V.	Temperature:	60 °C
Inj duration:	6 s	Laser Power:	9 mWatts.
Size standard:	GS ROX 500	Parameters:	Profiler.
Mode file:	GSSTR POP4(1ml)F	Matrix File:	Matrix COF4.
Tiempo:	30 min.		

Fuente: Manual del equipo ABI PRISM 310 (GeneScan Análisis Software) Applied Biosystems.

Se observan los parámetros de la configuración que arroja el equipo en la corrida de cada una de las muestras cuando se realiza la electroforesis capilar en el analizador genético ABI PRISM 310.

4. RESULTADOS

4.1 ESTUDIO DE LOS EXONES 3 Y 6 DEL GEN *HPRT*

El exón 3 tiene 183 pb y va desde la posición 16603 hasta 16787. Se seleccionó debido a que es uno de los exones donde más mutaciones se han reportado, por los llamados puntos calientes (región con una alta frecuencia de mutación).^{45,46,47} El exón 6, es de menor tamaño; tiene 82 pb y va desde la posición 34938 a la 35020. También fue escogido para ser analizado, porque allí se ha reportado el sitio de unión al (PRPP), el cual se encuentra entre los codones (130 al 141)⁴⁸. Ésto hace que sea una región altamente conservada y cualquier mutación en este sitio cambia la estructura de la proteína y por lo tanto disminuye la afinidad por el PRPP.^{49,50}

- **Diseño de primers de los exones 3 y 6 del gen *HPRT*.** A partir de la secuencia del gen *HPRT*, (M26434),⁵¹ se realizó el diseño de nuevos primers para los exones 3 y 6 con el programa PRIMER 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3>). Para el exón 3, se realizó el diseño con el objetivo de obtener un amplificado más pequeño que lo propuesto por Gibbs et al (1990). Para esto, se seleccionó la secuencia que va de la posición 16441 a la 17101, (660 pb) y Primer 3 arrojó un producto de 288 pb, donde el primer reverse fue de 27 pb y el forward de 22 pb (anexo B). Para el Exón 6, se tomó desde la posición 34680 a 35220 (540 pb) y un producto a amplificar de 199 pb, donde el primer reverse fué de 20 pb y el forward de 19 pb, (anexo C).

4.2 BUSQUEDA DE MUTACIONES EN EL EXÓN 3 DEL GEN *HPRT*

Se realizó una PCR al exón 3 del gen *HPRT* de los miembros de la familia afectada por el SLN. El amplificado corresponde a una banda de 288 pb (figura 2). Los amplificados del exón 3 se digirieron con la enzima de restricción Pvu II, cuyo sitio de restricción está

⁴⁵JINNAH, H.A. Op. cit. p. 309.

⁴⁶YASUKAZU, Yamada, Op. cit. p. 70.

⁴⁷BOUWENS-ROMBOUTS, A.G. y Col: Identification of two new nucleotide mutations (*HPRT* Utrecht and *HPRT* Madrid) in exon 3 of the human hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (*HPRT*) gene. Hum. Genet. 91: 451,1993.

⁴⁸SHANI, E. BROMBERG, Hirsch, J. FEINSTEIN, S. A novel point mutation (I137T) in the conserved 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphatebinding motif of hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (*HPRT*Jerusalem) in a variant of Lesch–Nyhan syndrome Molecular Genetics and Metabolism 78 (2003)158.

⁴⁹FUJIMORI S, TAGAYA T, KAMATANI N, AKAOKA I: A germ line mutation within the coding sequence for the putative 5-phosphoribosyl-1 pyrophosphate binding site of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (*HPRT*) in a Lesch – Nyhan patient : Misense mutations within a functionally important region probably cause disease. Hum Genet 90: 385,1992.

⁵⁰BOYD, M. W.G.Lanyon, J.M. Connor, Screening for molecular pathologies in Lesch–Nyhan syndrome, Hum.Mutat. 2(1993) 127.

⁵¹ ARGOS, P. HANEI,M. WILSON,J.M. and KELLEY,W.N. The National Center for Biotechnology Information (NCBI) Nucleotide [database on internet] [En: M26434_ Reports Human hypoxanthin...[gi:184369] Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank, 2001.

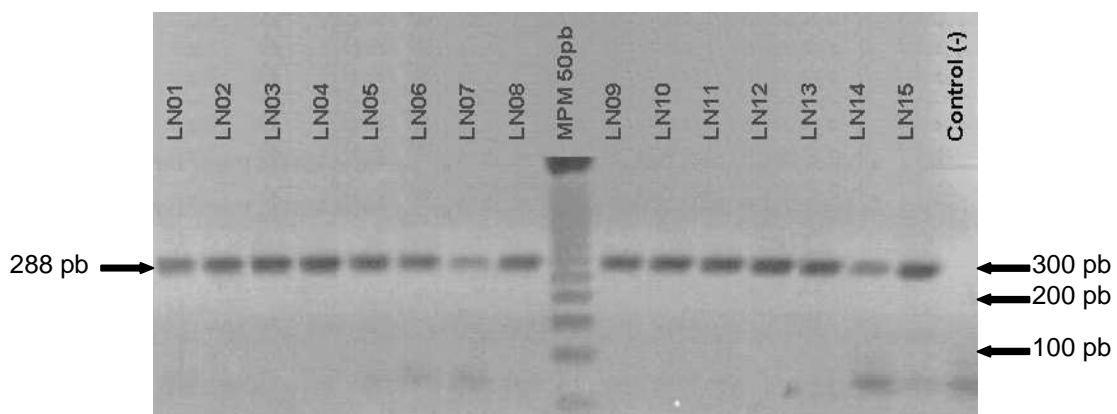
en la posición 16701 pb y la secuencia es CTGCTG.⁵² Se observó que en ningún caso hubo la aparición esperada de 164 pb y 124 pb (Figura 3). Este resultado indicó que ninguno de los miembros de la familia contiene la mutación.

4.3 BUSQUEDA DE MUTACIONES EN EL EXÓN 6 DEL GEN *HPRT*

Se realizó una PCR al exón 6 del gen *HPRT* a los miembros de la familia afectada por el SLN. El producto corresponde a una banda de 199 pb (figura 4). Los amplificados del exón 6 se digirieron con la enzima de restricción Bam HI, cuyo sitio de restricción está en la posición 34980 pb y la secuencia es CCTTGG.⁵³

Se observó que en ningún caso hubo la aparición esperada de 164 pb y 124 pb (Figura 5). Este resultado indicó que ninguno de los miembros de la familia contiene la mutación.

Figura 2. Amplificación del Exón 3 del gen *HPRT*



Fuente: elaborado por el autor.

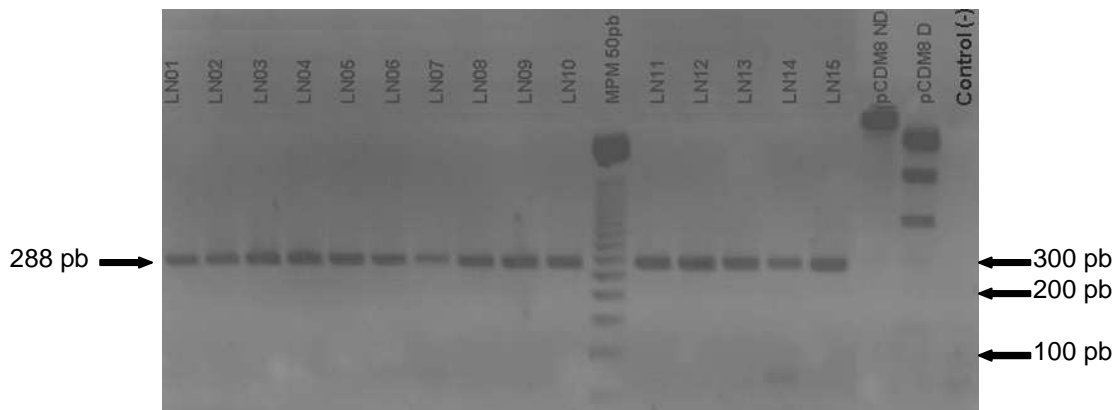
LN: Lesch Nyhan.

Se observa la amplificación del exón 3 del gen *HPRT*, que presenta una banda a 288pb.

⁵² Yasukazu Y, Haruko G, Kaoru S, Ritsuko A, Nobuaki O, Molecular analysis of five independent Japanese mutant genes responsible for hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT) deficiency. Human genetics 1992. 90. p.382.

⁵³ AL EDWARDS, VOSS, H. RICE, P. CIVITELLO, A. STEGEMANN, J. et al. Automated DNA Sequencing of the Human locus. En: Genomics 6, 1990. p. 603.

Figura 3. Digestión Exón 3 con PvuII.



Fuente: elaborado por el autor.

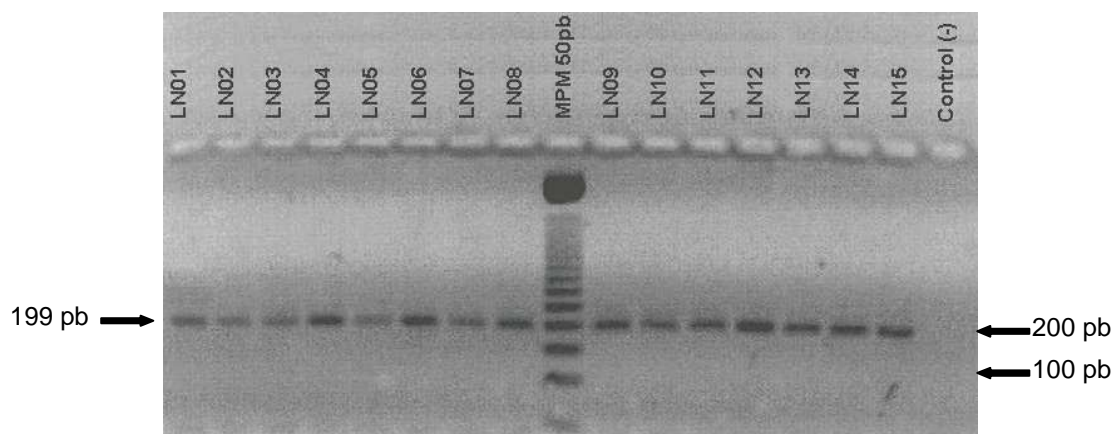
LN: Lesch Nyhan.

PcDM8 ND: Plasmido No digerido

pCDM8 D: Plasmido digerido

Se observa la digestión del exón 3 del gen *HPRT* con la enzima de restricción PvuII, que presenta una banda a 288pb, lo cual indica que la enzima no encontró el sitio de restricción debido a que no presenta la mutación.

Figura 4. Amplificación del Exón 6 del gen *HPRT*



Fuente: elaborado por el autor.

