



UNIVERSITÀ DI SIENA 1240

DIPARTIMENTO DI BIOTECNOLOGIE, CHIMICA E FARMACIA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE A CICLO UNICO IN CHIMICA E
TECNOLOGIA FARMACEUTICHE

Messa a punto di un modello cellulare per lo studio della Sindrome di Lesch-Nyhan

Relatore:
Prof.ssa Giulia Bernardini

Tesi di laurea di:
Virginia Meli

Anno accademico 2017/2018

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1 LA SINDROME DI LESCH-NYHAN.....	1
1.2 SEGNI CLINICI	3
1.3 BASI MOLECOLARI	5
1.3.1 Il gene HPRT1 e l'enzima HGPRT	5
1.3.2 Iperuricemia nella Sindrome di Lesch-Nyhan	8
1.3.3 Alterazioni neurologiche e comportamentali nella Sindrome di Lesch-Nyhan	9
1.4 DIAGNOSI	11
1.5 TRATTAMENTO	12
1.6 MODELLI SPERIMENTALI.....	13
2.SCOPO DELLA TESI	14
3. MATERIALI E METODI	15
3.1 MATERIALI	15
3.2 ESTRAZIONE E COLTURA DI FIBROBLASTI PRIMARI.....	16
3.2.1 MTT	16
3.2.2 Trattamenti	17
3.3 SAGGI CELLULARI	18
3.3.1 Muse System	18
3.3.2 Analisi della vitalità e proliferazione cellulare mediante Muse™ Count and Viability kit	19
3.3.3 Analisi dell'apoptosi cellulare mediante Muse™ Annexin V et Dead Cell kit ..	20
3.3.4 Analisi dello stress ossidativo cellulare mediante Muse™ Oxidative Stress kit	22
3.4 SAGGI BIOCHIMICI.....	23

3.4.1 HPLC.....	23
3.4.2 Analisi dei terreni condizionati mediante HPLC	24
3.4.3 Analisi dei fibroblasti mediante HPLC	25
4.RISULTATI	26
4.1 SCELTA DEL TERRENO DI COLTURA	26
4.2 PROLIFERAZIONE E VITALITÀ.....	29
4.2.1 LND.....	29
4.2.2 HFB	30
4.3 APOPTOSI	32
4.3.1 LND.....	32
4.3.2 HFB	33
4.4 STRESS OSSIDATIVO	34
4.4.1 LND.....	34
4.4.2 HFB	35
4.4.3 Confronto LND HFB	36
4.5 ANALISI DEL METABOLISMO CELLULARE	38
4.5.1 Terreni condizionati	38
4.5.2 Analisi del metabolismo intra cellulare.....	41
5.DISCUSSIONE	45
BIBLIOGRAFIA	48

1. INTRODUZIONE

1.1 LA SINDROME DI LESCH-NYHAN

La Sindrome di Lesch-Nyhan (LND) è una malattia genetica X-linked recessiva, dovuta al deficit dell'enzima ipoxantina-guanina fosforibosiltransferasi (HGPRT), coinvolto nella via di recupero delle purine. È una malattia estremamente rara che si manifesta con un caso ogni 380000 nati in Canada e uno ogni 235000 nati in Spagna (**Cristini et al., 2010**). Essendo una malattia x-linked recessiva, si manifesta prevalentemente nei maschi, mentre le femmine sono generalmente portatrici asintomatiche. Esistono, però, casi documentati di femmine con LND (**Hooft et al., 1968; Hara et al., 1982; Ogasawara et al., 1989; Van Bogaert et al., 1992; Yukawa et al., 1992; Yamada et al., 1994; Aral et al., 1996; De Gregorio et al., 2000; Inokuchi et al., 2004; De Gregorio et al., 2005; Rinat et al., 2005; Jinnah et al., 2006,2010; Sebasta et al., 2008**).

La patologia venne descritta per la prima volta nel 1964 da Michael Lesch e William Nyhan sulla base di due fratelli che manifestavano una serie di sintomi insoliti, quali: grave ritardo dello sviluppo motorio, coreoatetosi, distonia, cristalli nelle urine e autolesionismo (**Lesch and Nyhan, 1964**). In seguito alla pubblicazione dei loro risultati furono identificati altri casi, tutti in giovani maschi, coerentemente al modello genetico x-linked mendeliano (**Nyhan et al., 1967**). La causa della malattia venne poi messa in luce grazie alla dimostrazione che pazienti LND sottoposti a terapie con azatioprina erano incapaci di ridurre gli alti livelli di acido urico, questo suggeriva che il farmaco in tali soggetti non veniva convertito nel suo prodotto biologicamente attivo, reazione catalizzata dall'enzima HGPRT. Seegmiller, Rosenbloom and Kelly mostrarono che l'attività di tale enzima era prossima allo zero negli eritrociti di pazienti LND e ciò costituiva una chiara spiegazione del modello ereditario e dell'iperuricemia riscontrata. Ancora oggi la misura dell'attività dell'HGPRT negli eritrociti costituisce il migliore standard per la diagnosi della malattia (**Nyhan, 2005**). Il classico fenotipo LND è caratterizzato da iperproduzione di acido urico con iperuricemia, disabilità intellettuali, difficoltà nell'apprendimento, disfunzioni motorie (coreoatetosi e spasticità muscolare) e problemi comportamentali come l'autolesionismo (**Lesch e Nyhan, 1964; Nyhan et al., 1965; Jinnah et al., 2006**). Questo tipo di fenotipo è legato alla completa assenza di attività dell'enzima HGPRT, ma esistono anche casi in cui l'attività

dell'enzima è parziale dando così origine a fenotipi che si discostano dal classico fenotipo LND, con alcuni dei sintomi sopra citati attenuati o anche assenti (**Kelley et al., 1969; Emmerson and Thompson, 1973; Jinnah and Friedmann, 2001; Puig et al., 2001**). Collettivamente, questi pazienti vengono identificati con il nome di varianti LND (**Jinnah et al., 2010**). Un modello di classificazione di tali varianti prevede la suddivisione dei fenotipi in tre sottogruppi: LND, HND e HRH (Figura 1.1). Il fenotipo più lieve, detto HRH (Hprt-related hyperuricemia), è caratterizzato principalmente da iperproduzione di acido urico. I pazienti manifestanti tale fenotipo non presentano evidenti anomalie neurologiche o comportamentali, nonostante alcuni di essi possano mostrare piccole disabilità motorie o lievi problemi cognitivi, diagnosticabili con appropriati test neurologici e psicometrici (**Fu et al., 2014**). Tra il classico fenotipo LND e il fenotipo HRH più lieve esiste un ampio spettro di fenotipi con vari livelli di anomalie neurologiche e comportamentali, detto complessivamente HND (Hprt-related neurological disease) (**Jinnah et al., 2010**). L'iperproduzione di acido urico rimane una caratteristica costante anche nei pazienti HND ma la maggior parte di essi presenta problemi cognitivi, disturbi dell'attenzione e della concentrazione, mentre i comportamenti autolesionisti, presenti nel fenotipo classico, sono assenti. I disturbi motori invece, nell'HND, possono variare da clinicamente insignificanti a lievi fino a divenire handicap molto gravi; esiste comunque una stretta relazione tra il grado di severità della disfunzione motoria e quella cognitiva.

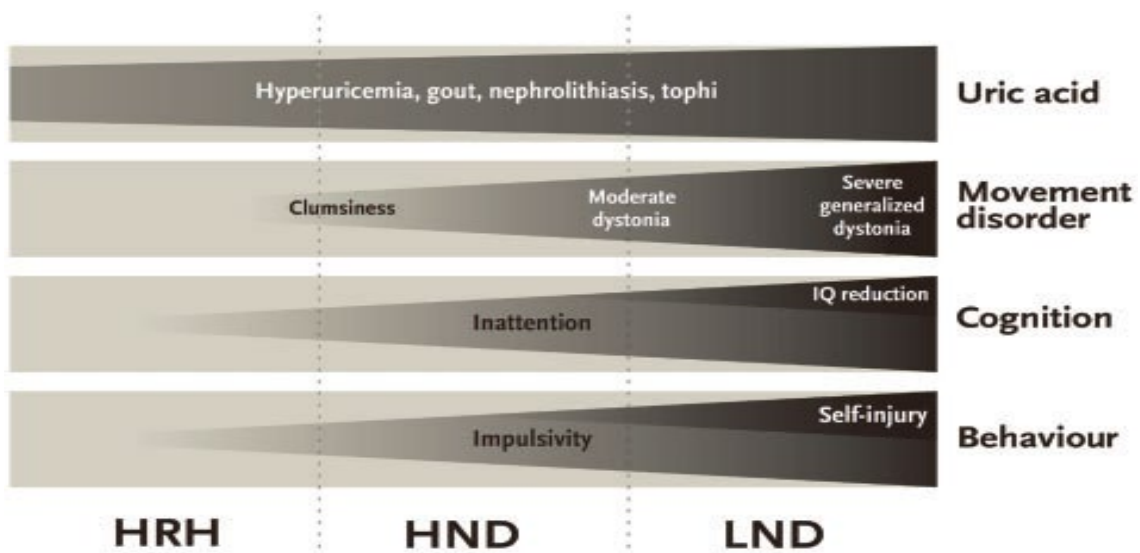


Figura 1.1: **Spettro clinico della Sindrome di Lesch-Nyhan e delle sue varianti.** I quattro maggiori aspetti del fenotipo clinico sono mostrati nei box in grigio, mentre i triangoli rappresentano la frequenza e il grado di severità con cui questi aspetti si manifestano.

1.2 SEGNI CLINICI

La LND è una malattia fortemente disabilitante. Pochi sono i pazienti che vivono oltre i 40 anni di età e la morte sopraggiunge per svariate cause, principalmente di origini respiratorie (Neychev et al., 2006).

I bambini LND vengono di norma gestati senza particolari complicanze e alla nascita non presentano anomalie di rilievo ad eccezione di un grado variabile di ipotonia, evidenziabile dalla difficoltà alla suzione e alla deglutizione, accompagnata da episodi di vomito. Ad un'età compresa tra i tre e i sei mesi compaiono i primi segni della malattia con la presenza di uricosuria, evidenziabile dal riscontro di cristalli di colore arancione nei pannolini.

La sovrapproduzione di acido urico e di conseguenza la presenza di elevati livelli di acido urico nel siero ne induce un aumento di escrezione nelle urine (Torres et al., 2011). L'acido urico tende a precipitare in regioni vulnerabili dell'organismo caratterizzate da condizioni vicine al suo limite di solubilità. Nel sistema urogenitale tali precipitazioni possono causare nefrolitiasi, ostruzione urinaria e insufficienza renale, mentre nel tessuto sottocutaneo si possono formare masse solide di aggregati di urati, detti tofi (Fu et al., 2014). Inoltre, i continui depositi di cristalli di acido urico nelle articolazioni possono causare artrite gottosa. Come già detto in precedenza, i pazienti LND presentano gravi disturbi neurologici e motori che possono comparire anch'essi tra i tre e i sei mesi di vita oppure possono divenire evidenti con l'avanzare dell'età. Il quadro neurologico è correlabile ad una paralisi cerebrale detta atetoide e può comportare: sintomi extrapiramidali come distonia, coreoatetosi, disartria e disfagia, e sintomi piramidali come spasticità e iperreflessia (Micheli et al., 2018).

La distonia può interessare tutte le parti del corpo e può indurre inabilità ad alzarsi e a camminare, infatti i pazienti sono costretti ad utilizzare sedie a rotelle. Il disturbo motorio è tale da comportare la necessità di un'assistenza giornaliera per lo svolgimento delle normali attività quotidiane. Il grado di severità della distonia può essere stimato utilizzando la scala di Fahn-Marsden, da 0 (assenza di distonia) a 140 (severità più alta) (Fu et al., 2014).

Tra i disturbi neurocomportamentali sono stati riscontrati anche gravi e ricorrenti episodi di autolesionismo presenti principalmente nei pazienti con un completo deficit dell'enzima HGPRT. Anche pazienti con parziale deficit possono manifestare comportamenti simili. I pazienti iniziano a mordersi le labbra, la lingua o le dita e, se non limitati con opportune restrizioni, possono arrivare a sviluppare lesioni automutilanti (Anderson et al., 1994; Schroeder et al., 2001). L'autolesionismo non è dovuto ad una mancanza di sensibilità, infatti i pazienti percepiscono dolore, ma sembra sia dovuto ad un comportamento ossessivo-

compulsivo. Tale sintomo può comparire tra i due e i sedici anni di età e, in alcuni casi, può essere indotto o aggravato da stress psicologici come adolescenza e conflitti familiari (**Torres et al., 2007**).

I pazienti LND manifestano inoltre disturbi cognitivi, anch'essi difficili da valutare e classificare, soprattutto nei neonati e nei bambini, le cui capacità cognitive mutano considerevolmente con l'età. I deficit cognitivi sono anche caratterizzati da una considerevole variabilità tra i soggetti (**Schretlen et al., 2001; Jinnah et al., 2010**).

Il ritardo mentale è insolito nei pazienti LND, anche se molti di essi presentano una moderata disabilità intellettuale con un IQ che può variare tra 60 e 80 (**Anderson et al., 1992; Matthews et al., 1995; Solan et al., 1997; Schretlen et al., 2001**). I pazienti LND possono inoltre presentare anemia megaloblastica.

1.3 BASI MOLECOLARI

1.3.1 Il gene HPRT1 e l'enzima HGPRT

Il deficit di HGPRT è causato da mutazioni a livello del gene HPRT1; tali mutazioni sono abbastanza eterogenee, sono infatti responsabili di vari difetti molecolari diffusi all'interno del gene HPRT1. Ad oggi sono state riscontrate più di 600 mutazioni cliniche rilevanti che includono: mutazioni puntiformi responsabili di sostituzioni di singoli amminoacidi, mutazioni responsabili di terminazioni premature della traduzione proteica, delezioni, inserzioni, ed altre più complesse sostituzioni o riarrangiamenti. Generalmente, mutazioni che annullano l'attività dell'enzima HGPRT sono associate al classico fenotipo LND, mentre mutazioni che permettono un'attività parziale dell'enzima sono associate alle più attenuate varianti LND.

Il gene HPRT1 è localizzato nel braccio lungo del cromosoma X nella regione q26-27 (**Patel et al., 1984; Stout and Caskey, 1985; Melton, 1987; Keebaugh et al., 2006**), possiede otto introni e nove esoni che codificano un unico RNA messaggero, avente dimensioni di circa 1.6 kb. Questo durante la sintesi proteica viene tradotto nell'enzima HGPRT, avente dimensioni molecolari di circa 24,6 kD. Tale proteina non subisce modificazioni post trasduzionali ad eccezione della scissione di una metionina e dell'acetilazione di una alanina (**Wilson et al., 1983**). Può però andare incontro a due alterazioni spontanee, lente e progressive, quali l'ossidazione del carbonio C23 e la deamminazione da N107 a D107 (**Johnson et al., 1982; Wilson et al., 1982; Keough et al., 1991**). L'enzima è costituito da quattro subunità identiche che si assemblano spontaneamente o come dimeri o come tetrameri in base alla forza ionica del solvente (**Holden e Kelley, 1978; Johnson et al., 1979**); sono legate da una rete di legami a idrogeno, ponti salini e interazioni idrofobiche. L'HGPRT presenta una struttura centrale detta core, costituita da cinque foglietti beta paralleli affiancati da quattro alfa eliche (Figura 1.2).

La struttura cristallina dell'HGPRT è stata determinata in diverse forme tra cui: la forma libera (**Keough et al., 2005**), la forma legante i suoi prodotti inosina monofosfato e guanosina monofosfato (**Eads et al., 1994; Xu et al., 1997**), e in forma complessata (**Shi et al., 1999**).

