



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA

Scuola di Scienze Mediche e Farmaceutiche **CORSO DI LAUREA IN MEDICINA E CHIRURGIA**

*Dipartimento di Neuroscienze, Riabilitazione, Oftalmologia, Genetica e
Scienze Materno-Infantili (DINOEMI)*

Tesi di Laurea

**Analisi metabolomica untargeted di una coorte di pazienti con
difetto severo di HPRT: studio prospettico monocentrico
osservazionale/biologico traslazionale**

Relatori

Prof. Mohamad Maghnie
Dott.ssa Annalisa Madeo

Correlatore

Dott. Alessandro La Rosa

Candidata

Fantasia Delvecchio

Anno Accademico 2024/2025

SOMMARIO

ABSTRACT	5
INTRODUZIONE.....	6
1.1 Generalità del metabolismo dei nucleotidi purinici	6
1.1.1. <i>Sintesi de novo dei nucleotidi purinici</i>	<i>6</i>
1.1.2. <i>Vie di salvataggio.....</i>	<i>7</i>
1.2 Deficit di HPRT e malattia di Lesch-Nyhan	9
1.3 Epidemiologia	10
1.4 Eziologia e Patogenesi	10
1.4.1 <i>Iperuricemia.....</i>	<i>11</i>
1.4.2 <i>Aspetti neurologici e comportamentali</i>	<i>11</i>
1.4.3 <i>Aspetti ematologici.....</i>	<i>15</i>
1.5 Presentazione clinica	15
1.5.1 <i>Sintomi renali e articolari.....</i>	<i>17</i>
1.5.2 <i>Sintomi neurologici e comportamentali</i>	<i>17</i>
1.5.3 <i>Altre manifestazioni cliniche.....</i>	<i>19</i>
1.6 Diagnosi.....	20
1.6.1 <i>Diagnosi biochimica</i>	<i>20</i>
1.6.2 <i>Diagnosi strumentale</i>	<i>20</i>
1.6.3 <i>Diagnosi enzimatica.....</i>	<i>21</i>
1.6.4 <i>Diagnosi molecolare</i>	<i>21</i>
1.6.5 <i>Nuovi biomarker diagnostici.....</i>	<i>22</i>
1.6.6 <i>Diagnosi differenziali.....</i>	<i>22</i>
1.7 Prognosi.....	22
1.8 Terapia	23
LE SCIENZE “OMICHE”	27
2.1 Genomica.....	28
2.2 Trascrittomica	28
2.3 Proteomica	29
2.4 Metabolomica	29
2.4.1 <i>Preparazione del campione.....</i>	<i>30</i>
2.4.2 <i>Misurazione del metaboloma</i>	<i>31</i>
2.4.3 <i>Analisi dei dati</i>	<i>32</i>
BACKGROUND ED OBIETTIVI DELLO STUDIO.....	33
MATERIALI E METODI	36
4.1 Disegno dello studio.....	36
4.2 Descrizione della coorte di studio	37
4.3 Analisi metabolomica untargeted	39

4.4	Elaborazione dei dati	42
4.5	Analisi statistica	43
RISULTATI.....		44
5.1	Descrizione delle popolazioni	44
5.2	Metabolismo delle purine	56
5.3	Metabolismo dell'istidina	58
5.4	Metabolismo della dopamina	59
5.5	Metabolismo energetico	59
5.6	Metabolismo degli amminoacidi	60
5.7	Metabolismo lipidico	62
DISCUSSIONE		64
CONCLUSIONI.....		74
BIBLIOGRAFIA		76
RINGRAZIAMENTI		87

ABSTRACT

BACKGROUND E OBIETTIVI: Il difetto severo dell'enzima HPRT (ipoxantina-guanina fosforibosiltransferasi) è alla base della malattia di Lesch-Nyhan (LND), una malattia genetica rara caratterizzata da accumulo di acido urico per blocco della via di salvataggio del metabolismo delle purine. Le manifestazioni cliniche includono sintomi renali e articolari, dovuti all'iperuricemia, e disturbi neurologici e comportamentali, in particolare comportamenti autolesionistici, la cui causa rimane ad oggi sconosciuta. L'obiettivo principale dello studio è individuare una possibile correlazione tra il disordine genetico e le alterazioni metaboliche nei soggetti affetti, al fine ultimo di comprendere i meccanismi fisiopatologici alla base delle alterazioni neurocomportamentali tipiche della malattia.