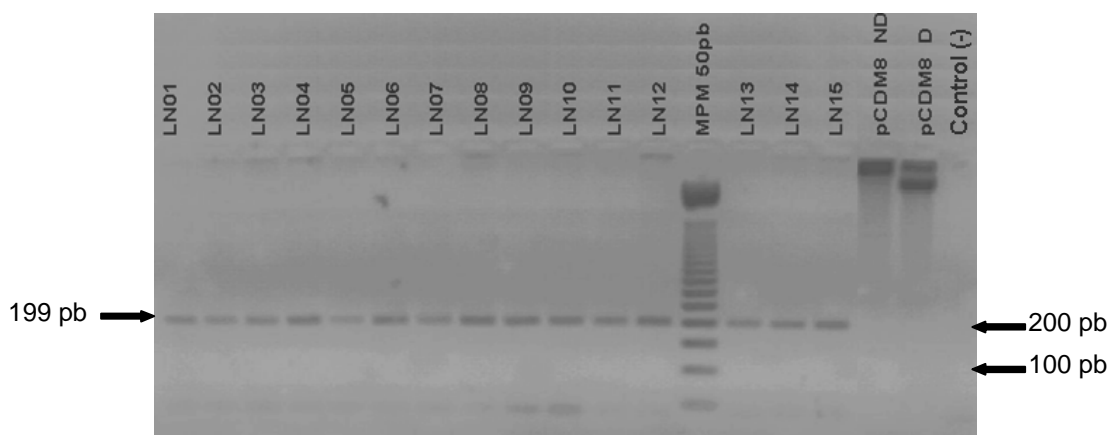
LN: Lesch Nyhan.

PcDM8 ND: Plasmido No digerido

PcDM8 D: Plasmido digerido

Se observa la amplificación del exon 6 del gen *HPRT*, el cual presenta una banda a 199pb.

Figura 5. Digeridos del exón 6 con Bam HI.



Fuente: elaborado por el autor.

LN: Lesch Nyhan.

PcDM8 ND: Plásmido No digerido

PcDM8 D: Plásmido digerido

Se observa la digestión del Exon 6 del gen *HPRT*, con la enzima de restricción Bam HI, se observa una banda a 199pb, lo cual indica que la enzima no encontró el sitio de la mutación, por lo tanto se observa la misma banda de la amplificación.

4.4 SECUENCIACIÓN DE LOS PRODUCTOS PCR DE LOS EXONES 3 Y 6 DEL GEN *HPRT*

La secuenciación de los amplificados se realizó debido a que no se encontró ninguna mutación después de digerir los amplificados de los exones 3 y 6 del gen con las enzimas de restricción Pvu II y Bam HI respectivamente.

Los productos de PCR, y fueron enviados al Instituto de Inmunología y Patología Molecular de la Universidad de Porto, Portugal (IPATIMUP) para realizar la secuenciación automática en un analizador genético ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems). Se analizaron las secuencias Forward y Reverse de los Exones 3 y 6 de LN02 y LN04 (afectados), LN07 y LN08 (no afectados). No se realizó la secuenciación de los amplificados de todos los miembros de la familia debido a que no se encontraron diferencias entre las primeras secuencias de los individuos sanos y los individuos afectados.

En los anexos del D al G se pueden observar la secuencia del exón 3 de algunos de los miembros de esta familia. En los anexos H, I se pueden observar la secuencia del exón 6. El análisis de las secuencias de los exones 3 y 6 en tales individuos no mostró ninguna diferencia entre los afectados y sanos.

4.5 ANÁLISIS DEL INTRÓN 3 DEL GEN *HPRT*

En el intrón 3 del gen *HPRT* se encuentran algunos microsatélites entre los cuales se amplificó por PCR el STR ubicado en la posición 22928 (*HPRTB*)⁵⁴. Adicionalmente, se realizó PCR multiplex, para confirmar las relaciones de parentesco en esta familia (figura 6, tabla 10); para ello se amplificaron 9 marcadores del cromosoma X con el kit de QUIAGEN. (Anexo J)

Los primers del STR *HPRTB* están marcados con el fluorocromo 6 FAM, en el extremo 5' y son de tipo tetranucleótido con una secuencia (TCTA)ⁿ para el forward y (AGAT)ⁿ para el reverse. El número de alelos va de 9 a 17 y tienen un peso de 271 a 303 pb, como se registra en el (Anexo K).

4. 5.1 PCR DEL INTRÓN 3 DEL GEN *HPRT*

En el anexo J se pueden observar los genotipos de algunos de los integrantes de la familia en estudio tipificados por 10 marcadores del cromosoma X, de los cuales el más relevante para ésta investigación es el *HPRTB*. En la figura 7 al igual que en la tabla 10 se pueden apreciar alelos del STR *HPRTB* para cada uno de ellos.

4.5.2. ANÁLISIS PREDICTIVO DEL RIESGO DE TRANSMISIÓN DE LA MUTACION CON EL STR *HPRTB*

EL SLN se da por vía materna, si una mujer es portadora, tiene un 50% de probabilidad de tener hijos varones afectados y en el caso de las mujeres el 50% serán sanas y el 50% portadoras. El genotipo de LN17 se puede deducir de sus hijos, que son hombres sanos y algunas mujeres portadoras. Por lo tanto muestra dos alelos 14, donde una copia porta la mutación y la otra no. Analizando el árbol genealógico (figura 6) y teniendo presente ésta premisa y los genotipos de cada uno de las personas podemos deducir el porcentaje de la probabilidad de transmisión de la mutación a la descendencia como se observa en la tabla 9.

⁵⁴ MANSFIELD E S, Blasband, Kronick M N, Wrabetz, Kaplan P, Rappaport E. Fluorescent approaches to diagnosis of Lesch-Nyhan syndrome and quantitative analysis of carrier status. En: Molecular and Celular probes(1993). 311.

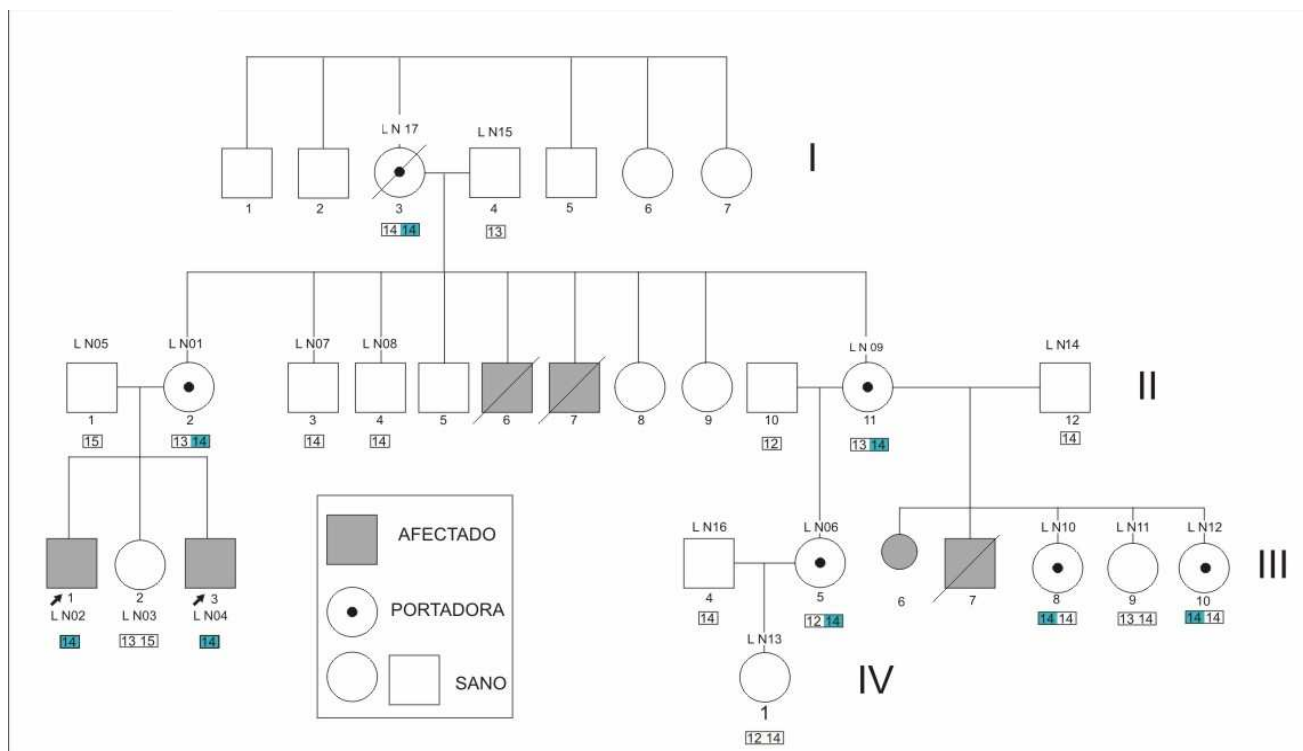
Tabla 9. Probabilidad de Trasmisión de la mutación de las mujeres de la familia estudiada.

Código	Condición	Genotipos	Aporte progenitores		Probabilidad
			MADRE	PADRE	%
LN03	SANA	13/15	13/14	15	0
LN06	PORTADORA	12/14	13/14	12	50
LN10	PORTADORA	14/14	13/14	14	50
LN11	SANA	13/14	13/14	14	0
LN12	PORTADORA	14/14	13/14	14	50
LN13	SANA	12/14	12/14	14	0

Fuente: elaborado por el autor.

Se aprecia el genotipo, la condición genética de cada una de las mujeres de la familia estudiada, con el STR *HPRTB* del cromosoma X. También se establece el % de probabilidad de transmisión de la mutación a la descendencia.

Figura 6. Árbol genealógico con los genotipos del STR del Cromosoma X: *HPRTB*



Fuente: elaborado por el autor.

Se observa el pedigree de la familia afectada por el SLN, los círculos corresponde a las mujeres y los cuadrados a los hombres, los propositos o probandos de este estudios corresponden a LN02 y LN04 y están señalados con una flecha. Las mujeres cuyo círculo en su interior lleva un punto son las portadoras para ésta enfermedad. También se puede observar la tipificación de los pacientes con el STR *HPRTB*, donde los alelos marcados con azul corresponden al alelo portador de la enfermedad.