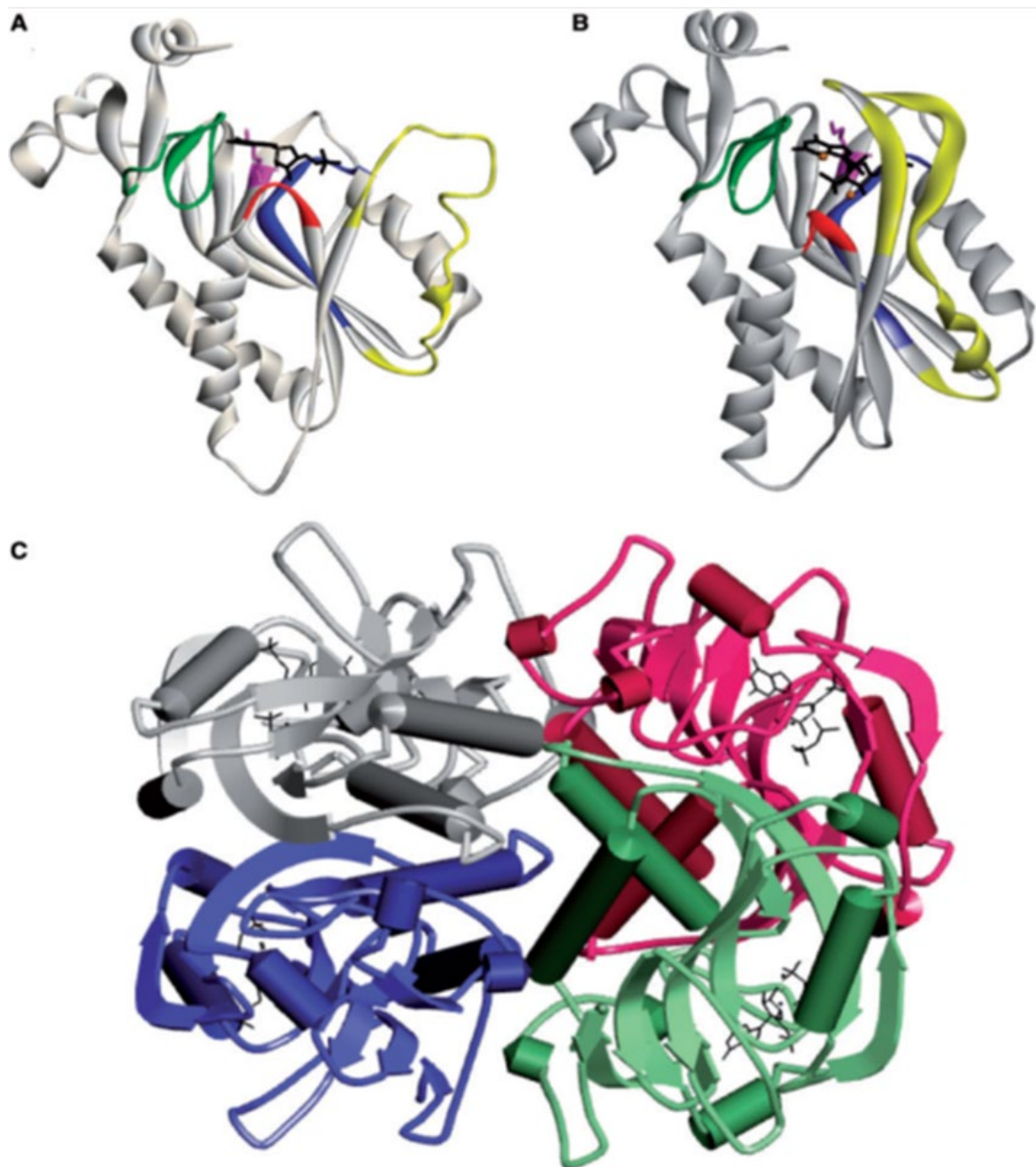


FIGURA 1.2: **Diagramma a nastro.** (A) Un monomero con la guanosina monofosfato nello stato di anello aperto. (B) Un monomero con l'analogo dello stato di transizione e PPi nello stato di anello chiuso. (A e B) Il sito di legame con il Ppi è mostrato in rosso, il sito di legame al PRPP è mostrato in blu, il C-terminale è mostrato in verde. (C) La struttura tetramerica dell'HGPRT con le quattro subunità in colori differenti (A in grigio, B in blu, C in rosso e D in verde). **Fu et al.**, Brain2014: 137;1282-1303

L'HGPRT appartiene alla famiglia delle fosforibosiltransferasi, enzimi che catalizzano il trasferimento di un gruppo funzionale, in questo caso il gruppo 5-fosforibosile, dal fosforibosilpirofosfato (PRPP) alla purina; legano quindi uno zucchero ad una base purinica quale guanina o ipoxantina (una forma modificata di adenina), per formare un nucleotide.

La peculiarità di tali enzimi è quella di utilizzare legami fosforici ad alta energia del PRPP piuttosto che molecole di ATP, per catalizzare le reazioni (**Foxe Kelley, 1971; Musick, 1981**). L'HGPRT catalizza due simili reazioni all'interno della via di recupero delle purine. Una reazione implica la pirofosforilazione dell'ipoxantina a inosinammonofosfato (IMP), un precursore sia dei nucleotidi adeninici (ATP, ADP, AMP) che dei nucleotidi guaninici (GTP, GDP, GMP). L'altra reazione comporta la pirofosforilazione della guanina direttamente in GMP (Figura 1.3).

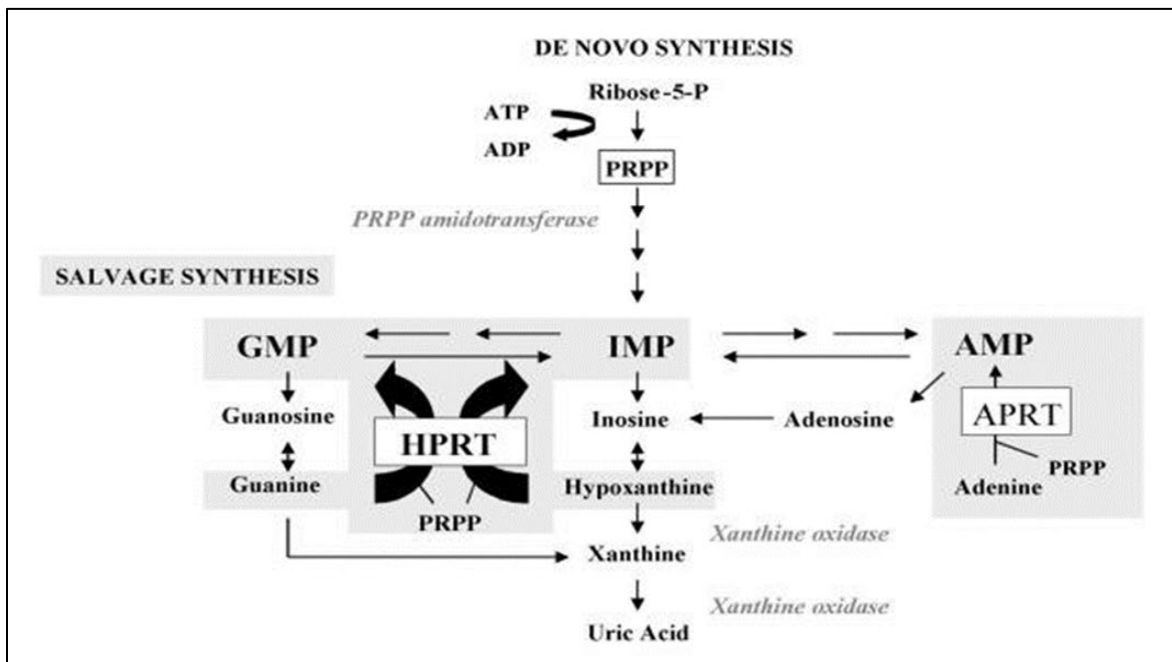


Figura 1.3: **Via metabolica purinica**

Le reazioni catalizzate dall'HGPRT procedono con un meccanismo ordinato, nel quale il PRPP si lega per primo all'enzima inducendone così un cambiamento conformazionale necessario per il successivo legame con la purina, seguito infine dal rilascio del pirofosfato e del nucleotide (**Salerno and Giacomello, 1979**).

La conoscenza della struttura e della funzione di HGPRT fornisce un'ampia informazione per capire come le mutazioni al livello del gene HPRT1 influenzino la funzione enzimatica e inducano manifestazioni cliniche. Inoltre, i duplici ruoli di HGPRT nel riciclaggio di ipoxantina e guanina sollevano domande su come le mutazioni possano influenzare una o entrambe le funzioni e quale di esse può essere rilevante nel fenotipo clinico.

1.3.2 Iperuricemia nella Sindrome di Lesch-Nyhan

I meccanismi responsabili dell'iperproduzione di acido urico nella LND sono meglio compresi con la conoscenza della sintesi purinica de novo, della via di recupero e della degradazione purinica (**Becker, 2001**).

La sintesi de novo delle purine avviene attraverso un processo multistep che comporta il consumo di una considerevole quantità di energia. A partire dal PRPP viene prodotta una molecola di inosina monofosfato (IMP) e tale processo avviene in dieci step consecutivi durante i quali si verifica l'incorporazione di formato, idrogeno carbonato, glutammina e acido aspartico al PRPP. Includendo la sintesi del PRPP, la sintesi di una molecola di IMP comporta il consumo di sei molecole di ATP. La sintesi del PRPP, a partire dal ribosio-5-fosfato, dalla glicina e dall'ATP è catalizzata dall'enzima PRPP sintetasi e la sua concentrazione dipende dalla resa della biosintesi purinica. Il PRPP non è solo coinvolto nella biosintesi purinica ma è anche coinvolto nella corrispettiva via di recupero. La sintesi purinica de novo è principalmente regolata dall'enzima amidofosforibosiltransferasi, il quale catalizza la prima reazione della sintesi purinica, ovvero la formazione della fosforibosilammina a partire da PRPP e glutammina. L'amidofosforibosiltransferasi è stimolato dall'aumento di concentrazione del PRPP ed è soggetto ad un'inibizione feedback negativa da parte dei nucleotidi purinici IMP, adenosina monofostato (AMP), e guanosina monofostato (GMP). La via di recupero delle purine è regolata da tre differenti enzimi: HGPRT, adenina-fosforibosiltransferasi (APRT), e adenosina chinasi. È stato stimato che il 90% delle purine generate dal metabolismo intracellulare vengono riciclate piuttosto che degradate ed escrete (**Murray, 1971; Seegmiller, 1989**); la via di recupero delle purine consente quindi un funzionamento molto più efficiente dell'intero metabolismo purinico. HGPRT trasforma ipoxantina e guanina in IMP e GMP, rispettivamente. APRT, strutturalmente e funzionalmente simile all'HGPRT, ricicla l'adenina in AMP. HGPRT e APRT usano entrambi come co-substrato il PRPP nelle reazioni di recupero. Gli enzimi di recupero sono necessari anche per recuperare basi e nucleotidi purinici da fonti extracellulari, che contribuiscono anch'essi al mantenimento del pool purinico. Così un deficit dell'enzima di recupero non solo causa un mancato recupero delle purine intracellulari, ma impedisce anche di incorporare purine da fonti extracellulari.

La via di degradazione purinica comporta la defosforilazione dei nucleotidi IMP e GMP in inosina e guanosina, rispettivamente; tale processo è catalizzato dalla 5'-nucleotidasi ed altre aspecifiche fosfatasi. Inosina e guanosina vengono poi trasformate in basi puriniche, quali

ipoxantina e guanina. Infine ipoxantina e xantina vengono ossidate ad acido urico dall'enzima xantina ossidasi, mentre la guanina è convertita a xantina dalla guanina deamminasi o guanasi. L'acido urico è il prodotto finale della via degradativa.

Generalmente, l'attività degli enzimi di tale via è regolata dalla disponibilità dei substrati.

Due principali difetti enzimatici sono responsabili della sovrapproduzione di acido urico e quindi dell'iperuricemia: l'aumento di attività dell'enzima PRPP sintetasi e il deficit di HGRT. L'incremento dell'attività del PRPP sintetasi induce un aumento della disponibilità di PRPP per il PRPP amidotransferasi, l'enzima limitante la sintesi purinica de novo, che si traduce quindi in un aumento della sintesi purinica (**Rosenbloom et al., 1968; Brosh et al., 1976; Sorensen, 1970**). Il deficit di HGRT induce l'accumulo di ipoxantina e guanina, che vengono rapidamente convertite in acido urico dalla xantina ossidasi, un aumento del PRPP e un decremento di IMP e GMP, feedback inibitori del PRPP amidotransferasi. Anche un aumento dell'attività dell'APRT contribuisce alla sovrapproduzione purinica. La combinazione del mancato riciclo delle basi puriniche con l'aumento della sintesi purinica spiega la marcata iperproduzione di acido urico nella LND (**Torres et al., 2011**).

1.3.3 Alterazioni neurologiche e comportamentali nella Sindrome di Lesch-Nyhan

I meccanismi molecolari alla base delle disfunzioni neurologiche e comportamentali nella LND sono poco chiari. La connessione tra la sindrome neurologica descritta nei pazienti LND e il deficit di HGPRT appare inspiegabile: il ruolo di HGPRT all'interno del metabolismo purinico è ben conosciuto ma nessuna connessione con i neurotrasmettitori è evidente. Studi post mortem effettuati su cervelli di pazienti LND non hanno rivelato nessuna anomalia morfologica (**Watts et al., 1982; Jinnahn et al., 2006**). Analisi neurochimiche di tessuti post mortem hanno invece rivelato la presenza di disfunzioni a livello dei neurotrasmettitori, con un decremento dei neuroni terminali dopaminergici e un incremento dei livelli di serotonina e di 5-idrossiindolacetato (**Lloyd et al., 1981**). Nel liquido cerebrospinale di pazienti LND sono stati riscontrati elevati livelli di ipoxantina e xantina e un decremento dei livelli di dopamina. L'incremento di ipoxantina nel sistema nervoso centrale induce un alterazione del trasporto adenosinico e un decremento della sensibilità dei recettori dopaminergici post-sinaptici. Studi condotti su linfociti esposti a ipoxantina mostrano un incremento dell'espressione del recettore DRD5 dopaminergico, varie anomalie dell'espressione del recettore ADORA2A adenosinico e un decremento

dell'espressione del recettore 5-HT_{1A} serotoninergico. Ciò potrebbe supportare l'ipotesi che la patogenesi delle manifestazioni neurologiche di pazienti LND è correlata ad uno squilibrio dei neurotrasmettitori, piuttosto che ad un disturbo isolato riguardante un singolo neurotrasmettitore. Infatti i recettori di adenosina, dopamina e serotonina appartenenti alla superfamiglia dei recettori accoppiati a proteine G, sembrano essere integrati attraverso interazioni recettore-recettore intermembrana (**Garcia et al., 2012; Torres et al., 2016**). Inoltre l'eccesso di ipoxantina altera l'attività Na/K ATPasi in cellule isolate (**Baveresco et al., 2007**), e anche questo dato suggerisce una sua implicazione nella patogenesi delle disfunzioni neurologiche. È stato inoltre evidenziato che in colture cellulari di neuroblastoma con deficit di HGPRT, un modello neuronale di LND, l'ipoxantina altera la morfogenesi delle cellule e ne induce un aumento di proliferazione (**Ma et al., 2001**). Il deficit di altri composti purinici potrebbe costituire una possibile causa dei cambiamenti nella trasduzione del segnale mediata dalle proteine G (**Pinto et al., 2006**). Questa ipotesi è supportata dalla scoperta di cambiamenti nell'espressione e nella funzione dell'isoforma adenilato ciclasi C, come conseguenza del deficit di HGPRT nelle cellule di neuroblastoma (**Kinast et al., 2012**).

1.4 DIAGNOSI

La diagnosi del deficit di HGPRT deve essere supportata da dati clinici, biochimici, enzimatici, molecolari e genetici. Il deficit di HGPRT dovrebbe essere sospettato in pazienti con iperuricemia e uricosuria, con o senza disturbi neurologici. Nonostante questi sintomi siano molto frequenti nella popolazione adulta, la loro manifestazione nei neonati e nei bambini dovrebbe far pensare ad un disordine del metabolismo purinico (**Torres et al., 2011**). Oltre all'acido urico, anche ipoxantina e xantina sono marcatamente alti nel siero e nelle urine dei pazienti LND. Non risulta esserci però una differenza statisticamente significativa di queste tre variabili biochimiche (acido urico, ipoxantina e xantina) tra i pazienti con parziale e quelli con completo deficit di HGPRT.