METODI: Abbiamo condotto un'analisi metabolomica *untargeted* su campioni di plasma di 24 pazienti affetti da LND, confrontandoli con una popolazione di controlli sani appaiati per età e sesso e un terzo gruppo di pazienti con paralisi cerebrale infantile (PCI), caratterizzati da un quadro neurologico in parte sovrapponibile ai LND. I risultati sono stati ottenuti tramite cromatografia liquida associata a spettrometria di massa.

RISULTATI: L'analisi preliminare dei 400 metaboliti risultati statisticamente significativi evidenzia che il difetto enzimatico responsabile della LND non si limita ad alterare esclusivamente il metabolismo purinico, bensì determina modificazioni trasversali nel network metabolico. In particolare, sono emerse alterazioni nell'ambito del metabolismo energetico, lipidico, amminoacidico, con lo specifico dell'istidina, e dopaminergico.

CONCLUSIONI: Questo studio rappresenta, al meglio delle nostre conoscenze, la più ampia analisi metabolomica *untargeted* su plasma di pazienti LND attualmente disponibile in letteratura. I risultati emersi appaiono promettenti e rappresentano una solida base per futuri approfondimenti e sviluppi della ricerca.

INTRODUZIONE

1.1 Generalità del metabolismo dei nucleotidi purinici

I nucleotidi purinici sono molecole organiche formate da una base purinica (adenina o guanina), da uno zucchero pentoso (ribosio o desossiribosio) e da uno o più gruppi fosfato. I principali nucleotidi purinici che si riscontrano nelle nostre cellule sono i 5'-derivati, tra cui l'ATP che è quello presente in maggiore concentrazione, in quanto principale fonte di energia della cellula. Questi composti hanno un ruolo essenziale per il corretto funzionamento dell'organismo: partecipano al metabolismo energetico cellulare (ATP e GTP), sono precursori della sintesi degli acidi nucleici (AMP e GMP), sono coinvolti nei meccanismi di segnalazione cellulare (cAMP e cGMP), possono essere componenti di coenzimi (NAD, FAD e coenzima A), intermedi attivati di processi biologici oppure effettori allosterici ¹.

La produzione di nucleotidi purinici si basa su due sistemi principali: la sintesi *de novo* e le vie di salvataggio (Figura 1).

1.1.1. Sintesi *de novo* dei nucleotidi purinici

La sintesi *de novo* consiste nella trasformazione del 5-fosforibosil-1-pirofosfato (PRPP) in inosina 5'-monofosfato (IMP), precursore comune per la sintesi di adenosina 5'-monofosfato (AMP) e guanosina 5'-monofosfato (GMP). Il processo prevede dieci reazioni metaboliche mediate da sei diversi enzimi assemblati in un complesso multienzimatico definito "purinosoma" ¹. Gli amminoacidi vengono utilizzati come donatori di carbonio e azoto, mentre la fonte di energia è garantita dall'ATP, con un consumo totale di sei molecole. Il principale meccanismo di regolazione è rappresentato dalla prima reazione, mediata dall'enzima glutammina-PRPP amidotransferasi, su cui agiscono allostericamente i prodotti finali (IMP, AMP, GMP), come fattori negativi, e il PRPP come fattore positivo ².

Ci sono poi molti altri segnali, intracellulari e extracellulari che influenzano la sintesi *ex novo* delle purine, alcuni dei quali non ancora noti e in fase di studio, soprattutto nell'ambito di patologie tumorali e disordini immunitari ^{3,4}.