Tabla 10. Relaciones de parentesco familia Colombiana afectada por SLN

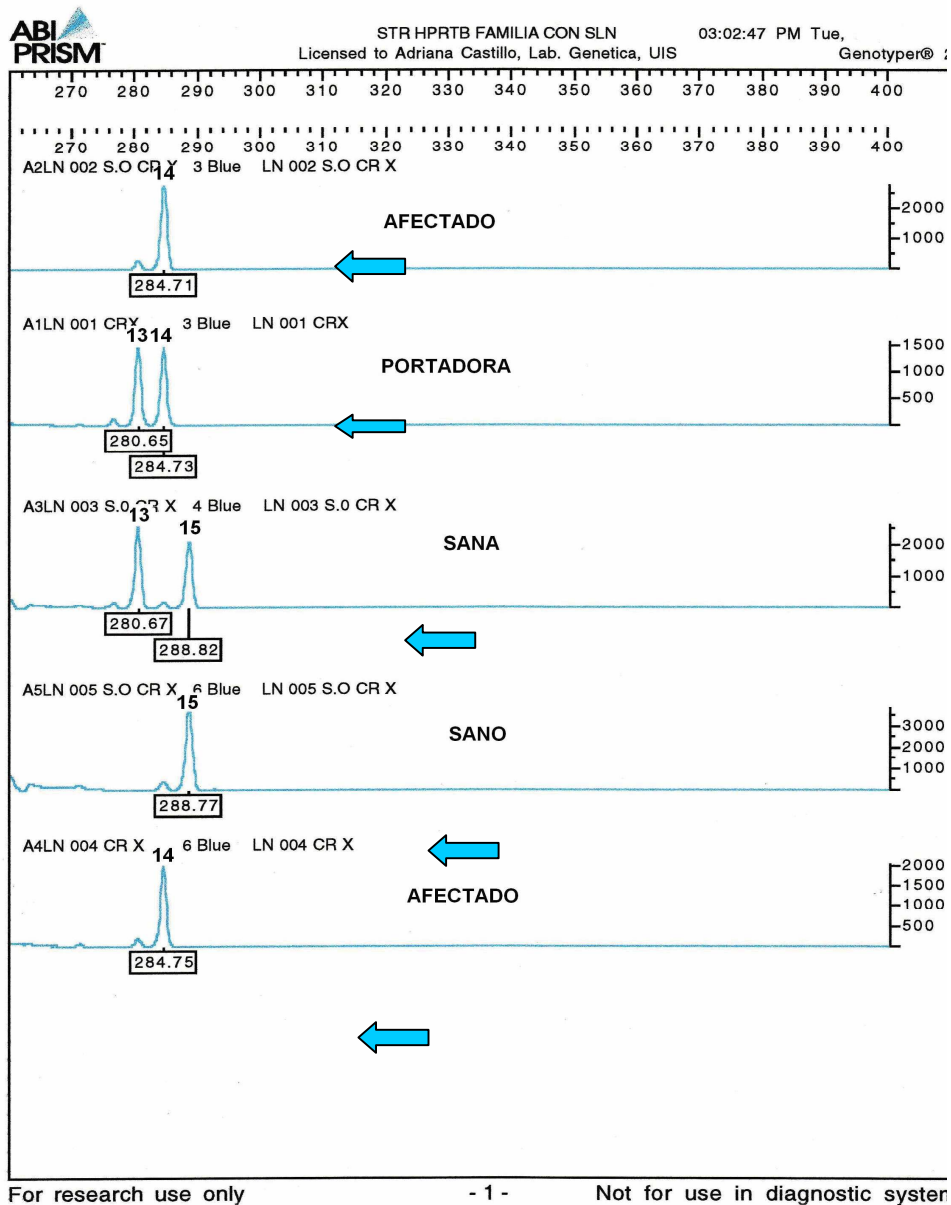
CODIGO	STR	PARENTESCO	SEXO
LN01	HPRTB 13/14	Madre de los afectados : LN02, LN04 y Madre de LN 03 y Esposa de LN05.	X/X
LN02	14	Afectado hijo de LN01 y LN05 y hermano LN03 y LN04	X/Y
LN03	13/15	Hermana de los afectados e hija de LN01 y LN05	X/X
LN04	14	Afectado, hijo de LN01 y LN05 y hermano LN03 y LN02	X/Y
LN05	15	Padre de afectados y de LN 03 y Esposo de LN01	X/Y
LN06	12/14	Prima de los afectados e hija de LN09 y LN16 Padre desconocido y madre de LN13	X/X
LN07	14	Tío de los afectados Hermano de LN01, LN08 y LN09	X/Y
LN08	14	Tío de los afectados Hermano LN 01 LN07 y LN09	X/Y
LN09	13/14	Tía de los afectados y Hermana de LN01, LN07 y LN08 Madre de LN06, LN10, LN11, LN12 y esposa de LN14	X/X
LN10	14/14	Prima de los afectados e hija de LN09 y LN14	X/X
LN11	13/14	Prima de los afectados e hija de LN09 y LN14	X/X
LN12	14/14	Prima de los afectados e hija de LN09 y LN14	X/X
LN13	12/14	Hija de LN06 y LN16	X/X
LN14	14/14	Esposo LNO9 y padre de LN 10, LN11, y LN12	X/Y
LN15	13	Abuelo de los afectados Padre de LN01, LN07, LN08, y LN09	X/Y
LN 16	14	Padre de LN13	X/Y
LN17	14/14	Abuela de los afectados, Madre de de LN01, LN07, LN08, y LN09	X/X

Fuente: elaborado por el autor.

LN: Lesch Nyhan.

Se observan las relaciones de parentesco entre las personas que integran la familia con el SLN, también se puede apreciar la tipificación de cada uno de ellos con el marcador del cromosoma X, el STR B, donde algunos alelos están remarcados en azul, los cuales corresponden al alelo portador de la enfermedad.

Figura 7. Electroferogramas de STR del cromosoma X: HPRTB



Fuente: elaborado por el autor.
 LN: Lesch-Nyhan.

Se observan los electroferogramas de la tipificación del STR *HPRTB* del cromosoma X, marcado con fluorocromo azul para LN01, LN02, LN03, LN04, LN05. LN02 y LN04 están afectados por SLN y presentan el alelo 14. LN03 es hermana de ellos y heredó de sus padres LN01 y LN05, los alelos 13/15, por lo tanto es sana para ésta enfermedad.

5. DISCUSIÓN

5.1 INTEGRIDAD DE LOS EXONES 3 Y 6 DEL GEN *HPRT*

El gen *HPRT* se caracteriza por tener diferentes mutaciones que originan un espectro variado de manifestaciones clínicas. En el exón 3 se ha encontrado un sitio de *hot spot* o punto caliente de alta inestabilidad, que presenta muchas mutaciones como lo han reportado los estudios de Jinnah et al.,⁵⁵ Puig, J G et al,⁵⁶ Yasukazu et al.,⁵⁷ Torres R.⁵⁸ y Jinnah, H.⁵⁹ Por lo anterior, se eligió éste exón; sin embargo, en este trabajo no se encontró ninguna mutación en el exón 3 en ninguno de los miembros de esta familia con SLN.

Para el exón 6, los estudios han reportado mutaciones relacionadas con el sitio de unión al PRPP, el cual se encuentra entre los codones 130 a 141. Según Zoref et al.,⁶⁰ una sustitución 137T de este exón originó el SLN, debido a un cambio estructural de la enzima que disminuyó la afinidad por el PRPP. Otros trabajos arrojan resultados del mismo tipo (Cossu et y Fujimori S.^{61,62,63}). En este trabajo también se analizó mediante PCR y secuenciación del exón 6 del gen *HPRT* a todos los integrantes de la familia en estudio y tampoco se encontró ninguna mutación. Se concluyó entonces que la mutación que afecta a la familia en estudio se encuentra en otro exón o probablemente en algunos de los intrones del gen *HPRT* como lo reportado por Yasukazu, Y. et al 2007⁶⁴ y Jinnah, H. et al 2000.^{65,66} y en estudios realizados por Gregorio, L.⁶⁷ M. Boyd,⁶⁸ L. Davidson.⁶⁹

⁵⁵ JINNAH, H.A. et al. Op. cit. p. 312-316.

⁵⁶ PUIG, J G.; et. al. The Spectrum of Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase () Deficiency: Clinical Experience Based on 22 Patients from 18 Spanish Families. *Medicine*. 80(2): March 2001. p.105.

⁵⁷ YASUKAZU, Op. Cit. p. 74.

⁵⁸ TORRES, R. et al. Estudio Bioquímico, enzimático y genético de la deficiencia de hipóxantina guanina fosforibosiltransferasa (). *REV NEUROL*, 1998. p. 357.

⁵⁹ JINNAH HA, Op. Cit. p. 1155-1157.

⁶⁰ SHANI, E. Op. Cit. p. 161.

⁶¹ SNYDER FF, Chudley AE, MacLeod PM. Carter RJ, Fung E, Lowe JK: Partial deficiency of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase with reduced affinity for PP-ribose -P in four related males with gout. *Hum Genet* 67: |8. 1984.

⁶² FUJIMORI, Op. Cit. p. 385,1992.

⁶³ YASUKAZU, Op. Cit. p. 76.

⁶⁴ *Ibid.* p. 70-76.

⁶⁵ JINNAH HA, Op. Cit. p. 1153-60309.

⁶⁶ *Ibid.* p. 1156.

⁶⁷ DE GREGORIOA, Laura et al. Lesch-Nyhan disease in a female with a clinically normal monozygotic twin. University of California San Diego. *En: Molecular Genetics and Metabolism* 85:2005. p.71.

⁶⁸ BOYD, M. Op. Cit. p. 127.

⁶⁹ DAVIDSON, B.L. et al. Identification of 17 independent mutations responsible for human hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase () deficiency. *En: Am .J. Hum. Genet.* 48(1991) p. 951.

5.2 PROBABLE CASO DE LIGAMIENTO ENTE EL SLN Y EL MARCADOR *HPRTB*.

Las mujeres requieren especial atención por tener la posibilidad de ser portadoras. Para definir esa condición, se tipificó el STR *HPRTB* ubicado en el intrón 3 del gen *HPRT* a cada uno de los integrantes de esta familia. Se estableció el estado de portadora o no portadora en cada una de las mujeres, debido a que se conoce de manera precisa la localización cromosómica del locus implicado.

Dicha estrategia consistió en estudiar, en la familia del propositus, la segregación conjunta de la enfermedad y las secuencias polimórficas físicamente próximas (ligadas) al locus de la misma. El locus *HPRTB* se encuentra íntimamente ligado a la enfermedad, por lo que se asume que la frecuencia de recombinación es prácticamente igual a 0,⁷⁰ debido a que está dentro del gen *HPRT* (Xq26, Intrón 3, base 22928). Por lo tanto no se calculó distancia génica y la probabilidad de recombinación intragénica es tan probable como una nueva mutación que pueda conducir a ésta o a otra enfermedad.

El STR *HPRTB* (TCTA)ⁿ presentó genotipos informativos en la mayoría de los miembros de la familia debido a su condición heterocigota, permitiendo ver de manera clara cuál era la copia del cromosoma X aportada por cada uno de los progenitores.

El resultado de la tipificación con el STR *HPRTB* en los varones afectados con el SLN (LN02, LN04), muestra que un alelo 14 se está segregando con la enfermedad. Los resultados también permitieron inferir una condición homocigota del genotipo para éste alelo en la abuela de los afectados (LN17), y por lo tanto se puede concluir que una copia del alelo 14 del STR *HPRTB* es normal y la otra mutante. Sus hijos varones sanos (LN07, LN08) heredaron el alelo 14 normal. En cambio, una de sus hijas (LN01) a quién ya se le había establecido su estado de portadora mediante estudios bioquímicos, presenta el genotipo 13/14, con el alelo 14 mutante, y sus dos hijos varones afectados (LN02, LN04) heredaron el alelo 14 mutante por lo que se deduce que es el que se está segregando con la enfermedad.