L'attività enzimatica dell'HGPRT viene valutata negli emolisati e nelle cellule integre come eritrociti e fibroblasti. Nei pazienti LND con completo deficit, l'attività dell'enzima è nulla, mentre nei pazienti con deficit parziale l'attività può variare da 0% a 10% ed è accompagnata da un incremento dell'attività dell'enzima adenina fosforibosil transferasi (APRT). In molti casi è necessario determinare la sequenza genomica del DNA sia del paziente che del portatore, soprattutto quando la mutazione a livello del gene HPRT1 è sconosciuta. Diagnosi prenatali possono essere effettuate su cellule amniotiche ottenute mediante amniocentesi tra la quindicesima e la diciottesima settimana di gestazione oppure sui villi coriali tra la decima e la dodicesima settimana di gestazione (**Torres et al., 2007**).

1.5 TRATTEMENTO

Non esistono ad oggi farmaci che possano prevenire la LND e tanto meno curarla. Il trattamento farmacologico può però aiutare a ridurre e a tenere sotto controllo i sintomi tipici della LND; le terapie per questa malattia sono solo quindi sintomatologiche.

La sovrapproduzione di acido urico può essere controllata con inibitori della xantina ossidasi come allopurinolo, che impediscono la conversione di xantina e ipoxantina in acido urico. Ciò comporta una riduzione dei livelli di acido urico sia nel sangue che nelle urine, prevenendo così nefrolitiasi, gotta, artrite e tofi (**Kelley et al., 1969, Torres et al., 2007, Christie et al., 1982, Kelley et al., 1968**). I cambiamenti biochimici correlati all'assunzione di allopurinolo sono simili sia nei pazienti con un completo deficit di HGPRT che in quelli con deficit parziale e la dose somministrata può variare da 50 a 600 mg al giorno. Si tratta di un farmaco efficace e generalmente sicuro per il trattamento dell'iperproduzione di acido urico nei pazienti LND, ma l'aumento dei livelli di xantina e ipoxantina che ne consegue può indurre alcuni effetti collaterali. L'accumulo di xantina può provocare la formazione di calcoli renali mentre l'eccesso di ipoxantina sembra indurre disturbi neurologici. Una terapia alternativa all'utilizzo di inibitori della xantina ossidasi, ancora in fase di studio, è rappresentata dall'utilizzo di inibitori della purina nucleoside fosforilasi (PNP), che inducono un abbassamento dei livelli di acido urico senza però provocare un aumento dei suoi precursori, ipoxantina e xantina (**Jacomelli et al., 2019**). La mancanza di una precisa comprensione della causa dei disturbi motori e neurologici ha precluso lo sviluppo di terapie utili nel trattamento di tali sintomi. Distonia e spasticità muscolare vengono generalmente trattate con benzodiazepine e inibitori dell'acido gamma-amminobutirrico, come il baclofen. Per migliorare gli stati di ansia e di agitazione, che possono indurre il paziente a comportamenti autolesionisti, vengono somministrate benzodiazepine e carbamazepine. Per il trattamento dei disturbi autolesionisti veri e propri è necessario ricorrere all'utilizzo di restrizioni fisiche, in quanto non esiste ancora un farmaco efficace. Alcuni studi hanno suggerito che il gabapentin potrebbe migliorare i disturbi autolesionisti e nessun effetto collaterale associato al suo utilizzo è stato riscontrato (**McManaman et al., 1999**). Buoni risultati sono stati ottenuti con la stimolazione cerebrale profonda del globo pallido, ed è quindi da considerarsi un metodo promettente per il trattamento dell'autolesionismo e della distonia (**Taira et al., 2003; Cif et al., 2007; Abel et al., 2014; Piedimonte et al., 2015**). Altri trattamenti in fase di studio sono le iniezioni locali di tossina botulinica (**Dabrowski et al., 2005**) e la S-adenosilmetionina.

1.6 MODELLI SPERIMENTALI

A causa della rarità della sindrome di LND e quindi della difficoltà di acquisire tessuti neuronali umani, per lo studio della malattia vengono normalmente utilizzate: cellule periferiche estratte da pazienti LND, linee cellulari neuronali geneticamente modificate o modelli animali (**Scott et al., 2016**). L'analisi dei modelli sperimentali in vitro permette lo studio delle alterazioni morfologiche, metaboliche e genetiche essenziali per approfondire la conoscenza del danno molecolare e del meccanismo patogenico responsabile del fenotipo patologico. La conoscenza della patologia è perciò cresciuta parallelamente allo sviluppo dei modelli LND. A tale scopo sono stati prodotti molteplici modelli cellulari e animali di LND, ognuno con i propri punti di forza e debolezza, rivolti ciascuno ad un determinato aspetto della malattia. I modelli cellulari usati per lo studio della LND si basano principalmente su cellule non neuronali, come eritrociti e linfociti, acquisiti da pazienti LND attraverso prelievi di sangue, oppure su cellule estratte dalla pelle come i fibroblasti (**Jinnah, 2009**). Tali modelli cellulari sono facili da definire e soprattutto presentano una rilevante attinenza con il paziente dal quale derivano. In particolare, l'utilizzo dei fibroblasti nei modelli cellulari in vitro presenta molti vantaggi; si tratta infatti di cellule primarie facilmente reperibili, dinamiche e robuste sia per quanto riguarda la crescita in coltura, la conservazione e il trasporto. Possono, inoltre, essere manipolate geneticamente per via elettroporativa o tramite lentivirus (**Auburger et al., 2011**).

2.SCOPO DELLA TESI

La sindrome di Lesch-Nyhan (LND) è una rara malattia ereditaria X-linked recessiva dovuta al deficit dell'enzima ipoxantina-guanina fosforibosiltransferasi (HGPRT). In condizioni normali tale enzima viene codificato dal gene HPRT1 ma, nel caso di pazienti LND positivi, il gene HPRT1 subisce delle mutazioni inattivanti che causano appunto il deficit di HGPRT. A causa della rarità della malattia e quindi della difficoltà di acquisire tessuti neuronali umani, per lo studio della patologia vengono normalmente utilizzate cellule non-neuronali che possono essere facilmente acquisite da pazienti LND attraverso prelievi di sangue, come eritrociti e linfociti, oppure cellule estratte dalla pelle come i fibroblasti (**Jinnah, 2009**). Genotipicamente i fibroblasti primari di soggetti non affetti da LND rispetto a fibroblasti primari di soggetti positivi alla malattia presentano un'importante differenza: i primi non manifestano mutazioni a livello del gene HPRT1, che quindi codifica correttamente l'enzima HGPRT, al contrario dei fibroblasti LND che invece manifestano mutazioni nel gene e per questo non esprimono l'enzima HGPRT.

Studi di proteomica comparativa effettuati sempre su popolazioni di fibroblasti umani sani e fibroblasti estratti da pazienti LND hanno mostrato che non ci sono però differenze fenotipiche tra i due tipi cellulari. La mancata osservazione di differenze fenotipiche potrebbe però essere dovuta a condizioni di coltura in vitro troppo lontane dalle condizioni fisiologiche della patologia.

Lo scopo del seguente lavoro è quindi quello di stabilire in primo luogo quali sono le condizioni di coltura che più mimano le condizioni fisiologiche della patologia (principalmente alti livelli di ipoxantina, xantina e acido urico), di allestire poi un modello cellulare basato su fibroblasti primari e caratterizzarlo andando ad osservare come tali cellule rispondono alle condizioni di crescita scelte, attraverso la valutazione dei seguenti parametri: proliferazione e vitalità, apoptosi, stress ossidativo ed infine carica energetica.

3. MATERIALI E METODI

3.1 MATERIALI

I materiali utilizzati nel corso degli esperimenti e i rispettivi produttori.

MATERIALI	PRODUTTORI
Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM)	Euroclone
Siero fetale suino (FCS)	
MUSE™ Count et Viability Reagent	Merck Millipore
MUSE™ Annexin V et Dead Cell Kit User's Guide	
MUSE™ Oxidative Stress Kit User's Guide	
Trypsina	Sigma
Tampone fosfato salino (PBS)	
Penicillina e streptomina	
Ippoxantina	
Xantina	
Acido urico	
Acido perclorico	
Carbonato di potassio	
Metanolo	
Tetrabuttilammoniocloruro (TBA)	
Fosfato di potassio	
Iidrossido di Sodio	

Albumina serica bovina (BSA)	Thermoscientific
------------------------------	------------------

Nel corso di tutti gli esperimenti condotti durante questo studio, l'acqua utilizzata è di qualità Milli-Q, ottenuta grazie al sistema della Merck Millipore (Vimodrone, Milano, I), utilizzata alla conducibilità di 18,2 mΩ.

3.2 ESTRAZIONE E COLTURA DI FIBROBLASTI PRIMARI

In questo studio sono state utilizzate colture primarie di fibroblasti umani sia sani che affetti da LND, isolati da biopsie cutanee. L'isolamento dei fibroblasti dalle biopsie cutanee deve avvenire entro un'ora dall'escissione; così gli espianti cutanei sono stati velocemente depidermizzati con dispasi (14 U/ml) per 2 ore a 37°C e successivamente sciolti in collagenasi III (2,4 U/ml) per 30 minuti. I fibroblasti ottenuti sono stati coltivati in piastre di Petri da 10 cm² in terreno completo costituito da 89% di Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), 10% di siero fetale bovino (FBS) e 1% di streptomycina (100 mg/ml) / penicillina (100mg/ml) e incubati a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂, fino ad uno stato di confluenza. Raggiunta la confluenza i fibroblasti sono stati lavati con PBS sia per eliminare le cellule morte che per rimuovere tutto il terreno che potrebbe inattivare la tripsina, aggiunta successivamente per staccare le cellule. I fibroblasti così staccati sono stati utilizzati nei vari esperimenti.

3.2.1 *Mtt*

La vitalità dei fibroblasti primari è stata valutata con il saggio dell'MTT (bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio).

I fibroblasti sono stati seminati in piastre da 96 pozzetti in terreno al 10% di siero ad una concentrazione di 5x10³ cellule/pozzetto. Al raggiungimento dell'85% di confluenza i fibroblasti sono stati trattati con:

- Terreno completo al 10% di siero
- Terreno completo al 5% di siero
- Terreno completo all'1% di siero

La durata dei trattamenti è di 48h e 72h. Al termine di questi sono stati aggiunti 200μL di MTT (5mg/ml in PBS) in ogni pozzetto e incubati a 37°C. L'anello tetrazolico dell'MTT (sostanza di colore giallo) in presenza di cellule vive viene ridotto dall'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi a formazano (sale blu). Il formazano rimane localizzato all'interno

dei mitocondri, quindi deve essere solubilizzato ed estratto dalle cellule. A tale scopo, dopo 3h i pozzetti sono stati portati a secco e le cellule solubilizzate in 100 μ L di DMSO (solvente di estrazione). È stata poi determinata la densità ottica delle soluzioni ad una lunghezza d'onda di 570nm con un lettore di piastre; questo perché l'intensità delle colorazioni delle soluzioni è direttamente proporzionale alla concentrazione di formazano, che è quindi espressione della vitalità cellulare.

3.2.2 Trattamenti

I fibroblasti primari sani e i fibroblasti LND per tutti i saggi cellulari e biochimici, ad eccezione del MTT test, sono stati seminati in piastre da sei pozzetti da 9,5cm² in terreno completo ad una concentrazione di 4x10⁵ cellule/piastra. Al raggiungimento del 85% di confluenza, i fibroblasti sono stati trattati in terreno all' 1% di siero con:

- Ipoxantina concentrazione finale 100 μ M
- Xantina concentrazione finale 200 μ M
- Ipoxantina concentrazione finale 100 μ M + Xantina concentrazione finale 200 μ M
- Acido Urico concentrazione finale 450 μ M
- Acido Urico concentrazione finale 900 μ M
- Acido Urico 450 μ M + Ipoxantina 100 μ M + Xantina 200 μ M
- Acido Urico 900 μ M + Ipoxantina 100 μ M + Xantina 200 μ M

Come controlli sono stati utilizzati fibroblasti incubati con solo terreno completo, corrispondente al 10% di siero, e con solo terreno all'1% di siero. Le concentrazioni di ipoxantina, xantina e acido urico sono state estrapolate da saggi biochimici su estratti di plasma di pazienti LND. La durata di tutti i trattamenti è di 48h.

3.3 SAGGI CELLULARI

3.3.1 Muse System

Il Muse® System è uno strumento compatto caratterizzato da un analizzatore di cellule, da un software e da reagenti ottimizzati.

Il Muse Cell Analyzer (Figura 3.1) utilizza un sistema di rilevamento fluorescente miniaturizzato e una tecnologia microcapillare per fornire un'analisi quantitativa delle cellule sia in sospensione che aderenti con diametro da 2 a 60µm.



FIGURA 3.1 Muse Cell Analyzer

Permette di effettuare analisi cellulari sulla base della citometria di flusso, ma ha dimensioni molto più piccole rispetto ad un classico citometro a flusso. La citometria a flusso utilizza un fascio di luce laser per la rilevazione, il conteggio, la caratterizzazione e la separazione di cellule in sospensione (Figura 3.2). Il Muse Cell Analyzer è in grado di misurare contemporaneamente un massimo di tre parametri cellulari derivanti dall'attraversamento di un fascio di luce laser su singole cellule; le cellule, infatti, fluiscono velocemente e singolarmente attraverso il raggio di luce che le colpisce.

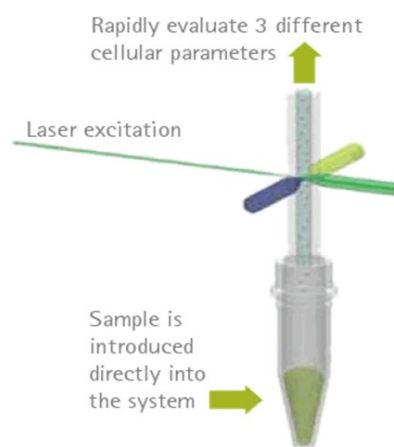


Figura 3.2 Citometria di flusso.

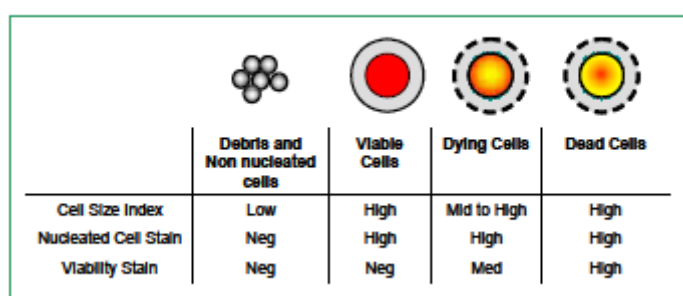
3.3.2 Analisi della vitalità e proliferazione cellulare mediante Muse™

Count and Viability kit

Per valutare come i trattamenti influenzano la vitalità e la proliferazione delle cellule è stato utilizzato il Muse™ count and viability kit. Il saggio permette di effettuare un'analisi quantitativa delle cellule vive e morte, fornendo:

- Conta delle cellule totali (cell/ml)
- Conta delle cellule vitali (cell/ml)
- % di vitalità del campione

Il reagente Muse™ count and viability è costituito da due coloranti fluorescenti, che permettono di differenziare cellule vitali e non, basandosi sulla diversa permeabilità delle cellule ai due coloranti che legano il DNA. Un colorante si lega al DNA delle cellule che hanno perso l'integrità di membrana, permettendo così al colorante di evidenziare i nuclei di cellule morte o che stanno morendo. Questo parametro è visualizzato come VITALITÀ ed è utilizzato per discriminare cellule vive (non colorate) da cellule morte (colorate). L'altro colorante, permeabile alle membrane, si lega al DNA di tutte le cellule con nucleo. Questo parametro è visualizzato come CELLULE NUCLEATE ed è utilizzato per discriminare cellule con nucleo da debris e cellule non-nucleate. Per determinare un'accurata conta delle cellule totali il Muse™ System utilizza anche le dimensioni cellulari per distinguere debris da cellule (Figura 3.3).



	Debris and Non nucleated cells	Viable Cells	Dying Cells	Dead Cells
Cell Size Index	Low	High	Mid to High	High
Nucleated Cell Stain	Neg	High	High	High
Viability Stain	Neg	Neg	Med	High

Figura 3.3: Analisi delle popolazioni cellulari.