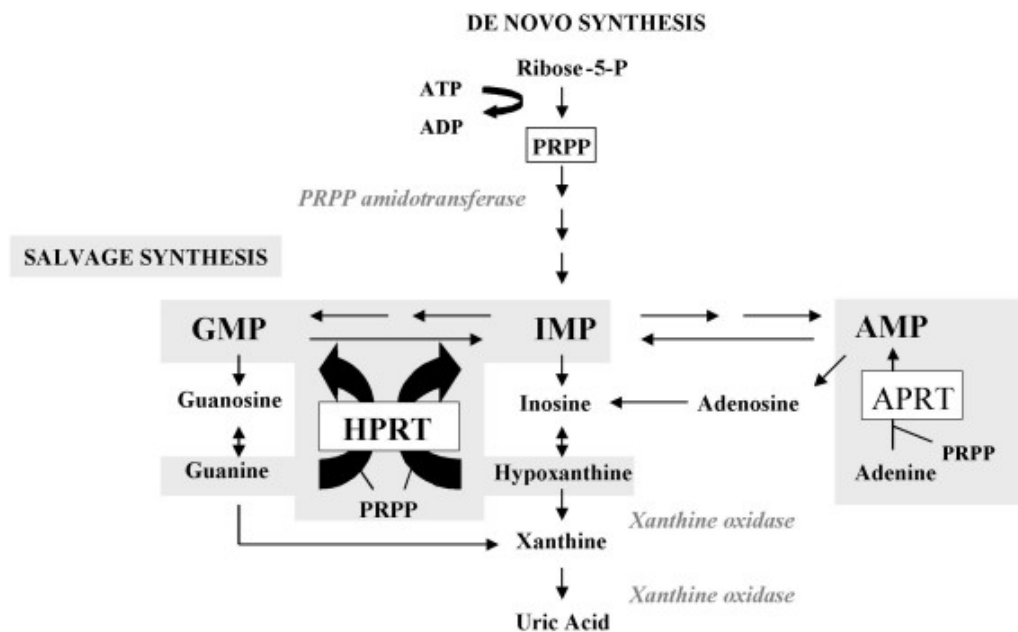


Figura 1: *Metabolismo delle purine*
 (Torres RJ, Puig IG, "Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) deficiency: Lesch-Nyhan syndrome", 2007)

Lo schema mostra il primo passaggio della sintesi de novo delle purine, mediato dall'enzima 5'-fosforibosil-1-pirofosfato (PRPP) amidotransferasi, e le due vie di salvataggio, mediate dalla ipoxantina fosforibosiltransferasi (HPRT) e dall'adenina fosforibosiltransferasi (APRT). La sintesi de novo avviene attraverso un processo multi-step che parte dal 5'-fosforibosil-1-pirofosfato (PRPP) e richiede il contributo di amminoacidi e sei molecole di ATP per sintetizzare una molecola di inosina monofosfato (IMP). HPRT catalizza la sintesi di salvataggio di inosina monofosfato (IMP) e guanosina monofosfato (GMP) a partire da ipoxantina e guanina, rispettivamente, utilizzando il PRPP come co-substrato. Un difetto dell'HPRT comporta l'accumulo dei suoi substrati, ipoxantina e guanina, che vengono convertiti in acido urico tramite la xantina ossidasi.

1.1.2. Vie di salvataggio

Alternativa più semplice e meno dispendiosa dal punto di vista energetico per la cellula per sintetizzare purine è rappresentata dalle cosiddette "vie di salvataggio".

In queste vie vengono utilizzati nucleosidi o basi puriniche provenienti dalla degradazione degli acidi nucleici, dal turnover dei nucleotidi stessi o dalla dieta, per formare nuovi nucleotidi purinici. Sono due gli enzimi fondamentali coinvolti in queste reazioni: l'ipoxantina-guanina fosforibosiltransferasi (HGPRasi) che recupera ipoxantina e guanina, portando rispettivamente alla produzione di IMP e GMP (Figura 1) ⁵ e l'adenina fosforibosiltransferasi (APRTasi) che catalizza la reazione da adenina a AMP (Figura 1) ⁵.

Oltre ad esserci un vantaggio in termini energetici (viene consumata solo una molecola di ATP), queste vie riducono i livelli di basi e nucleosidi purinici che, se accumulati, potrebbero inibire altre reazioni metaboliche ⁶. Infatti, si ha anche un consumo di PRPP, che riduce l'attività della glutammina-PRPP ammidotransferasi e quindi ha un effetto negativo sulla sintesi *de novo*.