Por información obtenida directamente de algunos integrantes de ésta familia, se conoció que los 2 hijos varones II -6, II -7 de LN17 (figura 6) presentaban el SLN, y la hija II-11, tuvo dos hijos varones también afectados por la enfermedad III-6, III-7 (información obtenida de LN09) por lo tanto la mutación que portaba el alelo 14 en LN01 no fué debida a una mutación *de novo*, sino que fue heredada de su progenitora LN17.

La marcada heterogeneidad genética en la deficiencia de HGPRT es bien conocida. Diferentes mutaciones en el locus como delecciones, inserciones, duplicaciones, splicing

⁷⁰PALAZÓN, J. El diagnóstico de las enfermedades hereditarias [artículo en internet] http://web.udl.es/usuarios/e4650869/receca/pdf/DiagGenet_JFP_2001.pdf [consta: Agosto 3 2007].

anormal y mutaciones puntuales tanto en exones como en intrones han sido identificadas,^{71,72} reportándose hasta el momento más de 300 mutaciones.⁷³ En contraste con el SLN otras enfermedades genéticas son generadas solo por una mutación o un pequeño número de éstas, por todo lo anterior el abordaje en el SLN es muy complejo y costoso. Además no existe un tratamiento efectivo para los pacientes afectados, por lo tanto lo más importante es la prevención de ésta enfermedad a través de la consejería genética.

⁷¹JINNAH HA, Op. Cit. p. 326.

⁷²Ibid. p. 1156.

⁷³YASUKAZU, Op. Cit. p. 74.

6. CONCLUSIONES

- ❖ No se encontraron mutaciones en los Exones 3 y 6 del gen *HPRT* analizado en los miembros de esta familia colombiana afectada por el SLN.
- ❖ El STR del Cromosoma X (*HPRTB*), localizado en el intrón 3 del gen *HPRT* permitió establecer el estado de portadora o no del alelo mutante en las mujeres de la familia afectada por el SLN.
- ❖ La detección de portadoras es una herramienta valiosa en esta enfermedad en la cuál no existe un tratamiento efectivo y por tanto la consejería genética puede contribuir a disminuir la aparición de nuevos casos.
- ❖ La mutación que originó el SLN en esta familia, se encuentra en exones diferentes al 3 y al 6 ó en algunos de los intrones del gen *HPRT*.
- ❖ El SLN, tiene diferentes mutaciones en cada uno de los exones e intrones del gen *HPRT*, esto hace que el abordaje sea muy complejo y costoso a la hora de caracterizar la mutación que dió origen a la enfermedad en cada familia.

7. RECOMENDACIONES

- ❖ Analizar el ADN complementario para complementar los estudios realizados con el ADN genómico y poder tener más información del tipo de mutaciones en estos pacientes.
- ❖ Amplificar el resto de exones del gen *HPRT*, para caracterizar la mutación que dió origen al SLN en la familia estudiada.
- ❖ Realizar una búsqueda de marcadores en el gen *HPRT*, tanto en intrones como en exones del gen como SNPs, para ofrecer otras herramientas diagnósticas.

BIBLIOGRAFIA

- AL EDWARDS, VOSS, H. RICE, P. CIVITELLO, A. STEGEMANN, J. et al. Automated DNA Sequencing of the Human locus. En: Genomics 6, 593-608. 1990.
- ANTONELLO Cossua, et al. Sardinia: A new point mutation causing deficiency without Lesch–Nyhan disease Biochimica et Biophysica Acta 1762 (2006) 29 – 33.
- ARAL B, et al. Novel nonsense mutation in the hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase gene and nonrandom X- inactivation causing Lesch-Nyhan syndrome in a female patient. Hum Mutat 7: 52, 1996.
- ARNOLD, W.J., MEADE, J.C., KELLEY, W.N. Hypoxanthine–guanine Phosphoribosyl transferase: Characteristics of the Mutant Enzyme in Erythrocytes from Patients with The Lesch-Nyhan Síndrome. En J. Clin Invest 1972; 51: 1805-12.
- ARGOS, P. HANEI, M. WILSON, J.M. and KELLEY, W.N. The National Center for Biotechnology Information (NCBI) Nucleotide [database on internet] En: M26434_ Reports Human hypoxanthin...[gi:184369] Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank, 2001.
- LAMBERT, B. et al. Missense mutations and evolutionary conserved amino acids at the human hypoxanthine phosphoribosyl-transferase locus, Pharmacogenetics 2 (1992), pp. 329–336.
- BAKAY B. et al. Utilization of purines by an variant in an intelligent, nonmutilative patient with features of the Lesch –Nyhan syndrome. En: Pediatr Res. 13: 1365.1979.
- 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 Autoradiographay. En :Clin Genet 1980: 17: 369-74.
- BARRERA, A, RODRÍGUEZ, F. y GÓMEZ, A. Aspectos clínicos y bioquímicos del síndrome de Lesch Nyhan. Acta medica colombiana 1992. ; 17: 447-553.
- BEGOÑA M. La prueba del ADN en medicina forense. Madrid. MASSON, S.A. 340 p.1999.
- BETTY S. Mak, et al. New mutations of the gene in Lesch-Nyhan syndrome. Pediatric Neurology, Volume 23, Issue 4, October 2000.

BOUWENS-ROMBOUITS A.G. y Col. Identification of two new nucleotide mutations (Utrecht and Madrid) in exon 3 of the human hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase () gene. Hum. Genet. 91: 451,1993.

CHRISTIE R, et al. Lesch- Nyhan disease: Clinical experience with nineteen patients. Devel Med Child Neurol 24: 293,1982.

CHONI RINAT A., et al. Molecular, biochemical, and genetic characterization of a female patient with Lesch–Nyhan disease Molecular Genetics and Metabolism 87 (2006) 249–252.

CRAWHALL JC, Henderson JF, Kelley WN: Diagnosis and treatment of the Lesch-Nyhan syndrome. En: Pediatr Res 6:504,1972.

DAVIDSON BL. Et al. Identification of 17 independent mutations responsible for human hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase() deficiency. En: Am J Hum Genet 48:951.1991.

DE GREGORIOA,Laura et al. Lesch–Nyhan disease in a female with a clinically normal monozygotic twin. University of California San Diego. En: Molecular Genetics and Metabolism 85 70–77, 2005.

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.

ELICE M, et al. Molecular description of three macro deletions and an Alu-Alu recombination-mediated duplication in the gene in four patients with Lesch Nyhan disease. En: Mutation Research 476 2001; 43 – 54.

EMMERSON B. T. THOMPSON C J. GUALLACE D C. Partial Deficiency of the Hypoxanthine-guanine Phosphoribosyltransferase: Intermediate Enzyme Deficiency in Heterozygote Red Cells Ann. En: Intern. Med 1972; 76; 285-87.

FUJIMORI S, et al. Identification of a single nucleotide change in a mutant gene for hypoxanthine – guanine phosphoribosyltransferase (Ann Arbor) En: Hum Genet 79: 39 1988.

FUJIMORI S, Tagaya T, Kamatani N, Akaoka I: A germ line mutation within the coding sequence for the putative 5-phosphoribosyl-I pyrophosphate binding site of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase () in a Lesch – Nyhan patient : Misense mutations within a functionally important region probably cause disease. En: Hum Genet 90: 385,1992.

HOEFNAGEL D. et al. Hereditary choreoathetosis, self-mutilation, and hyperuricemia in young males. En: N Engl J Med 273: 130, 1965.

I. Gomes, M. Prinz, R. Pereira, C. Meyers, R.S. Mikasovich, A. Amorim, A. Carracedo, L. Gusmao, Genetic analysis of three US Population Groups using a X-Chromosomal STR decaplex, Int. J. Legal Med., 2007, doi:10.1007/s00414-006-0146-2. R. Szibor, J. Edelmann, S. Hering, I. Plate, H. Wittig, L. Roewer, P.

JINNAH H.A. et al. The spectrum of inherited mutations causing deficiency: 75 new cases and a review of 196 previously reported cases. En: Mutat. Res. 463 (2000), pp. 309–326.

JINNAH HA, Harris JC, Nyhan WL, O'Neill JP. Department of Neurology, Johns Hopkins Hospital, Baltimore, Maryland 21287, USA. The spectrum of mutations causing deficiency: an update Nucleosides Nucleotides. En: Nucleic Acids. 2004 Oct;23(8-9):1153-60

_____, HARRIS JC, NYHAN WL, O'NEILL JP. Department of Neurology, Johns Hopkins Hospital, Baltimore, Maryland 21287, USA. The spectrum of mutations causing deficiency: an update Nucleosides Nucleotides En: Nucleic Acids. 2004 Oct. 23(8-9):1153-60.

LESCH M, NYHAN W.L. A familial disorder of uric acid metabolism and central nervous system function. En: Am J Med 36: 561-570. 1964.

LOWENSTEIN PR, et al. Gene therapy for inherited neurological disorders: Towards therapeutic intervention in the Lesch Nyhan syndrome. En: Prog Brain Res 117: 485, 1998.

MANSFIELD E S, Blasband, Kronick M N, Wrabetz, Kaplan P, Rappaport E. Fluorescent approaches to diagnosis of Lesch-Nyhan syndrome and quantitative analysis of carrier status. En: Molecular and Cellular probes(1993). 311-324.

MARCUS S, et al. Mutation analysis and prenatal diagnosis in a Lesch – Nyhan family showing non-random X-inactivation interfering with carrier detection test. En: Hum Genet 89: 395, 1992.

MELTON, DW. gene organization and expression. Oxf Surv Euk : Genes 4:35, 1987.

MILLER S, DYKES D, POLESKY H, A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells, Nucl. Ac. Res. 1988 16: 1215.

MUSICK, WDL. Structural features of the phosphoribosyltransferases and their relationship to the human deficiency disorders of purine and pyrimidine metabolism. *Crit Rev Biochem* 11:1,1981.

NCBI. PubMed. Nucleotide. ARGOS P, Hanei, M Wilson, JM. M26434 Human hypoxanthin [gi: 184369]. 2001.

PAGE Th, BAKAU B., NYHAN W L. An Improved Procedure for Detection of Hypoxanthine guanine Phosphoribosyltransferase Heterozygotes. *Clin Chem* 1982; 28, 5: 1181-84.

PATTERSON, D. *De novo* purine and pyrimidine biosynthesis, in Bottesman MM(ed). En: *Molecular Cell Genetics*. New York, John Wiley. 1985. p 267.

PROMEGA. GenePrint PowerPlex 16 System. Technical Manual, USA. 2000

PUIG, J G.et al. The Spectrum of Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl transferase () Deficiency: Clinical Experience Based on 22 Patients from 18 Spanish Families. *Medicine*. 80(2):102-112, March 2001.

RODRÍGUEZ F, BARRERA, A. Actividad de la enzima HGPRT en Eritrocitos de una familia afectada por el síndrome de Lesch Nyhan. En: *Salud UIS* 2001; 33: 32 -35.