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI:

Al termine delle 48h di incubazione i fibroblasti sani e LND trattati e i rispettivi controlli sono stati staccati dalle piastre con tripsina e risospesi nel corrispettivo terreno di coltura. Per un'accurata conta cellulare, le concentrazioni cellulari finali dei campioni devono essere comprese tra 1×10^4 e 5×10^5 cells/ml. Così le cellule sono state contate con lo Scepter™

Cell Counter, per stabilire se la concentrazione cellulare dei campioni rientrava nel suddetto parametro. Il protocollo per il Muse™ count and viability prevede poi di aggiungere 50µL della sospensione cellulare a 450µL di count and viability reagent e di incubare per 5 minuti a temperatura ambiente per permettere alle cellule di colorarsi. Infine, i campioni sono stati analizzati al Muse™ Cell Analyzer (Figura 3.4).

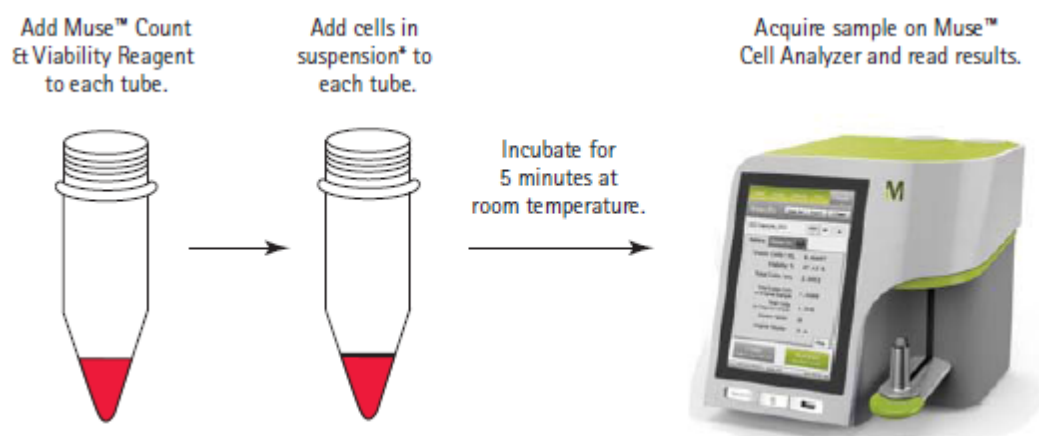


Figura 3.4 Sintesi del protocollo per l'utilizzo del Muse™ Count and Viability Kit.

3.3.3 Analisi dell'apoptosi cellulare mediante Muse™ Annexin V et Dead Cell kit

Per valutare come i trattamenti influenzano il processo apoptotico cellulare è stato utilizzato il Muse™ Annexin V et Dead Cell Kit. Il saggio permette di effettuare un'analisi quantitativa delle cellule vive, delle cellule allo stadio iniziale e finale di apoptosi e delle cellule morte, fornendo:

- Concentrazioni (cells/ml) cellulari di ogni popolazione
- % cellulare di ogni popolazione

L'apoptosi, o morte cellulare programmata, è un'importante via regolatoria della crescita e della proliferazione cellulare. Il saggio si basa sull'utilizzo dell'Annexina V, una proteina calcio-dipendente legante i fosfolipidi, con un'elevata affinità per la fosfatidilserina (PS). La PS è un componente delle membrane cellulari normalmente localizzato nel lato interno delle membrane (Figura 3.5). Nello stadio iniziale del processo apoptotico, le molecole di PS vengono trasferite sulla superficie esterna della membrana cellulare, dove l'Annexina V può rapidamente legarsi. L'Annexina V individua così le molecole di PS presenti sulle membrane delle cellule apoptotiche. Nel reagent del Muse™ Annexin V et Dead Cell Kit,

oltre all'Annexina V, è presente anche un marker per cellule morte (7-AAD) utilizzato come indicatore dell'integrità strutturale delle membrane cellulari. Il marker è escluso dalle cellule vive e dalle cellule allo stadio iniziale di apoptosi.

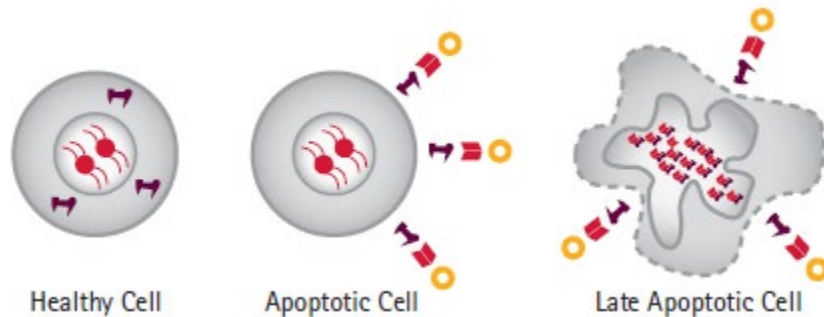


Figura 3.5: L'utilizzo combinato dell'Annexin V fluorescente e il 7 AAD permeabile alle membrane, legante il DNA, permette di distinguere cellule allo stadio iniziale di apoptosi e allo stadio finale di apoptosi.

Quattro popolazioni cellulari possono così essere distinte con tale saggio:

- Cellule non apoptotiche: Annexina V (-) e 7-AAD (-)
- Cellule allo stadio iniziale di apoptosi: Annexina V (+) e 7-AAD (-)
- Cellule allo stadio finale di apoptosi: Annexina V (+) e 7-AAD (+)
- Detriti cellulari e nucleari: Annexina V (-) e 7-AAD (+)

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI:

Al termine delle 48h di incubazione i fibroblasti sani e LND trattati e i rispettivi controlli sono stati staccati dalle piastre con tripsina e risospesi nel corrispettivo terreno di coltura. Per una corretta lettura, la concentrazione cellulare dei campioni deve essere compresa tra 1×10^5 e 1×10^7 cells/ml. Il protocollo per il Muse™ Annexin V et Dead Cell prevede poi di aggiungere 100µL della sospensione cellulare a 100µL del Muse™ Annexin V et Dead Cell reagent e di incubare i campioni per 20 minuti a temperatura ambiente al buio. Infine, i campioni sono stati analizzati con il Muse™ Cell Analyzer (Figura 3.6).

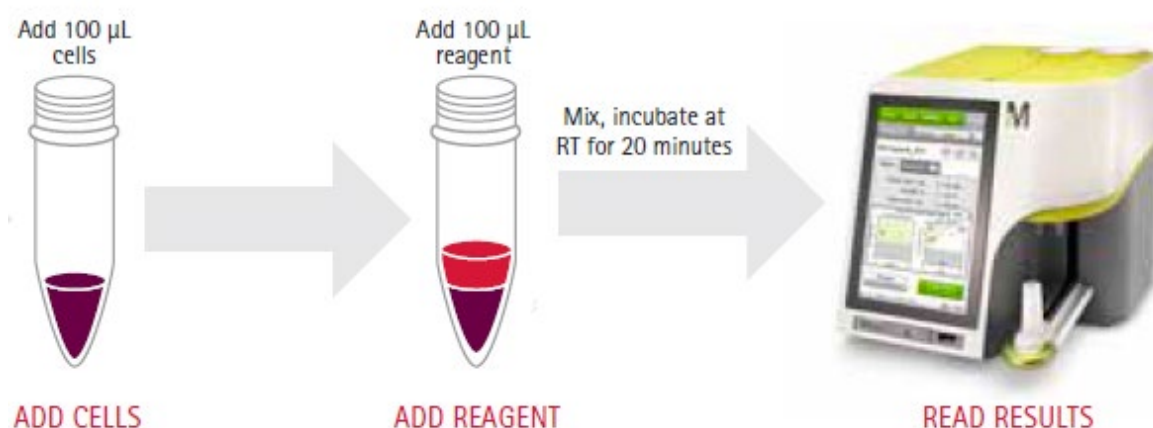


Figura 3.6: Sintesi del protocollo per l'utilizzo del Muse™ Annexin V et Dead Cell kit .

3.3.4 Analisi dello stress ossidativo cellulare mediante Muse™ Oxidative Stress kit

Per valutare i livelli di stress ossidativo cellulare è stato utilizzato il Muse® Oxidative Stress Kit. Il saggio permette di effettuare un'analisi quantitativa delle cellule che hanno subito stress ossidativo, basandosi sulla rilevazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS). Tale test fornisce la percentuale delle cellule ROS negative e la percentuale delle cellule ROS positive. Il saggio si basa sull'utilizzo del diidroetidio (DHE), un marcatore specifico per la determinazione delle specie radicaliche dell'ossigeno, in particolare per l'anione superossido. Tale reagente è permeabile alle cellule, e una volta all'interno delle cellule reagisce con l'anione superossido, se presente, trasformandosi in etidio (DE) ed esibisce fluorescenza nel rosso ad una lunghezza d'onda di 605nm. Lo spostamento dell'intensità di fluorescenza è direttamente proporzionale alla quantità dell'anione superossido contenuto nelle cellule.

Due popolazioni cellulari possono così essere distinte:

- ROS (-): cellule vive
- ROS (+): cellule presentanti ROS

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI:

Al termine delle 48h di incubazione i fibroblasti sani e LND trattati e i rispettivi controlli sono stati staccati dalle piastre con tripsina, lavati e risposi in 1x Assay Buffer. Per una corretta lettura, la concentrazione cellulare finale dei campioni deve essere compresa tra

1×10^6 e 1×10^7 cells/ml. Il protocollo per il Muse® Oxidative Stress prevede la preparazione al momento dell'utilizzo della Intermediate Solution (Muse® Oxidative Stress Reagent diluito 1:100 in 1x Assay Buffer) e della Working Solution (Intermediate Solution diluita 1:80 in 1x Assay Buffer). Dopo aver aggiunto 190 μ L della Working Solution a 10 μ L di sospensione cellulare, i campioni sono stati incubati per 30 minuti a 37°C ed infine analizzati con Muse® Cell Analyser.

3.4 SAGGI BIOCHIMICI

3.4.1 HPLC

La cromatografia liquida ad alta prestazione (High Performance Liquid Chromatography, un tempo nota come High-Pressure Liquid Chromatography, ovvero cromatografia liquida ad alta pressione), più semplicemente nota con l'acronimo inglese HPLC è un tipo di cromatografia liquida che rappresenta l'evoluzione strumentale della cromatografia in fase liquida su colonna classica. Si tratta di una tecnica cromatografica che permette di separare due o più composti presenti in un solvente sfruttando l'equilibrio di affinità tra una "fase stazionaria" posta all'interno della colonna cromatografica e una "fase mobile" che fluisce attraverso essa. Una sostanza più affine alla fase stazionaria rispetto alla fase mobile impiega un tempo maggiore a percorrere la colonna cromatografica (tempo di ritenzione), rispetto ad una sostanza con bassa affinità per la fase stazionaria ed alta per la fase mobile. Il campione da analizzare è iniettato all'inizio della colonna cromatografica dove è "spinto" attraverso la fase stazionaria dalla fase mobile applicando pressioni dell'ordine delle centinaia di atmosfere. Per ottenere un'elevata efficienza nella separazione è necessario che le dimensioni delle particelle del riempimento siano molto ridotte (di solito hanno diametri compresi da 3 a 10 μ m), per questo motivo è indispensabile applicare un'elevata pressione se si vuole mantenere una ragionevole velocità di flusso dell'eluente e quindi un tempo di analisi adeguato. Alla fine della colonna è applicato un rilevatore (IR, UV-VIS, spettrofluorimetrico o spettrometro di massa) e un calcolatore che permettono un'analisi in continuo dell'uscita della colonna e quindi di poter identificare e quantificare le sostanze iniettate tramite apposito cromatogramma.

In questo studio l'apparato HPLC è un System Gold modulo 125S accoppiato ad un rilevatore a serie di diodi modulo 168. La colonna è una Phenomenex C18 RP

(75mmX4.6mm, 3 μ m) equipaggiata con una colonna in linea Phenomenex Security Guard (4X3mm) (Figura 3.7).



Figura 3.7: **Strumento HPLC.**

Tutte le corse cromatografiche sono state eseguite a temperatura ambiente con un flusso pari a 1ml/min; l'assorbanza è stata monitorata a 260 e 280 nm. Tutti i campioni sono stati iniettati con un volume pari a 20 μ L e tutte le soluzioni standard (nucleotidi guanilici e adenilici, triptofano, ipoxantina, xantina e acido urico) sono state preparate in acqua deionizzata. Da un punto di vista qualitativo l'identità dei picchi cromatografici è stata determinata utilizzando il tempo di ritenzione, i rapporti delle aree dei due canali, la co-eluzione con standard interni e gli spettri ottenuti con il rivelatore a serie di diodi. Per tutte le sostanze di interesse sono state fatte rette di calibrazioni che hanno permesso di associare ad ogni area dei picchi ottenuti la corrispondente concentrazione.

3.4.2 Analisi dei terreni condizionati mediante HPLC

Al termine di ogni trattamento i terreni trattati sono stati analizzati all'HPLC, previa preparazione degli estratti acidi, ottenuti aggiungendo 200 μ L di acido perclorico 0,6 N a 200 μ L di terreno (volume su volume). Le soluzioni così ottenute sono state centrifugate per 5 minuti a 21000xg. I surnatanti sono stati infine neutralizzati con carbonato di potassio 3,5 M, centrifugati per 5 minuti a 21000xg e i surnatanti limpidi analizzati all'HPLC.

L'analisi è stata eseguita utilizzando una fase mobile costituita da fosfato di potassio 0,01M (eluente A) a pH 5,5 e metanolo (eluente B). Il modello di eluizione è così caratterizzato: fase isocratica a 100% di A per 4 minuti, poi si ha il raggiungimento del 21% di B in 4 minuti

seguito dal raggiungimento del 30% di B mantenuto per 3 minuti ed infine il ritorno alle condizioni iniziali in 7 minuti. Il tempo di esecuzione totale della corsa cromatografica è di 18 minuti.

3.4.3 Analisi dei fibroblasti mediante HPLC

Al termine di ogni trattamento i fibroblasti sono stati analizzati all'HPLC, previa preparazione degli estratti acidi, ottenuti screperando le cellule con due aggiunte consecutive di 100 µL di acido perclorico 0,6N. Le soluzioni così ottenute sono state centrifugate per 5 minuti a 21000xg. I surnatanti sono stati infine neutralizzati con carbonato di potassio 3,5 M, centrifugati per 5 minuti a 21000xg e i surnatanti limpidi analizzati all'HPLC, mentre sui pellet sono state dosate le proteine con il metodo Bradford. L'analisi HPLC è stata eseguita utilizzando una fase mobile costituita da fosfato di potassio 0,1 M contenente fosfato di tetrabutylammonio 6mM (TBA) a pH di 5,5 (eluente A) e metanolo (eluente B). Il modello di eluizione è così caratterizzato: fase isocratica a 5% di B mantenuto per 5 minuti, poi si ha il raggiungimento del 20% di B in 1 minuto, mantenuto per 6 minuti, e seguito dal raggiungimento del 30% di B, mantenuto per 2 minuti; infine si ha il ritorno alle condizioni iniziali.

4.RISULTATI

4.1 SCELTA DEL TERRENO DI COLTURA

Per un'ottimale crescita delle cellule in coltura, viene normalmente utilizzato un terreno completo al 10% di siero (FCS 10%). Il siero (FCS) è una miscela complessa di proteine plasmatiche, fattori di crescita, minerali e metaboliti. Tra questi sono presenti anche acido urico, ipoxantina e xantina caratteristici della sindrome di LND . Tali metaboliti sono presenti in quantità variabili nel siero, dipendenti sia dal produttore che dal lotto.

In questo studio, per mimare le condizioni fisiologiche della sindrome di Lesch-Nyhan e valutare se le differenze fenotipiche tra i fibroblasti LND e i fibroblasti sani sono influenzate dalle condizioni di coltura, è stato necessario scegliere un terreno di coltura cellulare con una bassa percentuale di siero, in modo tale da azzerare le concentrazioni di ipoxantina, xantina e acido urico presenti, così da riuscire a controllare le esatte quantità aggiunte di questi metaboliti al terreno e minimizzare il contributo del siero al modello cellulare.