In caso di deficit enzimatico di HPRT, le molecole di ipoxantina e di guanina che non possono essere recuperate vengono trasformate in xantina dalla xantina ossidasi e, successivamente, in acido urico, determinando iperuricemia (Figura 1) ⁵. Inoltre, si accumulerà PRPP (che non viene consumato dalla reazione di HPRT), che stimolerà la via di sintesi *de novo*.

Un deficit di APRT, invece, determina un mancato riciclaggio dell'adenosina, che viene trasformata in 2,8-dihydroxyadenina (DHA) tramite l'enzima xantina deidrogenasi. Il DHA è scarsamente solubile e tende a cristallizzare nelle urine, causando calcoli renali e danni renali.

1.2 Deficit di HPRT e malattia di Lesch-Nyhan

Con deficit di ipoxantina-guanina fosforibosiltransferasi (HGPRT), più comunemente chiamato HPRT, si intende uno spettro di patologie ereditarie del metabolismo delle purine, caratterizzate da un quadro clinico variabile a seconda dell'attività enzimatica residua. Esiste una classificazione basata sull'entità del difetto enzimatico di HPRT e sul fenotipo clinico presentato dai pazienti che distingue tre varianti: ⁷

1. LND, *Lesch-Nyhan Disease* caratterizzata da deficit completo di HPRT (attività residua 0-2%), associato a manifestazioni neurologiche, comportamentali e manifestazioni correlate all'iperuricemia.
2. HND, *HPRT-related Neurological Disfunction*, con attività HPRT residua (2-8%) e clinica caratterizzata dalle stesse manifestazioni della LND, ad eccezione delle alterazioni comportamentali.
3. HRH, *HPRT-related Hyperuricemia*, con attività residua di HPRT >8-10% e quadro clinico definito unicamente dai sintomi da iperuricemia.

È necessario sottolineare che la categorizzazione dei pazienti in uno specifico gruppo non è sempre così ovvia e soprattutto è variabile nel tempo. Per questo motivo, risulta necessario valutare l'aspetto neurologico dei pazienti ad ogni visita, così da cercare l'eventuale comparsa di nuove manifestazioni ⁸.

La malattia di Lesch-Nyhan (LND, OMIM 300322), è la forma più grave di deficit di HPRT, caratterizzata da deficit completo dell'enzima. È stata descritta per la prima volta nel 1964 da Michael Lesch e William L. Nyhan, osservando un quadro clinico di iperuricemia, ritardo mentale, coreoatetosi e atteggiamento autolesionistico in due fratelli di 5 e 8 anni ⁹. Successivamente, nel 1967, venne pubblicato uno studio da Seegmiller, Rosenbloom e Kelly, che stabiliva il completo deficit dell'enzima HPRT come causa di questa patologia ¹⁰. Gli stessi autori descrissero anche un quadro patologico caratterizzato da difetto parziale di HPRT associato a gotta, in assenza compromissione neurologica, che venne denominato sindrome di Kelly-Seegmiller (OMIM 300323). Ad oggi si preferisce non utilizzare più questa denominazione, ma piuttosto parlare di “varianti” Lesch-Nyhan ¹¹, in particolare distinte nei due sottogruppi descritti precedentemente (HND e HRH).

Nel 1982 Jolly et al.¹² clonarono il gene di HPRT umano, rendendo in questo modo la Lesch-Nyhan il primo disordine neuro genetico per il quale sia stato identificato il meccanismo molecolare.

1.3 Epidemiologia

La malattia di Lesch-Nyhan è una malattia rara, con prevalenza tra 1: 235.000 (in Spagna) e 1: 380.000 (in Canada)⁵. In Italia i casi di Lesch Nyhan ad oggi sono stimati tra 40-50. Si tratta di una patologia su base genetica, X-linked recessiva.