ROSENBLOOM FM, et al. Biochemical basis of accelerated purine biosynthesis *de novo* in human fibroblasts lacking hypoxanthine- guanine phosphoribosyl-transferase. En: *J. Biol chem*. 1968; 243:1166-1173.

SCRIVER, CR., BEAUDET AL., SLY, WS. The metabolic & molecular bases of inherited disease. Eight edition. Volumen II. 2001. Chapter 107, 2537-2570.

SEEGMILLER, JE., ROSENBLOOM, FM. KELLEY WN. Enzyme defect associated with a sex-linked human neurological disorder and excessive purine synthesis. *Science* 155: 1682, 1967.

SHANI,E. BROMBERG, HIRSCH, J.FEINSTEIN, S. A novel point mutation (I137T) in the conserved 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphatebinding motif of hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (Jerusalem) in a variant of Lesch–Nyhan syndrome. En: *Molecular Genetics and Metabolism* 78 (2003)158–161

SILVERS David N., et al. Detección of the Heterozygote in Lesch Nyhan Disease by Hair Toot Analysis. En: *N. Eng J Med* 1972; 286: 390-393.

SKYLER JS, et al. Growth retardation in the Lesch- Nyhan syndrome. En: Acta Endocrinol 75. 3, 1974.

SMITH, GW, WRIGHT, V. Allopurinol Br J Clin Practice 41: 710, 1987.

SNYDER FF, Chudley AE, MacLeod PM. Carter RJ, Fung E, Lowe JK: Partial deficiency of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase with reduced affinity for PP-ribose -P in four related males with gout. En: Hum Genet 67: 8. 1984.

STRYER Lubert, BERG Jeremy M. Tymoczko John L. Bioquímica, 5ed. Ed. Reverté, 2004. Capito 25. 698-711.

SZIBOR, R. X- chromosomal markers: Past, present and future. En: FSI Genetics1 (2007) 93-99.

TORRES JIMÉNEZ, R. F et al. Estudio Bioquímico, enzimático y genético de la deficiencia de hipóxantina guanina fosforibosiltransferasa (). En An Esp pediatr 1998; 48: 355-362.

VAN DER ZEE, SPM. SCHRETLEN, EDAM. MONNENS LAH. Megaloblastic anemia in the Lesch-Nyhan syndrome. Lancet a: 1427, 1968.

VISSER JE, BAER P, JINNAH HA. Lesch Nyhan syndrome and the basal ganglia. Brain Res Rev 32: 449, 2000.

YAMADA Y., et al. Molecular mechanisms of the second female Lesch-Nyhan patient. En: Adv Exp Med Biol 370: 337, 1994.

Yasukazu Y, Haruko G, Kaoru S, Ritsuko A, Nobuaki O, Molecular analysis of five independent Japanese mutant genes responsible for hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase () deficiency. Human genetics 1992. 90: 379-384.

YASUKAZU Y, Nombra N, Kenichiro Y, Wakamatsu N. Molecular análisis of deficiencias: An update of the spectrum of Asian mutations with novel mutations. En Molecular Genetics and Metabolism. 90 (2006) 70-76.

ANEXO A .CONSENTIMIENTO INFORMADO

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA SINDROME DE LESCH NYHAN EN UNA POBLACION COLOMBIANA

Investigador Principal: ADRIANA MARIA GIL ZAPATA. Bacterióloga.

Teléfono casa :6388245

Teléfono celular: 3112411717.

Directores de Tesis: ADRIANA CASTILLO
FERNANDO RODRIGUEZ.

Fecha : _____

Nombre: _____

Ceda N° _____ de _____ Fecha y lugar de Nacimiento o _____

Lugar Nacimiento Padre _____

Lugar Nacimiento madre _____

Doy constancia por medio de mi firma que he sido informado en detalle acerca del estudio: Síndrome de Lesch Nyhan en una población colombiana, cuyo objetivo es analizar el gen *HPRT* HGPRT: (Hipoxantina guanina fosforibosil transferasa) ubicado en el brazo largo del cromosoma X : region : X q26 – 27 y se caracteriza por presentar en estos pacientes una actividad enzimática residual para el gen *HPRT* HGPRT menor del 1.5 %, y esta deficiencia es heredada ligado a X recesivo con una frecuencia muy baja en la población. Las manifestaciones clínicas están relacionadas con una sobreproducción de ácido urico, trastornos neurológicos y cognitivos. El estudio va a ser realizado en el laboratorio de Genética de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander (UIS).

He decidido colaborar por medio de la donación de una muestra de sangre, la cual va a ser obtenida por venopunción con 2 tubos vacutainer tapa lila y cuyo procedimiento no va a producir molestias mayores y va a ser realizado con todas las técnicas de asepsia y bioseguridad pertinentes. Tengo conocimiento y acepto que las muestras tomadas van a ser almacenadas en el laboratorio de Genética de la Universidad Industrial de Santander para este estudio y para eventuales investigaciones y proyectos colaborativos en un futuro en la misma línea de trabajo, para lo cual el grupo de investigación solicitara un nuevo aval al comité de ética.

Toda la información será documentada y guardada de manera confidencial, manteniendo total reserva de la identidad del paciente, y solo será disponible para el personal involucrado en la investigación y esta cláusula se aplicara tanto a esta investigación como a estudios futuros en los cuales se utilicen las muestras almacenadas en el laboratorio de genética de la UIS; si tengo alguna duda o pregunta del estudio o mis derechos con respecto a la participación, puedo llamar Adriana Maria Gil zapata a los teléfonos anteriormente suministrados para comunicarle mi inquietud y poder aclarar satisfactoriamente mis dudas.

Acepto que mi participación es voluntaria en la investigación y no obtendré remuneración económica salvo asi lo deseo, la comunicación por escrito de los resultados de mi perfil genético. Doy consentimiento informado para utilizar la muestra obtenida por venopuncion (2 tubos vacutainer), para realizar diferentes técnicas moleculares como extracción de ADN, PCR y Secuenciación del Gen *HPRT* HGPRT.

SI -----

NO -----

Doy consentimiento para el almacenamiento y conservación de las muestras al igual que para ser usadas en otras investigaciones relacionadas.

SI -----

NO -----

Doy consentimiento para la utilización de las muestras como población control en otros estudios científicos relacionados con la enfermedad.

SI -----

NO -----

Se me ha informado que tengo derecho a decidir si quiero saber o no el restado obtenido de las pruebas realizadas, y que tengo derecho a cambiar de opinión en el futuro.

SI -----

NO -----

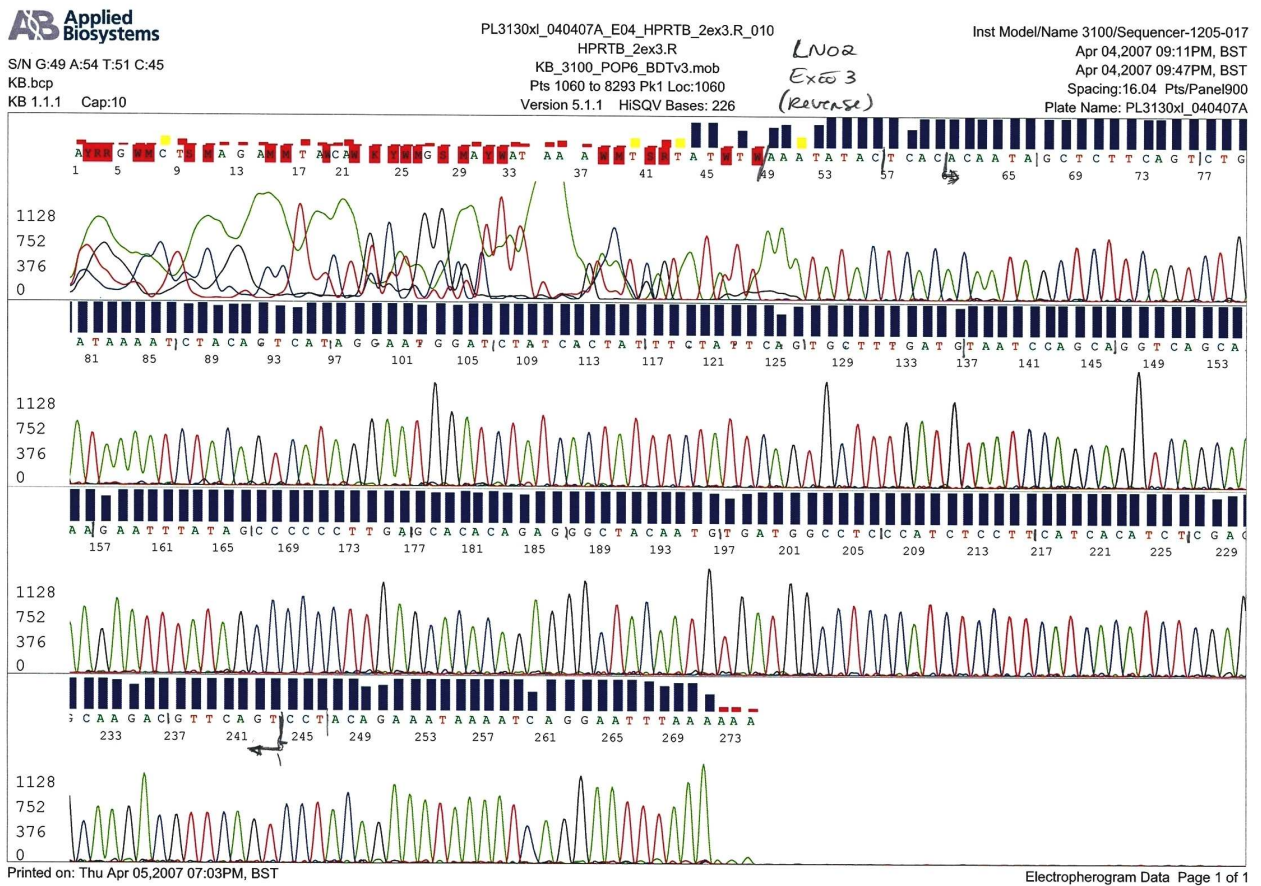
Lugar y Fecha: -----

Firma del paciente

Firma testigo o responsable.