In primo luogo, per stabilire la composizione del terreno all'10% di siero (FCS 10%) e di quello all'1% (FCS 1%), e soprattutto per valutare e quantificare la presenza di ipoxantina, xantina e acido urico nei due terreni, è stata effettuata un'analisi all'HPLC (tabella 4.1). I risultati ottenuti mostrano che nel terreno all'1% di siero vi è un effettivo annullamento dei metaboliti di accumulo della sindrome di Lesch-Nyhan.

TERRENI NON CONDIZIONATI	Acido urico	Ipoxantina	Xantina
FCS 10%	6.25 (± 0.33)	8.12 (± 0.41)	18.13 (± 0.96)
FCS 1%	Nd	0,93 (± 0.04)	nd
FCS 1% + AC.URICO 450 + IPOX+XAN	438.28 (± 21.9)	103.31 (± 5.26)	222.42 (± 11.12)
FCS 1% + AC.URICO 900 + IPOX+XAN	933.80 (± 47.62)	109.17 (± 5.89)	207.24 (± 10.98)

TABELLA 4.1: **Analisi dei terreni non condizionati all'HPLC.** I dati sono espressi in $\mu\text{mol/l}$ e sono riportati come la media $\pm$ DS.

Contemporaneamente, per determinare l'effetto a livello cellulare della bassa concentrazione di siero e per stabilire i tempi di incubazioni più opportuni tra 48h e 72h, è stato effettuato il saggio dell'MTT su fibroblasti sani (HFB). Tale saggio ha permesso di valutare quanto la riduzione di siero e i tempi di incubazione influenzano la proliferazione cellulare rispetto al controllo (FCS 10%). I risultati ottenuti hanno mostrato che i fibroblasti cresciuti in terreno all'1% di siero subiscono una riduzione della proliferazione cellulare pari a circa la metà (55%) rispetto a quella del controllo (terreno al 10% di siero) e che non ci sono significative differenze tra le incubazioni a 48h (55%) e 72h (58%) (figura 4.1).

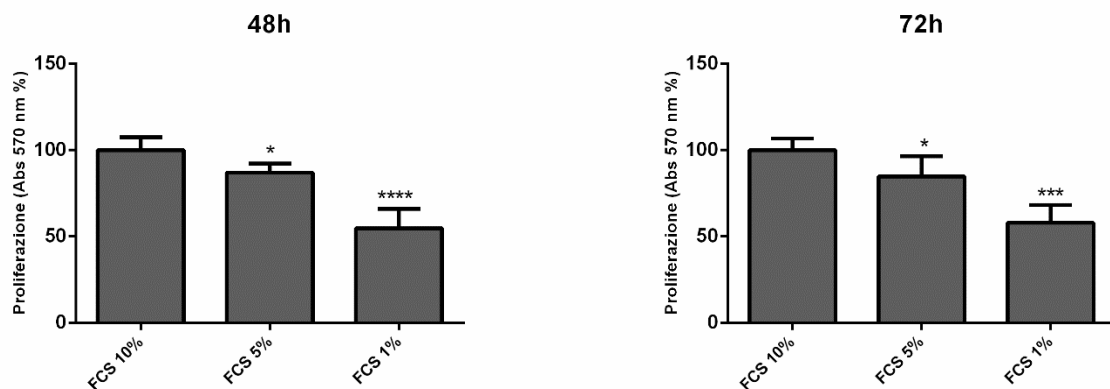
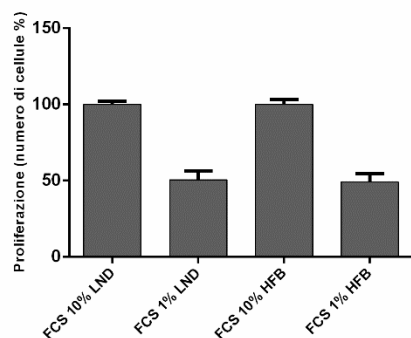


FIGURA 4.1: **Valutazione della vitalità degli HFB mediante il test MTT.** I dati sono espressi come percentuale rispetto al controllo con terreno di coltura al 10% di siero (FCS 10%) e sono espressi come la media $\pm$ DS. L'analisi statistica (*t*-student) è stata eseguita tramite GraphPad Prism 6 (GraphPad Software San Diego, CA, USA). Valori di $p < 0,05$ sono considerati statisticamente significativi.

L'effetto delle condizioni di coltura (bassa percentuale di siero) è stato confermato negli HFB con una tecnica alternativa basata sulla citometria a flusso: il Muse™ count and viability kit che valuta simultaneamente la proliferazione cellulare e la vitalità cellulare. Gli stessi test sono stati condotti anche nei fibroblasti isolati da un paziente affetto da LND (LND). I risultati ottenuti hanno confermato il dato di proliferazione visto con il saggio dell'MTT. Infatti, sia i fibroblasti LND che gli HFB coltivati in terreno all'1% di siero rispetto al controllo risultano circa la metà, 51% e 50% rispettivamente (figura 4.2-A).

La vitalità dei fibroblasti LND e HFB non risulta essere alterata dalla riduzione di siero. La percentuale di vitalità in terreno al 10% di siero è pari al 98,10% per gli LND e pari al 96,26% per gli HFB, mentre per il terreno all'1% la vitalità è pari al 98,07% per gli LND e pari al 96,06% per gli HFB (figura 4.2-B).

A



B

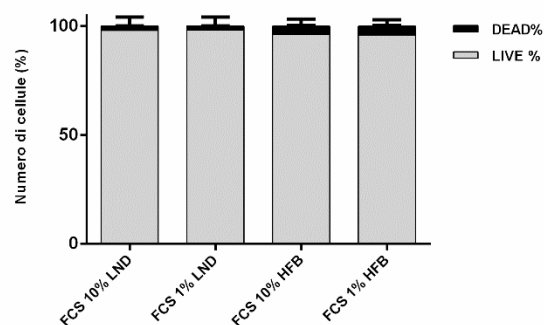


FIGURA 4.2: Analisi della proliferazione (A) e della vitalità (B) degli LND e degli HFB mediante Muse™ count and viability kit. I dati sono stati acquisiti mediante il Muse Cell Analyzer. (A) I dati sono espressi come percentuale rispetto al controllo con terreno di coltura al 10% di siero (FCS 10%) sia per gli LND che per gli HFB, e sono espressi come la media $\pm$ DS. (B) I dati sono espressi come percentuale relativa rispetto al totale della popolazione cellulare.

Per la caratterizzazione del modello cellulare è stato così scelto di utilizzare un terreno di coltura all'1% di siero e 48h come tempo di incubazione dei trattamenti (Tabella 4.1).

4.2 PROLIFERAZIONE E VITALITÀ

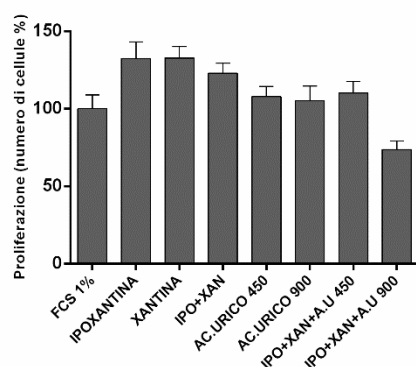
Per valutare gli effetti dell'aggiunta al mezzo di coltura dei metaboliti caratteristici della Sindrome di Lesch-Nyhan alla concentrazione di accumulo, sono stati monitorati alcuni parametri cellulari quali proliferazione, vitalità e apoptosi (par 4.3). Gli esperimenti sono stati condotti sia su fibroblasti isolati da un paziente (LND) che su un controllo sano (HFB), ed è stato utilizzato il Muse™ count and viability kit.

4.2.1 LND

I risultati ottenuti mostrano che ipoxantina e xantina sia singolarmente che in combinazione inducono un leggero aumento di proliferazione degli LND rispetto al controllo (terreno all'1% di siero), con una percentuale di proliferazione pari al 133,38% per ipoxantina, 132,42% per xantina e 126,16% in combinazione (figura 4.3-A). L'acido urico sia alla concentrazione finale di 450 μ M che 900 μ M non altera la proliferazione cellulare in quanto le percentuali di proliferazione sono pari al 105% e al 102% rispettivamente. Anche il trattamento combinato con ipoxantina, xantina e acido urico 450 μ M non influenza la proliferazione cellulare (110,35%) in maniera statisticamente significativa. Al contrario, il trattamento con ipoxantina, xantina e acido urico 900 μ M provoca una riduzione di proliferazione con una percentuale di proliferazione pari al 73,57% rispetto al controllo. Quindi, i trattamenti nel complesso non sembrano influenzare negativamente la proliferazione cellulare in quanto non ci sono differenze significative tra il controllo (FCS 1%) e trattati, ad eccezione del trattamento con ipoxantina, xantina e acido urico 900 μ mol che sembra inibire la proliferazione del 26,43%.

I risultati relativi la vitalità mostrano inoltre che i vari trattamenti non influenzano la vitalità dei fibroblasti LND, infatti le percentuali di vitalità dei campioni trattati non differiscono dal controllo e risultano tutte omogenee; si mantengono tutte nell'intorno tra il 96% e il 98% di vitalità (figura 4.3-B).

A



B

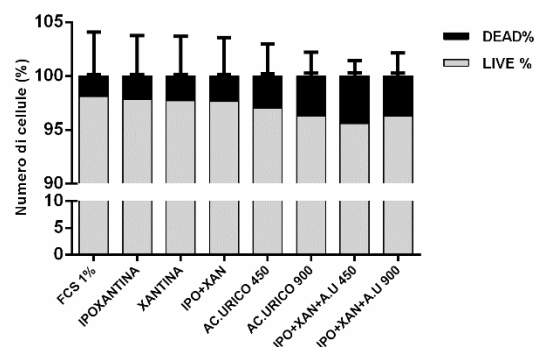
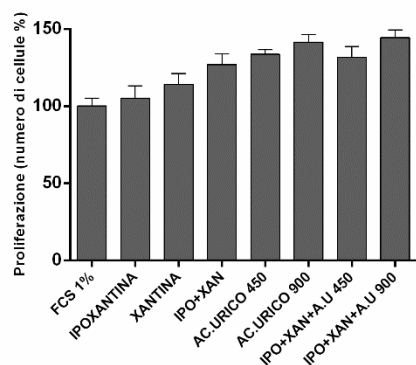


FIGURA 4.3: **Analisi della proliferazione (A) e della vitalità (B) degli LND mediante Muse™ count and viability kit.** I dati sono stati acquisiti mediante il Muse Cell Analyzer. (A) I dati sono espressi come percentuale rispetto al controllo con terreno di coltura al 1% di siero (FCS 1%) e sono espressi come la media $\pm$ DS. (B) I dati sono espressi come percentuale relativa rispetto al totale della popolazione cellulare.

4.2.2 HFB

I risultati ottenuti mostrano che ipoxantina e xantina sia singolarmente che in combinazione inducono un leggero aumento di proliferazione degli HFB, rispetto al controllo (terreno all'1% di siero), con una percentuale di proliferazione pari al 105,22% per ipoxantina, 114,18% per xantina e 126,87% per la combinazione delle due (figura 4.4-A). Anche l'acido urico sia alla concentrazione finale di 450 μ M che 900 μ M aumenta leggermente la proliferazione con una percentuale pari al 133,58% e 141,42% rispettivamente. I trattamenti in combinazione con ipoxantina, xantina e acido urico 450 μ M e 900 μ M inducono un aumento della proliferazione cellulare, rimanendo in linea con gli altri trattamenti, con percentuali di proliferazione pari a 131,72% e 144,4% rispettivamente. Quindi, i trattamenti nel complesso non influenzano la proliferazione cellulare in quanto non ci sono differenze significative tra il controllo (FCS 1%) e trattati. I risultati circa la vitalità mostrano inoltre che i vari trattamenti non influenzano la vitalità degli HFB, infatti le percentuali di vitalità dei campioni sono omogenee, e si mantengono tutte nell'intorno tra il 94,38% e il 98,59% di vitalità (figura 4.4-B).

A



B

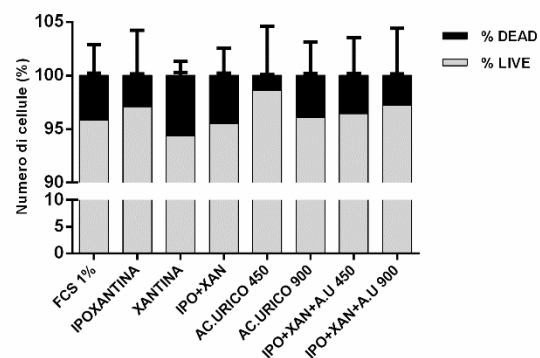


FIGURA 4.4: Analisi della proliferazione (A) e della vitalità (B) degli HFB mediante Muse™ count and viability kit. I dati sono stati acquisiti mediante il Muse Cell Analyzer. (A) I dati sono espressi come percentuale rispetto al controllo con terreno di coltura al 1% di siero (FCS 1%) e sono espressi come la media $\pm$ DS. (B) I dati sono espressi come percentuale relativa rispetto al totale della popolazione cellulare.

4.3 APOPTOSI

Per valutare se i trattamenti inducono apoptosi nei fibroblasti LND o HFB è stato utilizzato il Muse™ Annexin V et Dead Cell Kit. Tale saggio permette di riconoscere quattro popolazioni cellulari: cellule vive, cellule allo stadio iniziale e finale di apoptosi, e cellule morte.

4.3.1 LND

I risultati ottenuti mostrano che non ci sono differenze statisticamente significative tra gli LND incubati in terreno al 10% di siero e quelli incubati in terreno all'1% di siero, infatti le percentuali di cellule apoptotiche sono 3,5% e 2,5% rispettivamente. Anche per i trattamenti non si osservano differenze statisticamente significative, e le percentuali di cellule apoptiche sono comprese tra il 2,0 % (valore minimo osservato per l'ipoxantina 100μM) e il 4,5% (vaore massimo osservato per l'acido urico 900μM) (fugura 4.5).

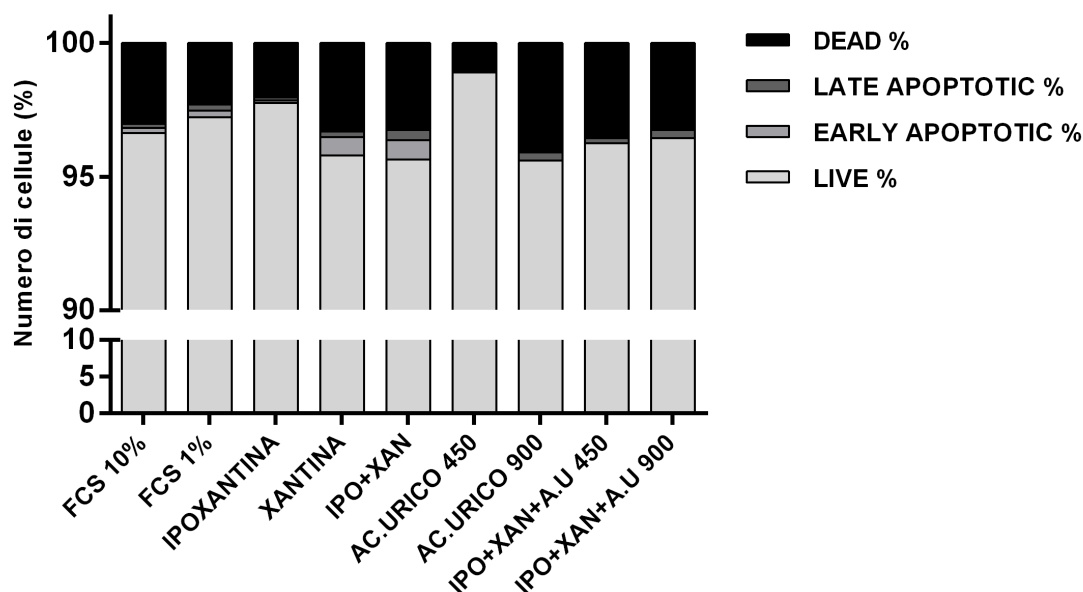


FIGURA 4.5: Analisi dell'apoptosi cellulare degli LND mediante Muse™ Annexin V et Dead Cell Kit. I dati sono stati acquisiti mediante il Muse Cell Analyzer.