I pazienti affetti sono, quindi, più frequentemente di sesso maschile poiché ereditano la mutazione dalla madre portatrice sana, o, in alternativa, sviluppano una mutazione *de novo*. Le femmine sono solitamente portatrici sane e quindi con fenotipo normale, anche se sono stati riportati casi di fenotipo patologico classico della Lesch-Nyhan anche nel sesso femminile^{13,14}. La spiegazione più plausibile di questo evento, oltre che dall'insorgere di mutazioni *de novo*¹⁵, può essere data dall'inattivazione del cromosoma X sano (solitamente quello di origine paterna), con conseguente trascrizione del gene mutato sul cromosoma materno^{16,17}.

1.4 Eziologia e Patogenesi

La malattia di Lesch-Nyhan è una malattia genetica, causata da mutazioni del gene HPRT1. Questo gene è localizzato sul braccio lungo del cromosoma X nella regione q26-27 e contiene 8 introni e 9 esoni, che codificano per un singolo mRNA maturo di circa 1,6 kb¹⁸. Ad oggi sono state identificate oltre 600 mutazioni di HPRT1, che vanno ad influenzarne l'espressione, portando a fenotipi più o meno severi (<http://www.leschnyhan.org/en/research/mutations-database/>).

In particolare, è stato valutato che delezioni, inserzioni, duplicazioni e mutazioni non-senso, che portano all'espressione di una proteina strutturalmente anomala e quindi attività enzimatica residua praticamente nulla, sono più frequentemente associate al fenotipo più severo, ovvero la malattia di Lesch-Nyhan. Al contrario, mutazioni missenso, che permettono di mantenere una certa quota di attività enzimatica residua, sembrano essere più tipiche delle varianti Lesch-Nyhan con fenotipo attenuato¹⁹.

Esistono poi eccezioni a questa regola, spiegate da meccanismi post-trascrizionali o post-traduzionali¹⁸.

1.4.1 Iperuricemia

La caratteristica principale della malattia di Lesch-Nyhan è rappresentata dall'aumento della produzione di acido urico, causata da deficit dell'enzima HGPRT.

L'iperuricemia conseguente a deficit di HGPRT viene spiegata da diversi meccanismi. Innanzitutto, si verifica un accumulo di ipoxantina e guanina, che vengono trasformate in acido urico dalla xantina-ossidasi. Inoltre, l'aumento di disponibilità di PRPP, che non viene consumato da HGPRT, e la riduzione di IMP e GMP, prodotti finali della reazione, determinano una maggiore attivazione della sintesi purinica *de novo* ²⁰.

Quindi, l'iperuricemia di tipico riscontro nella Lesch-Nyhan è causata in parte dal difetto della via di salvataggio delle purine (mediata direttamente da HGPRT), in parte dalla maggiore attivazione della via *de novo*, con aumento della produzione di purine, in seguito catabolizzate in acido urico ⁵.

1.4.2 Aspetti neurologici e comportamentali

La patogenesi della sintomatologia neurologica e comportamentale tipica della Lesch-Nyhan rimane sconosciuta. Negli anni sono state proposte diverse ipotesi per poter spiegare queste manifestazioni. In primis, quella della tossicità metabolica causata dall'accumulo dell'acido urico prodotto in eccesso per via del difetto di HPRT alla base della patologia.

Ad oggi questa ipotesi è stata abbandonata per diversi motivi: ²¹

- non si hanno evidenze sul fatto che il cervello sia esposto all'iperuricemia e, infatti, i livelli di acido urico misurati nel liquor di pazienti affetti risultano essere normali o solo lievemente aumentati;
- l'iperuricemia è tipica anche di altre condizioni patologiche in cui, tuttavia, non si riscontrano manifestazioni neurocomportamentali come nella Lesch-Nyhan;
- la somministrazione di allopurinolo (che abbassa l'uricemia) nei bambini affetti già a partire dalla nascita non riduce la progressione o la severità della sintomatologia in analisi;
- in studi fatti su topi con difetto di HPRT, pur inducendo la mutazione del gene per l'enzima uricasi e quindi determinando una condizione di iperuricemia, non sono state osservate alterazioni comportamentali dell'animale.