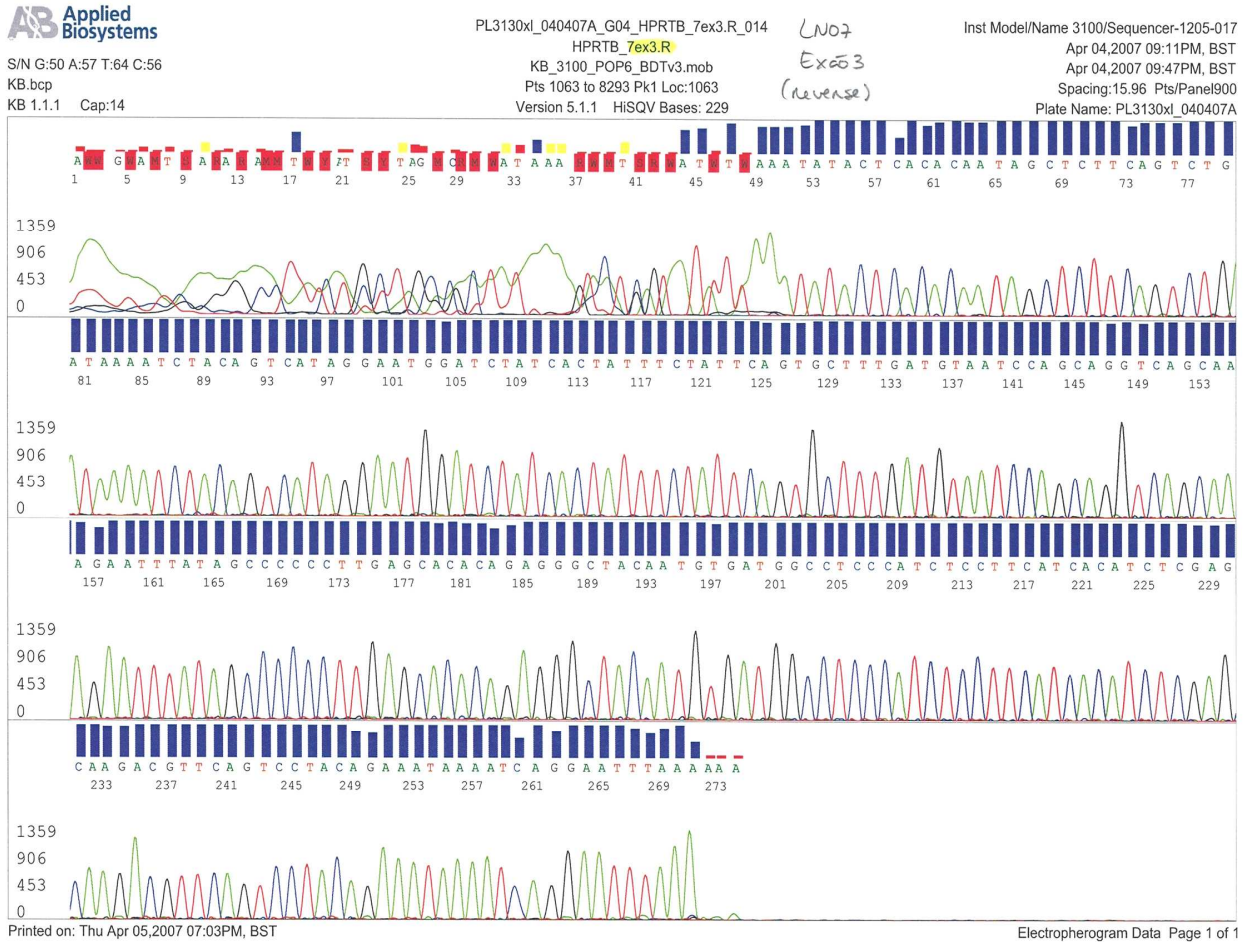
ANEXO D. Secuenciación Exón 3 (antisentido) LN02/LN07 gen *HPRT*

Panel A



Fuente elaborada por el autor.

Panel B

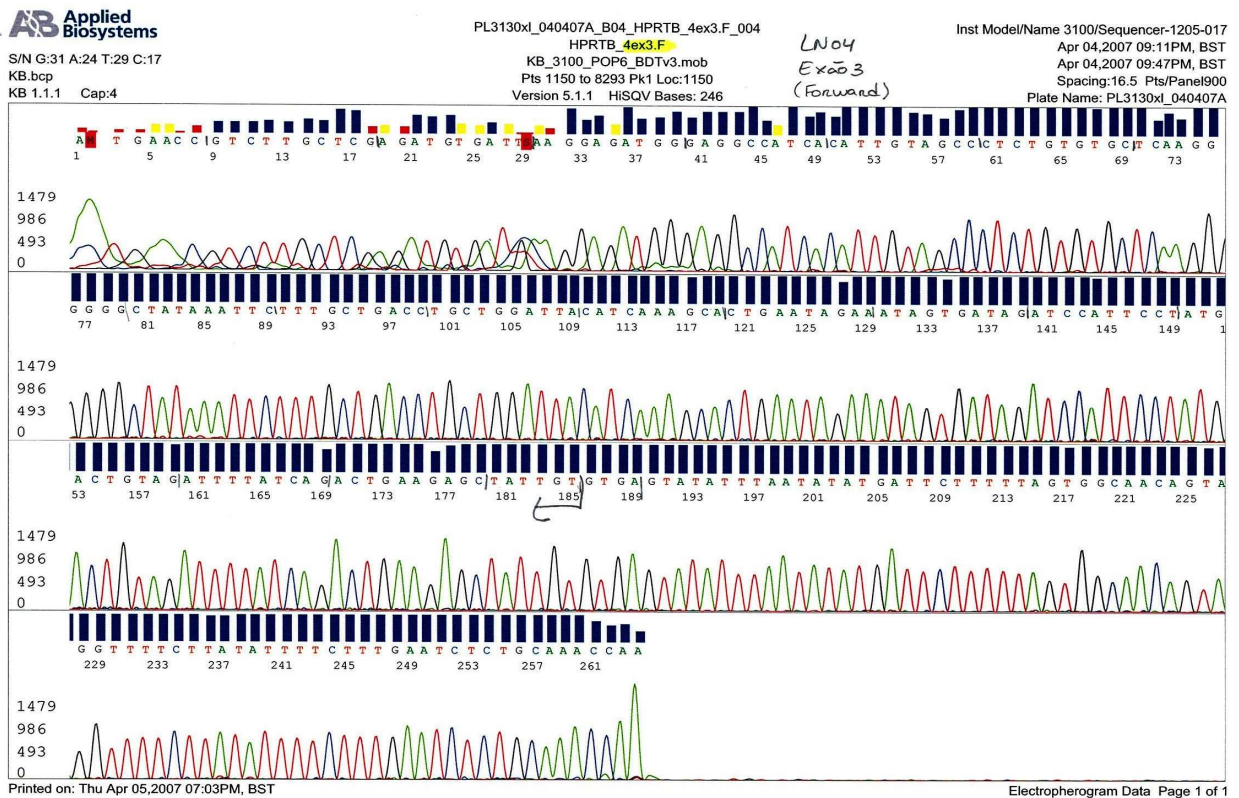


Fuente: elaborada por el autor.

En esta figura se puede apreciar en el panel A la secuenciación del Exón 3 Reverse del afectado LN02, y en el panel B la secuenciación del Exón 3 Reverse de la persona sana LN07, al comparar las 2 secuencias no se observó ninguna mutación, son idénticas a la reportada en la base de datos NCBI para este exón. Cada base nitrogenada está marcada con un fluorocromo diferente así: la Adenina (A) Verde, la Timina (T) roja, la Citosina (C) azul y la Guanina (G) negro

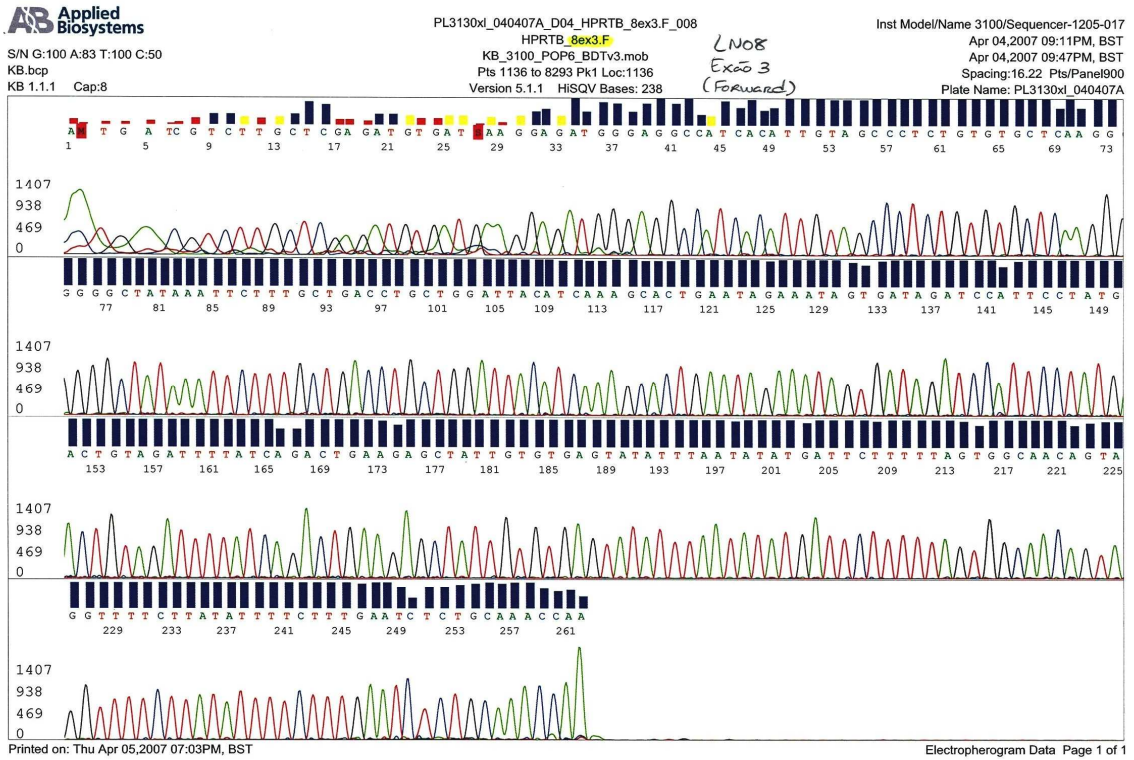
ANEXO F. Secuenciación Exón 3 (Forward) LN04/ LN08 gen *HPRT*

Panel A



Fuente: elaborada por el autor.