4.3.2 HFB

Anche per gli HFB i risultati ottenuti mostrano che non ci sono differenze statisticamente significative tra gli HFB incubati in terreno al 10% di siero e quelli incubati in terreno all'1% di siero, infatti le percentuali di cellule apoptotiche sono 5% e 5,5% rispettivamente. Anche per i trattamenti non si osservano differenze statisticamente significative, e le percentuali di cellule apoptotiche sono comprese tra il 2,5% (valore minimo osservato per l'acido urico 450 μ M) e l'8,5% (valore massimo osservato per la xantina 200 μ M) (figura 4.6).

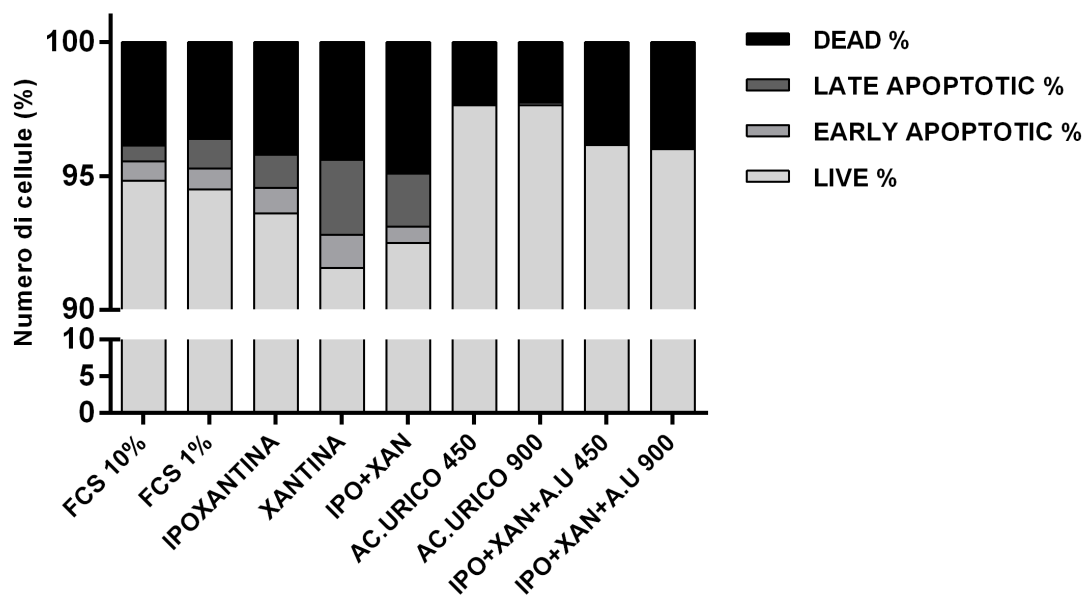


FIGURA 4.6: Analisi dell'apoptosi cellulare degli HFB mediante Muse™ Annexin V et Dead Cell Kit. I dati sono stati acquisiti mediante il Muse Cell Analyzer.

4.4 STRESS OSSIDATIVO

Lo stress ossidativo è una condizione patologica causata dalla rottura dell'equilibrio fisiologico tra le sostanze ossidanti, tra cui le specie reattive dell'ossigeno (ROS), e il sistema di difesa antiossidante. I ROS comprendono O_2^- , H_2O_2 e $OH^\cdot$. Queste molecole sono considerate radicali primari, che nonostante l'emivita estremamente breve (tranne che per il H_2O_2), reagiscono con le macromolecole compromettendone la funzione biologica. La rivelazione dei ROS, dunque, permette di valutare l'alterazione dello stato redox della cellula.

Per valutare se ipoxantina, xantina e acido urico inducono stress ossidativo alle colture primarie dei fibroblasti LND e HFB, è stato utilizzato il Muse® Oxidative Stress Kit. Il saggio permette la misurazione quantitativa della popolazione cellulare soggetta a stress ossidativo e fornisce la percentuale relativa delle cellule positive e negative ai ROS.

4.4.1 LND

I risultati ottenuti mostrano come la riduzione del siero nel mezzo di coltura diminuisca (di circa il 10%) lo stato di stress nei fibroblasti LND (figura 4.7). Infatti, le cellule ROS(+) negli LND incubati in FCS10% sono il 48%, e scendono al 38% negli LND coltivati in FCS 1%.

Il trattamento con ipoxantina non aumenta il numero di cellule positive ai ROS rispetto al controllo (FCS1%), mentre la xantina sia singolarmente che in combinazione all'ipoxantina aumenta leggermente il livello di stress ossidativo con percentuali pari a 47% e 44% di cellule ROS(+) rispettivamente.

Quando le cellule sono trattate con acido urico, si osserva l'aumento più marcato dei livelli di stress ossidativo. L'acido urico alla concentrazione finale di 450 μ M presenta una percentuale di cellule ROS(+) pari a 47% (10% in più rispetto al controllo), mentre quello alla concentrazione finale di 900 μ M presenta una percentuale di cellule ROS(+) pari al 52% (15% in più rispetto al controllo). L'aggiunta di ipoxantina e xantina all'acido urico sia alla concentrazione finale di 450 μ M che a quella di 900 μ M, aumenta ulteriormente i livelli di stress ossidativo, con percentuali di cellule ROS(+) pari a 59% e a 62% rispettivamente.

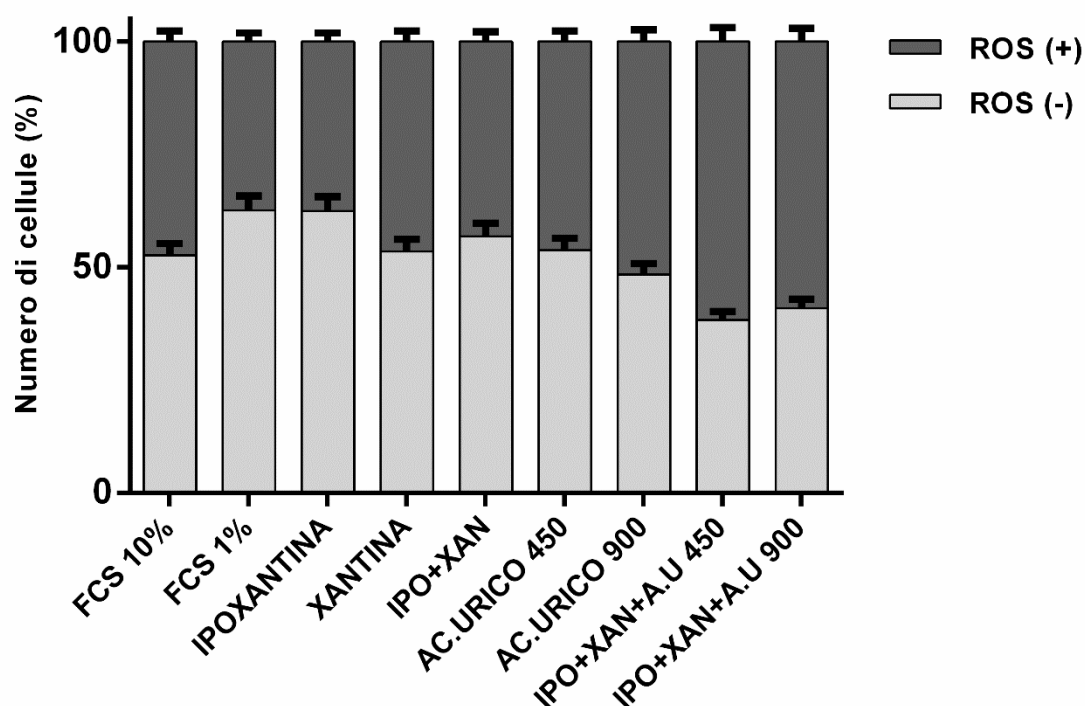


FIGURA 4.7: Analisi dello stress ossidativo mediante Muse® Oxidative Stress Kit. I dati sono stati acquisiti mediante il Muse Cell Analyzer.

4.4.2 HFB

La riduzione di siero nel mezzo di coltura non altera lo stato ossidativo degli HFB. Infatti le cellule ROS positive, negli HFB incubati in FCS 10%, sono il 13%, mentre negli HFB incubati in FCS 1% sono l'11% (figura 4.8). L'aggiunta di ipoxantina al terreno di coltura non altera i livelli di stress ossidativo, in quanto il numero di cellule ROS positive è pari al 13%. Al contrario l'aggiunta di xantina, provoca un leggero aumento del numero di cellule ROS positive che sale al 20%. Il trattamento combinato di ipoxantina e xantina non altera i livelli di stress ossidativo con una percentuale di cellule ROS positive pari al 12%. Anche l'acido urico sia alla concentrazione finale di 450 μ M che alla concentrazione finale di 900 μ M non altera lo stato ossidativo delle cellule, presentando rispettivamente il 12% e il 16% di cellule ROS positive. L'aggiunta di acido urico sia alla concentrazione finale di 450 μ M che alla concentrazione finale di 900 μ M, in combinazione a ipoxantina e xantina induce un lieve aumento di stress ossidativo con il 18% e il 16% di cellule ROS positive, rispettivamente.

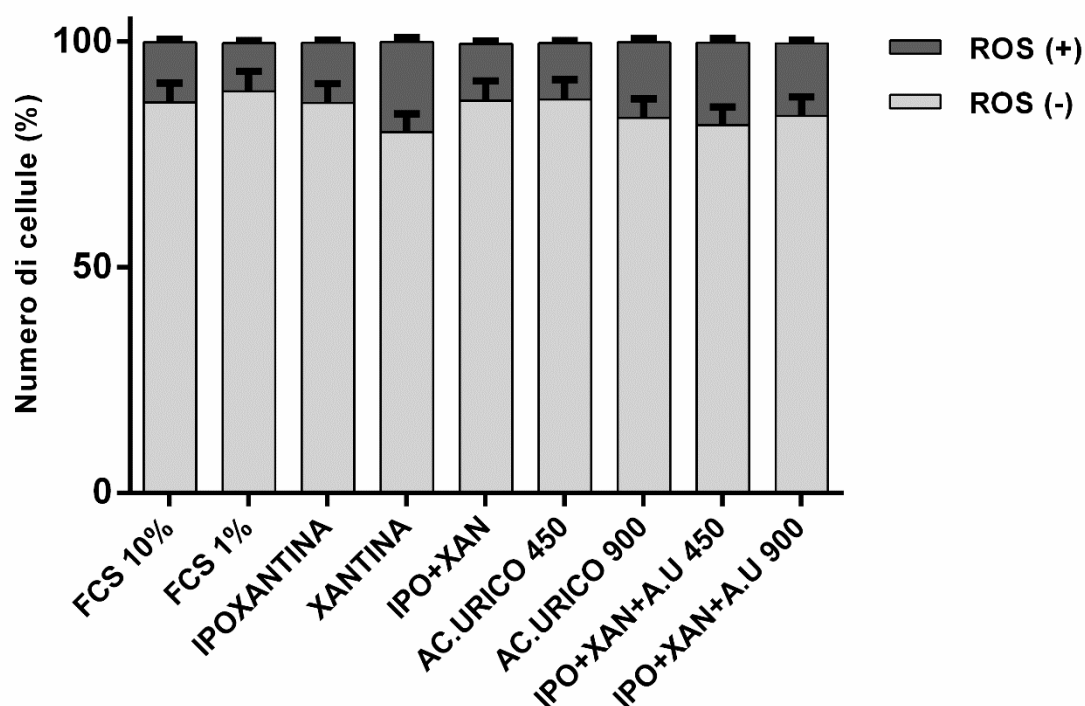


FIGURA 4.8: Analisi dello stress ossidativo mediante Muse® Oxidative Stress Kit. I dati sono stati acquisiti mediante il Muse Cell Analyzer.

4.4.3 Confronto LND HFB

I risultati ottenuti mostrano che i fibroblasti LND presentano un livello basale di stress ossidativo maggiore rispetto agli HFB. Nelle cellule coltivate in presenza di FCS10%, si osserva il 47% di cellule ROS(+) nel caso di fibroblasti LND e il 13% nel caso di fibroblasti HFB (figure 4.7 e 4.8). Lo stesso vale per le cellule mantenute in mezzo di coltura con FCS 1%, 38% per i fibroblasti LND e 11% per i sani. Anche la risposta ai vari trattamenti è molto diversa tra gli LND e gli HFB. Ad esempio, la sovrapposizione delle immagini ottenute con il Muse Cell Analyzer (figura 4.9), evidenzia bene come nel caso del trattamento con ipoxantina, xantina e acido urico 900 μ M il profilo della popolazione sana sia del tutto sovrapponibile a quella di controllo, mentre esistono differenze marcate tra i profili relativi ai LND.

Dal punto di vista quantitativo, i metaboliti nel terreno di coltura inducono aumenti minimi di cellule ROS positive negli HFB: l'incremento massimo osservato è del 10% rispetto al FCS 1% nel caso di cellule trattate con xantina. Al contrario, gli LND sono risultati essere

molto più sensibili all'aggiunta dei metaboliti. La percentuale massima di cellule ROS (+) è stato osservata nelle cellule trattate con la combinazione dei tre metaboliti: circa il 60%.

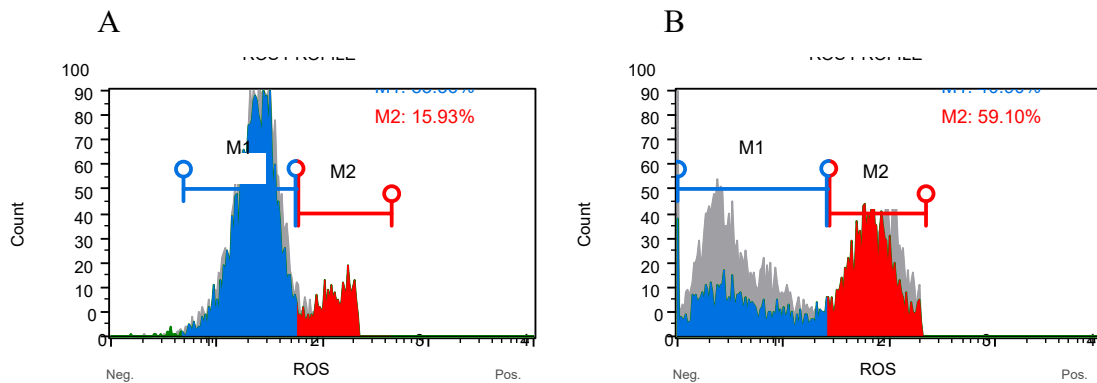


FIGURA 4.9: Immagini acquisite con il Muse cell Analyzer. (A) Sovrapposizione dell'immagine di HFB incubati in solo terreno all'1% di siero (in grigio) con l'immagine di HFB trattati con ipoxantina, xantina e acido urico 900 μ M (in blu e rosso). (B) Sovrapposizione dell'immagine di LND incubati in solo terreno all'1% di siero (in grigio) con l'immagine di LND trattati con ipoxantina, xantina e acido urico 900 μ M (in blu e rosso). M1= cellule ROS negative M2= cellule ROS positive.

4.5 ANALISI DEL METABOLISMO CELLULARE

4.5.1 Terreni condizionati

Per determinare la composizione dei terreni condizionati dei fibroblasti LND e HFB è stata effettuata un'analisi HPLC. In particolare sono stati ricercati acido urico, ipoxantina e xantina per valutare se le condizioni di coltura iniziali vengono mantenute dopo le 48h di trattamento. In linea generale, le condizioni di coltura vengono mantenute per tutta la durata degli esperimenti. Tuttavia sia per HFB, ed in misura maggiore per LND, si osserva una escrezione di ipoxantina e xantina nei terreni condizionati (tabelle 4.1, 4.2 e 4.3). Ad esempio, nel terreno di HFB all'1% di FCS con aggiunta di ipoxantina e xantina, ritroviamo: ipoxantina 98,39 μ M (-1,6%) e xantina 215,14 μ M (+2,4%). Mentre nello stesso terreno, ma derivate da cellule LND ritroviamo: ipoxantina 143,78 μ M (+36,2%) e xantina 224,02 μ M (+6,5%). Al contrario, non si osserva alcuna escrezione di acido urico che invece sembra diminuire nel caso dei terreni condizionati di cellule LND. Infatti, nel terreno condizionato derivante da cellule HFB incubate con acido urico 450 μ M, ritroviamo l'acido urico ad una concentrazione pari a 436,56 μ M, mentre nello stesso terreno derivante però da cellule LND, ritroviamo una concentrazione di acido urico pari a 430,15 μ M. Questi dati rappresentano l'ulteriore conferma a livello cellulare e funzionale che i fibroblasti non possiedono attività XDH/XOD (xantina deidrogenasi/ xantina ossidasi) (Jacomelli et al., 2019), che catalizza la reazione di conversione di ipoxantina e xantina ad acido urico.

TERRENI CONDIZIONATI HFB	Acido Urico	Ipoxantina	Xantina	Tirosina	Triptofano
FCS 10%	4.68 ($\pm$ 0.23)	7.19 ($\pm$ 0.36)	37.83 ($\pm$ 2.00)	654.68 ($\pm$ 33.39)	93.15 ($\pm$ 4.94)
FCS 1%	Nd	3.89 ($\pm$ 0.20)	2.19 ($\pm$ 0.11)	662,78 ($\pm$ 35.13)	68.53 ($\pm$ 3.63)
FCS 1% + IPOXANTINA	nd	108.83 ($\pm$ 5.87)	9.17 ($\pm$ 0.49)	586.36 ($\pm$ 30.49)	66.38 ($\pm$ 3.45)
FCS 1% + XANTINA	Nd	6.44 ($\pm$ 0.33)	225.50 ($\pm$ 11.95)	549.76 ($\pm$ 28.04)	47.73 ($\pm$ 2.43)
FCS 1% + IPOX + XANT	Nd	98.39 ($\pm$ 5.01)	215.14 ($\pm$ 11.18)	532.09 ($\pm$ 27.14)	69.02 ($\pm$ 3.66)
FCS 1% + AC.URICO 450	453.56 ($\pm$ 23.64)	nd	nd	666.14 ($\pm$ 33.31)	95.78 ($\pm$ 4.88)
FCS 1% + AC.URICO 900	899.03 ($\pm$ 45.85)	Nd	nd	608.22 ($\pm$ 31.01)	83.18 ($\pm$ 4.41)
FCS 1% + AC.URICO450 + IPOX+XANT	452.97 ($\pm$ 30.31)	107.83 ($\pm$ 5.82)	216.25 ($\pm$ 10.81)	608.22 ($\pm$ 29.80)	84.19 ($\pm$ 4.37)
FCS 1% + AC.URICO 900 + IPOX+XANT	748.03 ($\pm$ 38.15)	101.18 ($\pm$ 5.05)	191.44 ($\pm$ 10.14)	521.33 ($\pm$ 26.58)	73.10 ($\pm$ 3.87)

TABELLA 4.2: **Analisi all'HPLC dei terreni condizionati derivanti da HFB.** I dati sono espressi in $\mu\text{mol/l}$, come la media $\pm$ DS.

TERRENI CONDIZIONATI LND	Acido Urico	Ipoxantina	Xantina	Tirosina	Triptofano
FCS 10%	nd	16.24 ($\pm$ 0.86)	33.71 ($\pm$ 1.75)	598.57 ($\pm$ 30.53)	63.02 ($\pm$ 3.21)
FCS 1%	nd	9.71 ($\pm$ 0.50)	7.10 ($\pm$ 0.37)	482.71 ($\pm$ 25.58)	84.02 ($\pm$ 4.45)
FCS 1% + IPOXANTINA	nd	141.78 ($\pm$ 7.23)	10.11 ($\pm$ 0.06)	579.26 ($\pm$ 29.54)	79.40 ($\pm$ 4.20)
FCS 1% + XANTINA	Nd	5.05 ($\pm$ 0.26)	243.10 ($\pm$ 7.44)	333.07 ($\pm$ 17.31)	98.31 ($\pm$ 5.11)
FCS 1% + IPOX + XANT	Nd	143.78 ($\pm$ 7.76)	224.02 ($\pm$ 6.57)	550.29 ($\pm$ 28.06)	75.12 ($\pm$ 3.83)
FCS 1% + AC.URICO 450	430.15 ($\pm$ 25.38)	7.99 ($\pm$ 0.41)	6.36 ($\pm$ 0.34)	781.99 ($\pm$ 41.44)	90.74 ($\pm$ 4.81)
FCS 1% + AC.URICO 900	457.94 ($\pm$ 23.35)	10.38 ($\pm$ 0.55)	3.18 ($\pm$ 0.16)	724.07 ($\pm$ 36.20)	83.18 ($\pm$ 4.41)
FCS 1% + AC.URICO 450 + IPOX+XANT	263.04 ($\pm$ 13.15)	125.14 ($\pm$ 6.38)	200.34 ($\pm$ 10.01)	695.11 ($\pm$ 36.14)	80.66 ($\pm$ 4.19)
FCS 1% + AC.URICO 900 + IPOX+XANT	456.54 ($\pm$ 23.28)	115.82 ($\pm$ 6.14)	181.26 ($\pm$ 9.60)	550.29 ($\pm$ 28.06)	78.14 ($\pm$ 3.98)

TABELLA 4.3: **Analisi all'HPLC dei terreni condizionati derivanti da LND.** I dati sono espressi in $\mu\text{mol/l}$, come la media $\pm$ DS.

4.5.2 Analisi del metabolismo intra cellulare

Per determinare il contenuto dei nucleotidi adenilici (AMP, ADP e ATP) e il contenuto di NAD all'interno delle cellule HFB e LND, è stata effettuata un'analisi HPLC.

In entrambi i tipi cellulari, in risposta alla riduzione di siero non si osservano differenze importanti nel contenuto nucleotidico adenilico. Nel caso degli HFB, si passa infatti da valori di ATP pari a 25885,53 μ M in FCS 10% a valori di ATP pari a 26706,39 in FCS 1%. Nel caso degli LND, l'ATP varia da 27386,25 μ M in FCS 10% a 30561,59 in FCS 1%. Con l'aggiunta dei trattamenti al mezzo di coltura si osserva, in linea generale, un aumento del contenuto nucleotidico adenilico. L'incremento di AMP, ADP e ATP, risulta maggiore in seguito all'aggiunta di acido urico, soprattutto se in combinazione a ipoxantina e xantina, in entrambe le popolazioni cellulari. Ad esempio le cellule HFB incubate con acido urico 900 μ M, ipoxantina e xantina, presentano valori di ATP pari a 48760,88 μ M, mentre le cellule LND sottoposte allo stesso trattamento presentano valori di ATP pari a 62342,95 μ M. I risultati ottenuti mostrano inoltre, che in entrambi i tipi cellulari passando dal terreno al 10% di siero a quello all'1% di siero, si ha una riduzione di NAD (3414,92 μ mol/l in FCS 10% e 3294,90 μ mol/l in FCS 1% per gli HFB e 3912,05 in FCS 10% e 3799,61 in FCS 1% per gli LND). L'aggiunta di acido urico al terreno di coltura induce invece un aumento dei livelli di NAD, sia nel caso degli HFB che in misura maggiore negli LND. Infatti, ritroviamo valori di NAD pari a 588,64 μ M per gli HFB e valori pari a 7925,46 μ M per gli LND, entrambi i tipi di cellule derivanti da incubazioni con acido urico 900 μ M, ipoxantina e xantina.

Inoltre, questi dati ci hanno permesso di calcolare la carica energetica cellulare. La carica energetica degli adenilati rappresenta la porzione di legami totali ad alto contenuto energetico che sono presenti in una cellula e si calcola:

$$\text{Carica energetica} = \frac{[\text{ATP}] + \frac{1}{2} [\text{ADP}]}{[\text{ATP}] + [\text{ADP}] + [\text{AMP}]}$$

Cellule con un metabolismo attivo presentano un valore di carica energetica di circa 0.9.

I risultati ottenuti mostrano che gli HFB presentano la stessa carica energetica (0,93) nel terreno al 10% di siero e in quello all'1%. Stessa cosa per gli LND che possiedono la stessa carica energetica (0,95) in entrambi i terreni. L'aggiunta dei metaboliti al terreno non

influenza la carica energetica né nel caso degli HFB né negli LND (Tabella 4.4 e Tabella 4.5). Tutte le cellule presentano quindi un metabolismo attivo con cariche energetiche che si mantengono tra 0.93 e 0,97. Ciò conferma i dati sulla vitalità ottenuti con il Muse Count and Viability Kit.

CELLULE HFB	NAD	AMP	ADP	ATP	CARICA ENERGETICA
FCS 10%	5337.98 ($\pm$ 293.95)	1148.07 ($\pm$ 60.85)	1446.25 ($\pm$ 75.20)	25885.53($\pm$ 1346.05)	0.93 ($\pm$ 0.05)
FCS 1%	3294.90 ($\pm$ 168.04)	992.55 ($\pm$ 51.61)	2155.49 ($\pm$ 114.24)	26706.39($\pm$ 1362.03)	0.93 ($\pm$ 0.05)
FCS 1% + IPOXANTINA	3071.86 ($\pm$ 159.74)	806.27 ($\pm$ 41.12)	1605.83 ($\pm$ 85.11)	23375.11($\pm$ 1238.92)	0.94 ($\pm$ 0.05)
FCS 1% + XANTINA	2872.75 ($\pm$ 152.26)	353.73 ($\pm$ 18.39)	1325.05 ($\pm$ 66.25)	20103.11($\pm$ 1045.36)	0.95 ($\pm$ 0.05)
FCS 1% + IPOX + XANT	3985.49 ($\pm$ 203.26)	544.21 ($\pm$ 29.39)	1959.68 ($\pm$ 99.94)	34580.04($\pm$ 1798.16)	0.96 ($\pm$ 0.05)
FCS 1% + AC.URICO 450	8610.28 ($\pm$ 447.73)	932.44 ($\pm$ 47.55)	4236.28 ($\pm$ 224.52)	60650.58($\pm$ 3153.83)	0.95 ($\pm$ 0.05)
FCS 1% + AC.URICO 900	6158.72 ($\pm$ 307.94)	603.76 ($\pm$ 31.99)	2927.33 ($\pm$ 149.29)	45657.40($\pm$ 2419.84)	0.95 ($\pm$ 0.05)
FCS 1% + AC.URICO 450 + IPOX+XANT	7616.77 ($\pm$ 403.69)	827.55 ($\pm$ 40.55)	4675.72 ($\pm$ 247.81)	65227.92($\pm$ 3391.85)	0.96 ($\pm$ 0.05)
FCS 1% + AC.URICO 900 + IPOX+XANT	5884.64 ($\pm$ 306.00)	458.54 ($\pm$ 23.84)	3472.04 ($\pm$ 180.55)	48760.88($\pm$ 2438.04)	0.96 ($\pm$ 0.05)

TABELLA 4.4: **Analisi all'HPLC delle cellule HFB.** I dati sono espressi in $\mu\text{mol/l}$, come la media $\pm$ DS.

CELLULE LND	NAD	AMP	ADP	ATP	CARICA ENERGETICA
FCS 10%	3912.05 ($\pm$ 203.43)	627.66 ($\pm$ 33.27)	2621.71 ($\pm$ 136.33)	27386.25($\pm$ 1424.08)	0.95 ($\pm$ 0.05)
FCS 1%	3284.18 ($\pm$ 193.78)	688.09 ($\pm$ 35.09)	2651.54 ($\pm$ 140.53)	30561.59($\pm$ 1558.64)	0.95 ($\pm$ 0.05)
FCS 1% + IPOXANTINA	2131.29 ($\pm$ 119.86)	577.05 ($\pm$ 30.03)	1896.22 ($\pm$ 96.70)	23938.54($\pm$ 1244.80)	0.94 ($\pm$ 0.05)
FCS 1% + XANTINA	1247.58 ($\pm$ 69.56)	0	2329.76 ($\pm$ 121.15)	31140.22($\pm$ 1650.43)	0.97 ($\pm$ 0.05)
FCS 1% + IPOX + XANT	1931.96 ($\pm$ 108.24)	0	1890.76 ($\pm$ 98.32)	22744.52($\pm$ 1182.71)	0.96 ($\pm$ 0.05)
FCS 1% + AC.URICO 450	3102.39 ($\pm$ 158.22)	832.38 ($\pm$ 42.45)	1502.21 ($\pm$ 79.62)	20818.68($\pm$ 1061.75)	0.93 ($\pm$ 0.05)
FCS 1% + AC.URICO 900	4150.10 ($\pm$ 215.81)	769.74 ($\pm$ 40.79)	2718.18 ($\pm$ 141.35)	30214.11($\pm$ 1510.71)	0.94 ($\pm$ 0.05)
FCS 1% + AC.URICO 450 + IPOX+XANT	4932.37 ($\pm$ 256.48)	292.5 ($\pm$ 15.21)	2854.09 ($\pm$ 139.85)	35838.02($\pm$ 1756.06)	0.96 ($\pm$ 0.05)
FCS 1% + AC.URICO 900 + IPOX+XANT	7925.46 ($\pm$ 420.05)	0	5459.68 ($\pm$ 278.44)	62342.95($\pm$ 3241.83)	0.96 ($\pm$ 0.05)

TABELLA 4.5: **Analisi all'HPLC delle cellule LND.** I dati sono espressi in $\mu\text{mol/l}$, come la media $\pm$ DS. È stata riportata la carica energetica anche se non è stato rilevato AMP, in quanto questo influisce molto poco sul calcolo della carica energetica.

5.DISCUSSIONE

La Sindrome di Lesch-Nyhan (LND) è una malattia genetica X-linked recessiva, dovuta al deficit dell'enzima ipoxantina-guanina fosforibosiltransferasi (HGPRT), coinvolto nella via di recupero delle purine. È una malattia estremamente rara che si manifesta con un caso ogni 380000 nati in Canada e uno ogni 235000 nati in Spagna. A causa della rarità della malattia e quindi della difficoltà di acquisire tessuti neuronali umani, per lo studio della patologia vengono normalmente utilizzate cellule non-neuronali che possono essere facilmente acquisite da pazienti LND attraverso prelievi di sangue, come eritrociti e linfociti, oppure cellule estratte dalla pelle come i fibroblasti. Nasce da ciò l'esigenza di creare modelli cellulari in vitro, che permettono di studiare le alterazioni morfologiche, metaboliche e genetiche, essenziali per approfondire la conoscenza del danno molecolare e del meccanismo patogenico responsabile del fenotipo patologico.

In questo studio abbiamo messo appunto un modello cellulare per lo studio della Sindrome di Lesch-Nyhan basato su fibroblasti primari isolati da pazienti LND e controlli sani in condizioni di coltura che mimano le condizioni fisiologiche della patologia (alti livelli di ipoxantina, xantina e acido urico). Per l'allestimento del modello cellulare abbiamo in primo luogo validato la scelta di un terreno di coltura con una bassa percentuale di siero (1%) con il saggio dell'MTT e del MUSE. I risultati ottenuti hanno mostrato che tale terreno di coltura dimezza la proliferazione cellulare rispetto al terreno di coltura al 10% di siero (normalmente utilizzato per la crescita delle cellule), e non altera la vitalità delle cellule. Per mimare le condizioni fisiologiche della patologia abbiamo così addizionato a tale terreno ipoxantina, xantina e acido urico, sia singolarmente che in combinazione, alla concentrazione di accumulo che si osserva nei pazienti LND. Abbiamo poi osservato che tali condizioni non provocano danni cellulari in termini di proliferazione, vitalità e apoptosi sia nei fibroblasti sani che nei fibroblasti estratti da pazienti LND. Inoltre, dai dati ottenuti con i saggi dell'MTT, del Muse Count and Viability kit e del Muse Annexin V et Dead Cell Kit è emerso che non ci sono differenze tra i due tipi cellulari. È quindi possibile coltivare entrambi i fibroblasti in queste condizioni di coltura.

L'analisi dei metaboliti cellulari rilasciati nel mezzo di coltura, sia dei fibroblasti LND che dei fibroblasti sani, ha evidenziato una marcata escrezione di ipoxantina e xantina nei terreni condizionati dei fibroblasti LND, come era normale aspettarsi in cellule in cui l'enzima

HGPRT non è attivo. Al contrario, sia nei fibroblasti LND che nei fibroblasti sani i livelli di acido urico non aumentano in risposta alle aggiunte di ipoxantina e xantina, come ci si aspetterebbe in cellule che possiedono l'enzima xantina ossidasi (XOD) o xantina deidrogenasi (XDH). Ciò conferma l'assenza di tali enzimi nei fibroblasti, come era stato osservato nel nostro laboratorio con test che valutavano l'attività enzimatica (**Jacomelli et al., 2019**).