Panel B

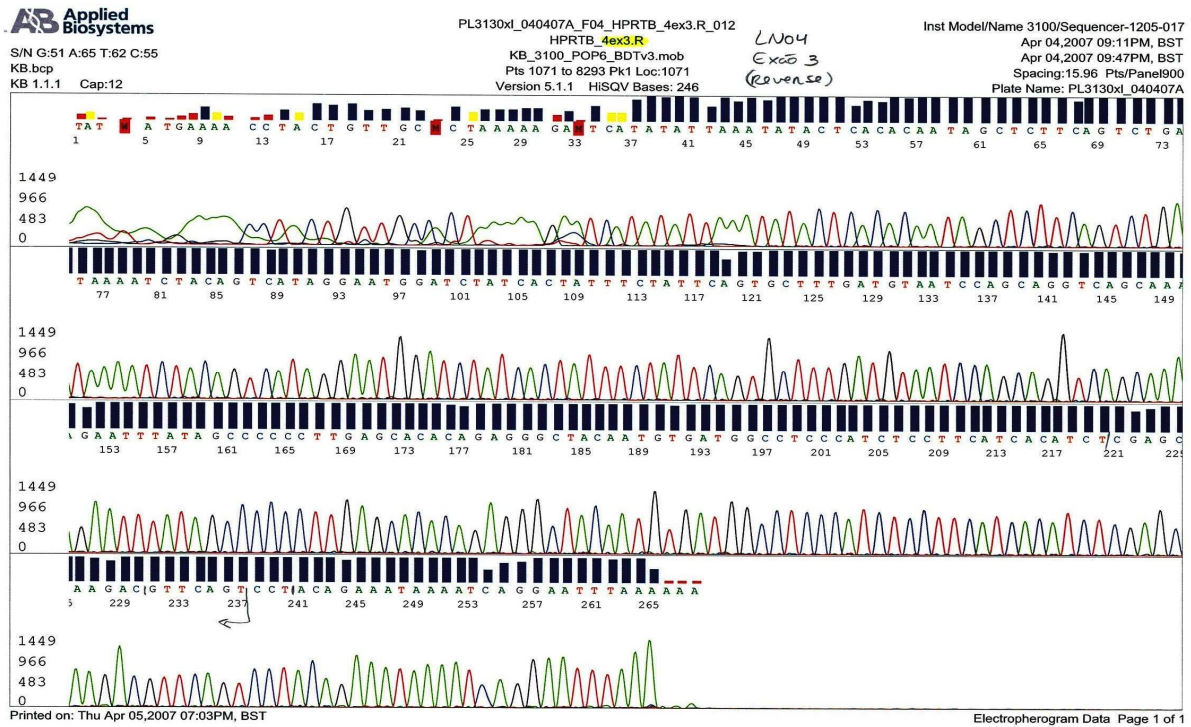


Fuente: elaborada por el autor.

En esta figura se puede apreciar en el panel A la secuenciación del Exón 3 Forward del afectado LN04, y en el panel B la secuenciación del Exón 3 Forward de la persona sana LN08, al comparar las 2 secuencias no se observa ninguna mutación, son idénticas a la reportada en la base de datos NCBI para éste exón. Cada base nitrogenada está marcada con un fluorocromo diferente así: la Adenina (A) Verde, la Timina (T) roja, la Citosina (C) azul y la Guanina (G) negro.

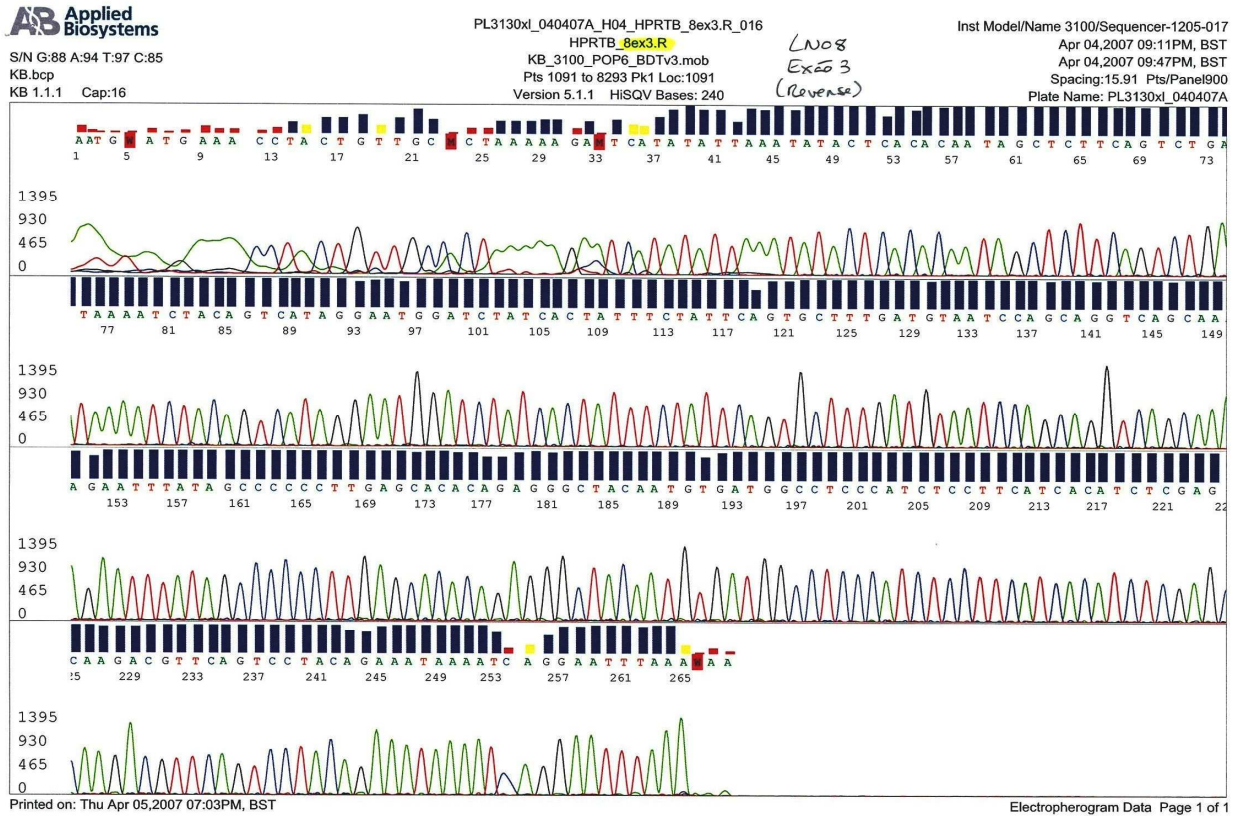
ANEXO G. Secuenciación Exón 3 (Reverse) LN04/LN08 gen *HPRT*

Panel A



Fuente: elaborada por el autor.

Panel B

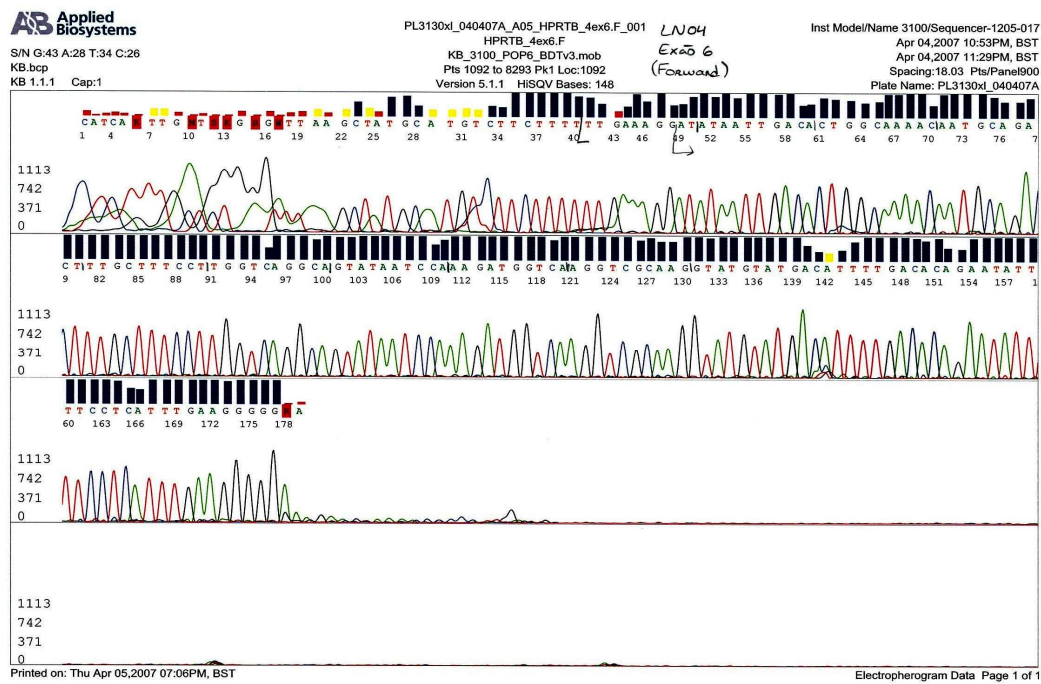


Fuente: elaborada por el autor.

En esta figura se puede apreciar en el panel A la secuenciación del Exón 3 Reverse del afectado LN04, y en el panel B la secuenciación del Exón 3 Reverse de la persona sana LN08, al comparar las 2 secuencias no se observa ninguna mutación, son idénticas a la reportada en la base de datos NCBI para éste exón. Cada base nitrogenada esta marcada con un fluorocromo diferente así: la Adenina (A) Verde, la Timina (T) roja, la Citosina (C) az y la Guanina (G) negro.

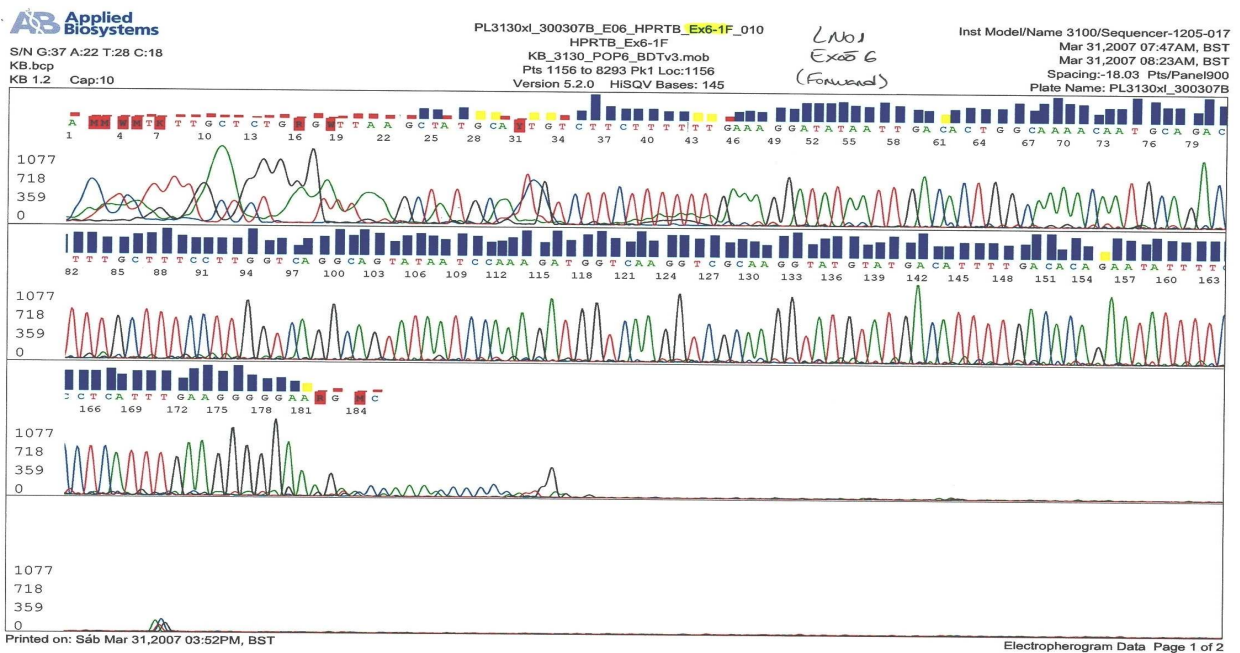
ANEXO H. Secuenciación Exón 6 (Forward) LN04/ LN01 gen *HPRT*

Panel A



Fuente: elaborada por el autor.

Panel B

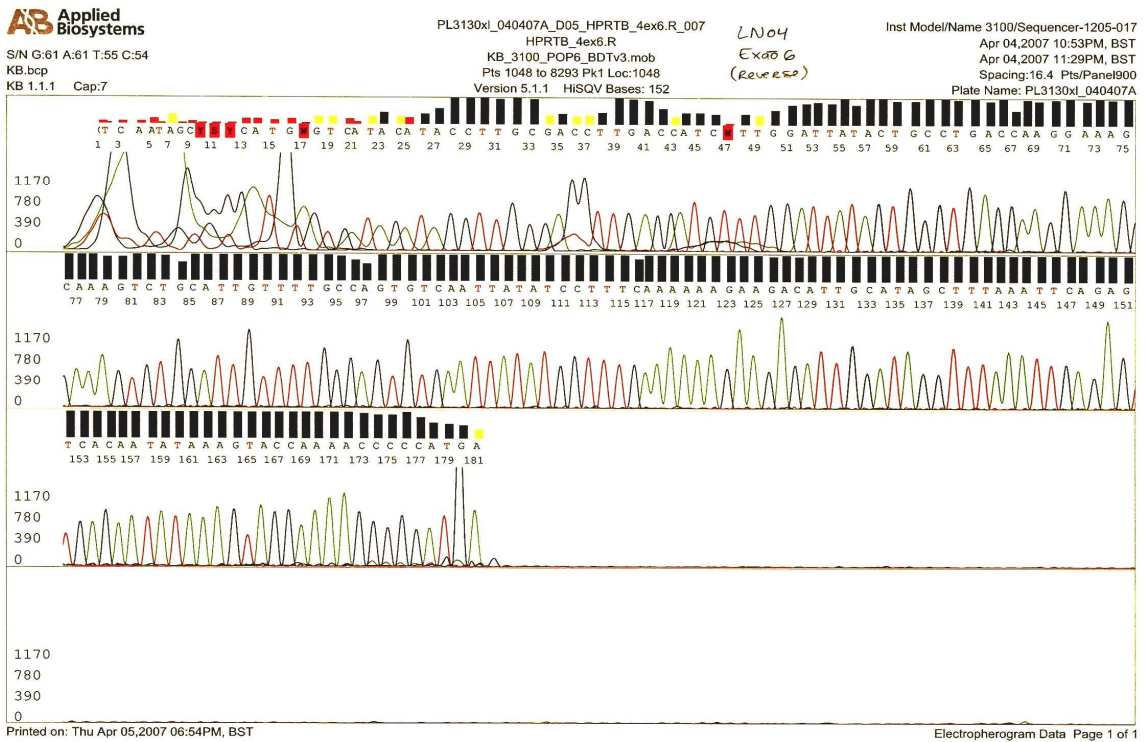


Fuente: elaborada por el autor.

En esta figura se puede apreciar en el panel A la secuenciación del Exón 6 Forward del afectado LN04, y en el panel B la secuenciación del Exón 6 Forward de la persona sana LN01, al comparar las 2 secuencias no se observa ninguna mutación, son idénticas a la reportada en la base de datos NCBI para éste exón. Cada base nitrogenada esta marcada con un fluorocromo diferente así: la Adenina (A) Verde, la Timina (T) roja, la Citosina (C) az y la Guanina (G) negro.

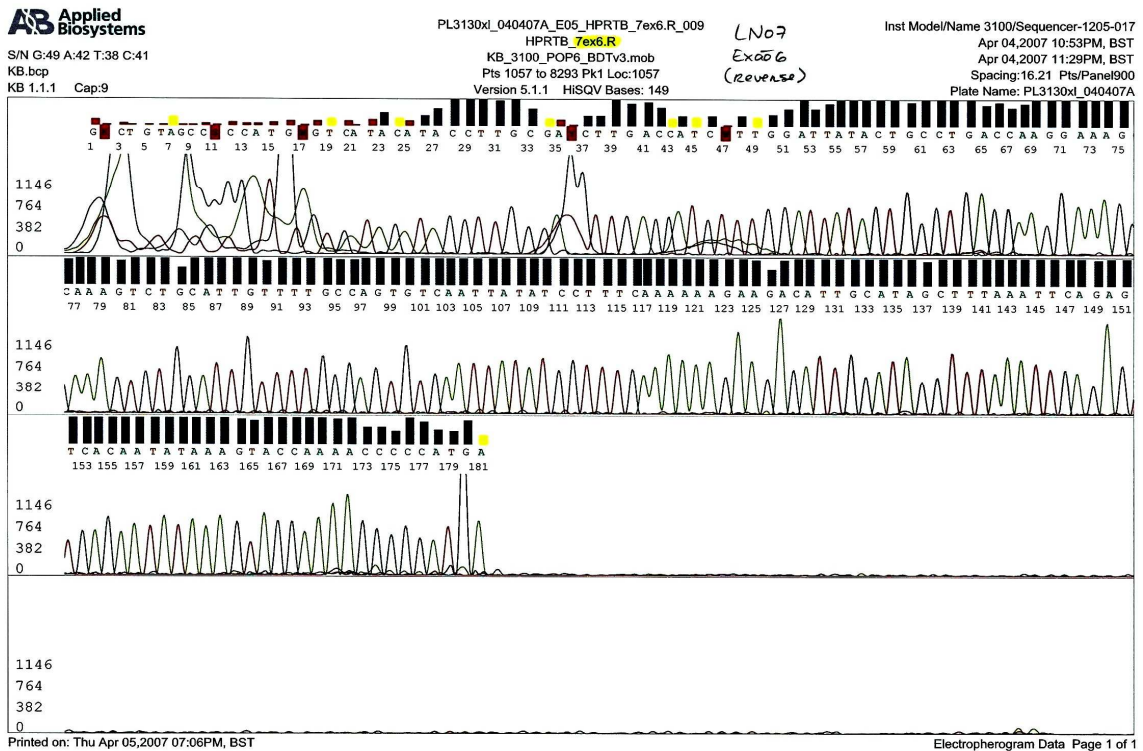
ANEXO I. Secuenciación Exón 6 (Reverse) LN04/ LN07 gen *HPRT*

Panel A



Fuente: elaborada por el autor.

Panel B



Fuente: elaborada por el autor.

En esta figura se puede apreciar en el panel A la secuenciación del Exón 6 Reverse del afectado LN04, y en el panel B la secuenciación del Exón 6 Reverse de la persona sana LN07, al comparar las 2 secuencias no se observa ninguna mutación, son idénticas a la reportada en la base de datos NCBI para éste exón. Cada base nitrogenada esta marcada con un fluorocromo diferente así: la Adenina (A) Verde, la Timina (T) roja, la Citosina (C) az y la Guanina (G) negro.

ANEXO J. Decaplex Strs cromosoma X para la familia afectada por SLN

PACIENTES	DXS8378	DXS9898	DXS8377	B	GATA172	DXS7423	DXS6809	DXS7132	DXS101	DXS6789
LN002	10	12	51	14	10	15	30	14	24	15
LNOO4	10	12	51	14	10	15	33	17	24	20
LNOO1	10 -13	12	48-51	13-14	8-10	15-17	30-33	14-17	24-26	15-20
LN003	12-13	11-12	44-51	13-15	8-12	15	30-35	14-15	18-26	15-20
LNOO5	12	11	44	15	12	15	35	15	18	20
LNOO6	10	13	40-50	12-14	10-11	15	33-34	14-16	24-25	20
LN16	11	12	49	14	8	15	35	14	26	21
LN013	10-11	12-13	49-50	12-14	8-10	15	33-35	14-16	24-26	20-21
LNOO9	10-11	12-13	40-51	13-14	8-11	15	30-34	14-16	25-26	15-20
LN007	13	13	48	14	11	17	34	16	25	20
LNOO8	11	13	40	14	11	15	34	16	25	20
LNO15	10	12	51	13	8	15	30	14	26	15
LNO17	11-13	12-13	40-48	14	10-11	15-1 7	33-34	16-17	24-25	20
LN010	10	12-13	51-56	14	11	14-15	33-34	15-16	23-25	20-21
LN011	10	12-13	51-56	13-14	8-11	14-15	30-33	15-16	23-26	15-21
LN012	10-11	12-13	40-56	14	11	14-15	33-34	15-16	23-25	20-21
LN014	10	12	56	14	11	14	33	15	23	21

Fuente: elaborada por el autor.

En la tabla se observan los genotipos de los STRs del cromosoma X de cada uno de las personas que integran la familia afectada por el SLN. La columna resaltada en azul corresponde a los genotipos de los STRs de B. Cada uno de los STRs del cromosoma X están marcados con un fluorocromo diferente así: Fluorocromo Azul (DXS8378, DXS9898, DXS8377,B), Fluorocromo verde (GATA172,DXS7423,DXS6809), Fluorocromo Amarillo (DXS7132,DXS101,DXS6789).

Anexo K. Primers Decaplex del Cromosoma X

Locus	Fluorocromo	Tamaño pb	PRIMERS	Referencia
DXS8378	6FAM	4	TTAGGCAACCCGGTGGTCC ACAAGAACGAACTCCAACCTC	Edelmann et al.(2002)
DXS9898	6FAM	4	CGAGCACACCTACAAAAGCTG TAGGCTCACCTCACTGAGCA	Iva Gomes et al 2006.
DXS8377	6FAM	3	ACCACTTCATGGCTTACCACAG TATGGACCTTTGGAAAGCTAG	Athanasiadou et al. 2003.
<i>HPRTB</i>	6FAM	4	CTCTCCAGAATAGTTAGATGTAGG ATGCCACAGATAATACACATCCCC	Athanasiadou et al. 2003.
GATA172D05	VIC	4	TAGTGGTGATGGTTGCACAG ATAATTGAAAGCCCGGATTC	Edelmann et al. (2002).
DXS7423	VIC	4	GTCTTCCTGTCATCTCCCAAC TAGCTTAGCGCCTGGCACATA	Edelmann et al. (2002).
DXS6809	VIC	4	TCCATCTTTCTCTGAACCTTCC TGCTTTAGGCTGATGTGAGG	Iva Gomes et al 2006.
DXS7132	NED	4	TCCCCTCTCATCTATCTGACTG CACTCCTGGTGCCAAACTCT	Iva Gomes et al 2006.
DXS101	NED	3	GTTTTATCCCCGCTACAGGA CTGCATATTCTGCGCATGT	Iva Gomes et al 2006.
DXS6789	NED	4	CTTCATTATGTGCTGGGGTAAA ACCTCGTGATCATGTAAGTTGG	Iva Gomes et al 2006.

pb: pares de bases.

Fuente: elaborado por el autor.

FAM: Fluorocromo Az. VIC: Fluorocromo Verde. NED: Fluorocromo Amarillo.

Se registran las secuencias de los primers de cada uno de los STRs del cromosoma X que hacen parte del Decaplex, además se describe el fluorocromo con el cual están marcados como su tamaño.