L'inattivazione della via di recupero purinica indotta dal deficit dell'enzima HGPRT nei fibroblasti LND dovrebbe avere un impatto nei livelli purinici cellulari, ma negli studi presenti in letteratura si ritrovano risultati contrastanti, alcuni riportano un aumento, altri una riduzione dei livelli purinici e altri ancora non evidenziano cambiamenti (**Fu et al., 2015**). In questo studio, nelle nostre condizioni di coltura non si evidenziano differenze tra i fibroblasti sani e quelli LND. La mancata osservazione di tale differenza è dovuta al fatto che nei fibroblasti LND, i livelli dei nucleotidi adenilici non si abbassano in quanto si ha un aumento della sintesi purinica de novo. Sia nei fibroblasti LND che in quelli sani l'aggiunta di acido urico in combinazione a ipoxantina e xantina induce un aumento dei nucleotidi adenilici ADP e ATP.

La caratterizzazione di questo modello ci ha permesso di mettere in luce molti aspetti intrinseci sia della patologia che della natura dei fibroblasti.

In primo luogo negli estratti cellulari abbiamo osservato una maggiore concentrazione di NAD nei fibroblasti incubati in terreno al 10% di siero rispetto a quelli incubati in terreno all'1% di siero. Questo molto probabilmente è dovuto alla maggior concentrazione di siero presente, che induce un aumento della sintesi pirimidinica, come riportato (**Fairbanks et al., 2002**). Inoltre tale risultato è simile a quello riscontrato negli eritrociti, infatti anche negli eritrociti si ritrovano basse concentrazioni di NAD. In studi precedenti però era stata osservata una discrepanza tra il comportamento dei fibroblasti e quello degli eritrociti, in quanto venivano osservate basse concentrazioni di NAD nei fibroblasti e alte concentrazioni di NAD negli eritrociti. Questa discrepanza è stata annullata in questo studio, nelle condizioni di coltura scelte. Inoltre, abbiamo osservato che anche in presenza di acido urico si ha un aumento importante dell'NAD. Nei fibroblasti LND tale aumento risulta essere circa il doppio rispetto a quelli incubati in solo terreno al 10% di siero.

Infine, dall'analisi dello stress ossidativo mediante Muse Oxidative stress kit, abbiamo osservato che i fibroblasti LND presentano un livello basale di stress ossidativo molto più marcato rispetto ai fibroblasti sani e che subiscono molto di più le condizioni di coltura scelte. I fibroblasti non esprimono né l'enzima xantina ossidasi né l'enzima xantina

deidrogenasi, che caratterizzano il principale sistema di produzione di ROS nel modello sperimentale usato (figura 5.1).

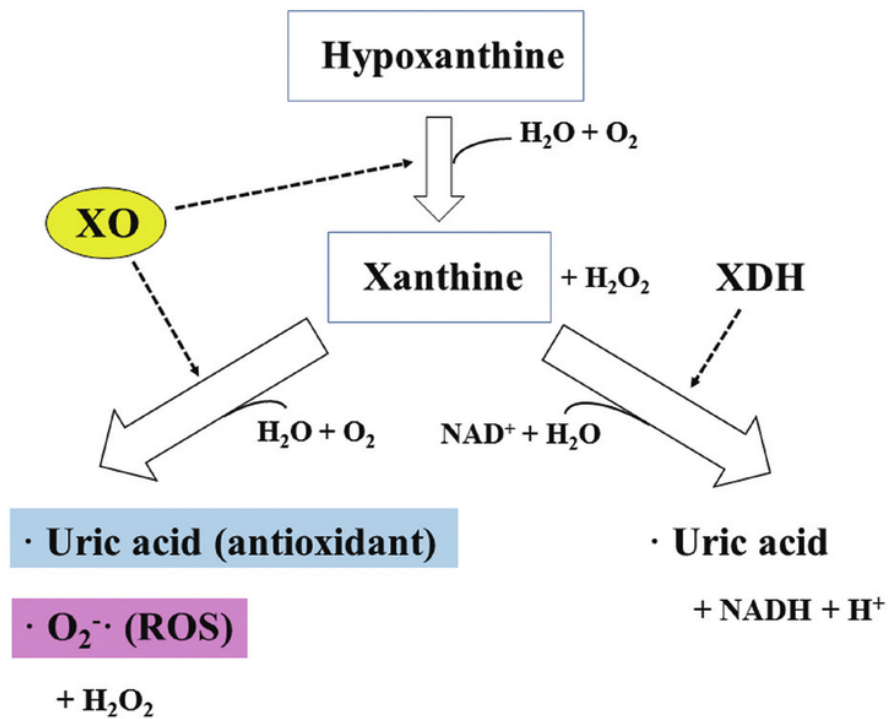


Figura 5.1: Sistema di produzione di ROS a partire da ipoxantina.

Possiamo così ipotizzare che l'aumento di stress ossidativo sia dovuto ad una deplezione dei sistemi antiossidanti cellulari e non ad un'azione diretta dei metaboliti stessi.

BIBLIOGRAFIA

- **Abel TJ, Dalm BD, Grossbach AJ, Jackson AW, Thomsen T, Greenlee JD.** *Lateralized effect of pallidal stimulation on self-mutilation in Lesch-Nyhan disease.* J Neurosurg Pediatr. 2014; 14(6):594–7.
- **Anderson LT, Ernst M, Davis SV.** *Cognitive abilities of patients with Lesch-Nyhan disease.* J Autism Dev Disord. 1992; 22: 189–203.
- **Anderson LT, Ernst M.** *Self-injury in Lesch-Nyhan disease.* J Autism Dev Disord. 1994; 24: 67–81.
- **Auburger G1, Klinkenberg M, Drost J, Marcus K, Morales-Gordo B, Kunz WS, Brandt U, Broccoli V, Reichmann H, Gispert S, Jendrach M.** *Primary skin fibroblasts as a model of Parkinson's disease.* Mol Neurobiol. 2012 Aug; 46(1):20-7.
- **Bavaresco CS, Chiarani F, Wannmacher CM, Netto CA, Wyse AT.** *Intrastriatal hypoxanthine reduces Na⁺, K⁺-ATPase activity and induces oxidative stress in the rats.* Metab Brain Dis. 2007; 22(1):1–11.
- **Becker MA.** *Hyperuricemia and gout.* In: Scriver CR et al., editors. The metabolic and molecular basis of inherited disease. New York: McGraw-Hill Book Company. 2001.
- **Bell S, Kolobova I, Crapper L, Ernst C.** *Lesch-Nyhan Syndrome: Models, Theories, and Therapies.* Mol Syndromol.. 2016 Nov; 7(6):302-311.
- **Brosh S, Kupfer B, De Vries A, Sperling O.** *De novo synthesis of purine nucleotides in human peripheral blood leukocytes.* J Clin Invest. 1976; 58:289–97.
- **Christie R, Bay C, Kaufman IA, Bakay B, Borden M, Nyhan WL.** *Lesch-Nyhan disease: clinical experience with nineteen patients.* Develop Med Child Neurol. 1982; 24:293-306.
- **Cif L, Biolsi B, Gavarini S, Saux A, Robles SG, Tancu C, Vasques X, Coubes P.** *Antero-ventral internal pallidum stimulation improves behavioral disorders in Lesch-Nyhan disease.* Mov Disord. 2007; 22(14):2126–9.
- **Cristini S, Navone S, Canzi L, Acerbi F, Ciusani E, Hladnik U, de Gemmis P, Alessandri G, Colombo A, Parati E, Invernici G.** *Human neural stem cells: a model system for the study of Lesch-Nyhan disease neurological aspects.* Hum Mol Genet. 2010 May; 15;19(10):1939-50.

- **Dabrowski E, Smathers SA, Ralstrom CS, Nigro MA, Leleszi JP.** *Botulinum toxin as a novel treatment for self-mutilation in Lesch-Nyhan syndrome.* Dev Med Child Neurol. 2005; 47:636-639.
- **Emmerson BT, Thompson L.** *The spectrum of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase deficiency.* Quart J Med. 1973; 166: 423–40.
- **Fairbanks D, Jacomelli G, Micheli V, Slade T, Simmonds H.** *Severe pyridine nucleotide depletion in fibroblasts from Lesch-Nyhan patients.* Biochem J 2002.-
- **Fu R, Ceballos-Picot I, Torres RJ, Larovere LE, Yamada Y, Nguyen KV, Hegde M, Visser JE, Schretlen DJ, Nyhan WL, Puig JG, O'Neill PJ, Jinnah HA.** *Genotype–phenotype correlations in neurogenetics: Lesch-Nyhan disease as a model disorder.* Brain. 2014 May; 137(Pt 5):1282-303.
- **Fu R, Sutcliffe D, Zhao H, Huang X, Schretlen D, Benkovic S, Jinnah HA.** *Clinical severity in Lesch-Nyhan disease: The role of residual enzyme and compensatory pathways.* Molecular genetics and Metabolism. 2015
- **García MG, Puig JG, Torres RJ.** *Adenosine, dopamine and serotonin receptors imbalance in lymphocytes of Lesch-Nyhan patients.* J Inherit Metab Dis. 2012; 35(6):1129–35.
- **Jacomelli G, Baldini E, Mugnaini C, Micheli V, Bernardini G, Santucci A.** *Inhibiting PNP for the therapy of hyperuricemia in Lesch-Nyhan disease: preliminary in vitro studies with analogues of immucillin-G.* J Inherit Metab Dis. 2019 Jun 4.
- **Jinnah HA, Ceballos-Picot I, Torres RJ, Visser JE, Schretlen DJ, Verdu A, Laróvere LE, Chen CJ, Cossu A, Wu CH, Sampat R, Chang SJ, de Kremer RD, Nyhan W, Harris JC, Reich SG, Puig JG.** *Attenuated variants of Lesch-Nyhan disease.* Brain. 2010 Mar; 133(Pt 3):671-89.
- **Jinnah HA, Friedmann T.** *Lesch-Nyhan disease and its variants.* In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. The metabolic and molecular bases of inherited disease. New York: McGraw-Hill. 2001; p. 2537–70.
- **Jinnah HA, Visser JE, Harris JC, Verdu A, Larovere L, Ceballos-Picot I, Gonzalez-Alegre P, Neychev V, Torres RJ, Dulac O, Desguerre I, Schretlen DJ, Robey KL, Barabas G, Bloem BR, Nyhan W, De Kremer R, Eddey GE, Puig JG, Reich SG; et al.** *Delineation of the motor disorder of Lesch-Nyhan disease.* Brain. 2006; 129: 1201-9.
- **Jinnah HA.** *Lesch-Nyhan disease: from mechanism to model and back again.* Dis Model Mech. 2009; 2: 116–121.

- **Kelley WN, Greene ML, Rosenbloom FM, Henderson JF, Seegmiller JE.** *Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase deficiency in gout.* Ann Int Med. 1969; 70: 155–206.
- **Kelley WN, Rosenbloom FM, Miller J, Seegmiller JE.** *An enzymatic basis for variation in response to allopurinol. Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl transferase deficiency.* N Eng J Med. 1968; 278:287-293.
- **Kinast L, von der Ohe J, Burhenne H, Seifert R.** *Impairment of adenylyl cyclase 2 function and expression in hypoxanthine phosphoribosyltransferase-deficient rat B103 neuroblastoma cells as model for Lesch–Nyhan disease: BODIPY–forskolin as pharmacological tool.* Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 2012; 385(7):671–83.
- **Lesch M, Nyhan WL.** *A familial disorder of uric acid metabolism and central nervous system function.* Am J Med. 1964; 36: 561–570.
- **Lloyd KG, Hornykiewicz O, Davidson L, Shannak K, Farley I, Goldstein M.** *Biochemical evidence of dysfunction of brain neurotransmitters in the Lesch–Nyhan syndrome.* N Engl J Med. 1981; 305(19):1106–11.
- **Ma MH, Stacey NC, Connolly GP.** *Hypoxanthine impairs morphogenesis and enhances proliferation of a neuroblastoma model of Lesch Nyhan syndrome.* J Neurosci Res. 2001; 63(6):500–8.
- **Matthews WS, Solan A, Barabas G.** *Cognitive functioning in Lesch-Nyhan syndrome.* Dev Med Child Neurol 1995; 37: 715–22.
- **McManaman J, Tam DA.** *Gabapentin for self-injurious behavior in Lesch-Nyhan syndrome.* Pediatr Neurol 1999, 20:381-382.
- **Murray AW.** *The biological significance of purine salvage.* Rev Biochem. 1971; 40:811–26.
- **Neychev VK, Jinnah HA.** *Sudden death in Lesch-Nyhan disease.* Dev Med Child Neurol. 2006; 48(11):923–6.
- **Nyhan W, Pesek J, Sweetman L, Carpenter D, Carter C.** *Genetics of an X-linked disorder of uric acid metabolism and cerebral function.* Pediatric Res. 1967; 1: 5–13.
- **Nyhan WL, Oliver WJ, Lesch M.** *A familial disorder of uric acid metabolism and central nervous system function 2.* J Pediatr. 1965; 67: 257-63.
- **Nyhan WL.** *Lesch-Nyhan disease.* J Hist Neurosci. 2005; 14.
- **Piedimonte F, Andreani JC, Piedimonte L, Micheli F, Graff P, Bacaro V.** *Remarkable clinical improvement with bilateral globus pallidus internus deep brain*

stimulation in a case of Lesch-Nyhan disease: five-year follow-up. Neuromodulation. 2015; 18(2):118–22.

- **Pinto C, Seifert R.** *Decreased GTP-stimulated adenylyl cyclase activity in HPRT-deficient human and mouse fibroblast and rat B103 neuroblastoma cell membranes.* J Neurochem. 2006; 96(2):454–9.
- **Puig JG, Torres RJ, Mateos FA, Ramos TH, Arcas JM, Buno AS, O'Neill P.** *The spectrum of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase deficiency: Clinical experience based on 22 patients from 18 Spanish families.* Medicine 2001; 80: 102–12.
- **Rosenbloom FM, Henderson JF, Caldwell IC, Kelley WN, Seegmiller JE.** *Biochemical bases of accelerated purine biosynthesis de novo in human fibroblasts lacking hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase.* J Biol Chem. 1968; 243:1166–73.
- **Schretlen DS, Harris JC, Park KS, Jinnah HA, Ojeda del Pozo N.** *Neurocognitive functioning in Lesch-Nyhan disease and partial hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase deficiency.* J Int Neuropsychol Soc 2001; 7: 805–12.
- **Seegmiller JE.** *Contributions of Lesch-Nyhan syndrome to the understanding of purine metabolism.* J Inher Metab Dis. 1989; 12:184–96.
- **Solan A, Matthews W, Barabas G, Robey K.** *Cognition in LND: a two-year follow-up study.* Dev Med Child Neurol. 1997; 39: 492–3.
- **Sorensen LB.** *Mechanism of excessive purine biosynthesis in hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase deficiency.* J Clin Invest. 1970; 49:968–78.
- **Taira T, Kobayashi T, Hori T.** *Disappearance of self-mutilating behavior in a patient with Lesch-Nyhan syndrome after bilateral chronic stimulation of the globus pallidus internus.* Case report. J Neurosurg. 2003; 98(2):414–6.
- **Torres RJ, Prior C, Garcia MG, Puig JG.** *A review of the implication of hypoxanthine excess in the physiopathology of Lesch-Nyhan disease.* Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2016; 35(10-12):507–16.
- **Torres RJ, Puig JG, Jinnah HA.** *Update on the phenotypic spectrum of Lesch-Nyhan disease and its attenuated variants.* Curr Rheumatol Rep. 2011 Apr; 14(2):189-94.
- **Torres RJ, Puig JG.** *Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) deficiency: Lesch-Nyhan syndrome.* Orphanet J Rare Dis. 2007 Dec; 8:248.
- **Watts RW, Spellacy E, Gibbs DA, Allsop J, McKeran RO, Slavin GE.** *Clinical, post-mortem, biochemical and therapeutic observations on the Lesch-Nyhan syndrome with reference to the neurological manifestations.* Q J Med. 1982; 51(201):43-78.