Esclusa la tossicità da acido urico come responsabile delle manifestazioni neurocomportamentali della malattia, sono stati fatti diversi studi per indagare meglio le possibili cause.

Iniziali studi neuroanatomici, condotti tramite autopsie di pazienti affetti da malattia di Lesch-Nyhan deceduti, non hanno riscontrato anomalie anatomiche o istologiche che potessero far sospettare una correlazione con gli aspetti fenotipici neurocomportamentali della malattia ^{22,23}.

Successivamente, studi neurochimici eseguiti su tessuti cerebrali *post-mortem* hanno evidenziato, per la prima volta, alterazioni dei neurotrasmettitori cerebrali ²⁴. Nello specifico, si è riscontrata una riduzione della dopamina a livello del circuito dei gangli della base, associata ad un aumento di serotonina e acido 5-idrossindolacetico, il prodotto finale del metabolismo della serotonina.

Per dare seguito a questa ipotesi, sono stati svolti altri studi biochimici su liquido cerebrospinale (LCS) prelevato da soggetti affetti. Questi studi hanno evidenziato un ridotto livello di acido omovanillico (HVA), il principale catabolita della dopamina, e questo può essere considerato un indice di alterato turnover cerebrale della dopamina, andando a supportare la teoria di anomalo metabolismo centrale delle monoamine come causa della sintomatologia neurologica e comportamentale ^{25,26}.

Molto interessanti sono anche i più recenti studi di neuroimaging, effettuati in vivo su pazienti affetti, tramite la PET.

In uno studio è stato utilizzato il ligando del trasportatore della dopamina WIN 35,428 e si è valutata una notevole riduzione del legame tra i due, deducendo una diminuzione della concentrazione del trasportatore stesso ²⁷.

In un altro studio è stata eseguita la PET con Fluorodopa (18F) e anche in questo caso si è valutata una riduzione dell'accumulo presinaptico di questa sostanza, in particolare a livello di putamen, nucleo caudato, corteccia frontale e sostanza nera, quindi soprattutto nel circuito dei gangli della base ²⁸.

Sono stati fatti anche studi in vitro su linee cellulari PC12 (da feocromocitoma di ratto) con deficit di HPRT che hanno inizialmente riportato risultati non rilevanti a sostegno della teoria dopaminergica ²⁹, per poi, in uno studio successivo, andare a confermare anche in vitro la correlazione tra il ridotto metabolismo della dopamina e il difetto enzimatico tipico della malattia di Lesch-Nyhan ³⁰.

Uno studio più recente, eseguito nel 2008 su una linea cellulare dopaminergica di topo con deficit di HPRT, ha dimostrato che questi neuroni risultano essere vulnerabili a diversi fattori, tra cui la mancanza della via di riciclaggio delle purine (tipica del difetto di HPRT), portando quindi ad una minore velocità di crescita e a bassi livelli di dopamina nelle cellule in esame ³¹.

Oltre agli studi in vitro, importanti sono anche gli studi in vivo, portati avanti su modelli animali di topi knockout con mutazione del gene HPRT1 ³². Negli anni sono stati fatti diversi studi su questi topi, che hanno portato a risultati concordi sulla riduzione della quantità di dopamina rispetto a valori normali, talvolta, però, non correlata allo sviluppo di alterazioni del comportamento ³³⁻³⁶.

In uno studio del 2016 si è andati a misurare i livelli di altri neurotrasmettitori, quali L-glutammato, GABA, acetilcolina, serotonina e norepinefrina, in emisfero destro, cervelletto e midollo allungato di topi *knockout* per il gene HPRT1 ³⁷. Non si sono osservate variazioni di queste molecole o dei loro metaboliti, sostenendo quindi ancora di più la tesi di alterazione dei circuiti dopaminergici, senza interessamento degli altri.

Secondo la letteratura pubblicata fino ad oggi, quindi, la teoria dopaminergica sembra essere la causa più accreditata alla base degli aspetti neurocomportamentali della malattia di Lesch-Nyhan. Tuttavia, non si conoscono i meccanismi responsabili della perdita di dopamina in correlazione alla mutazione di HPRT.

L'ipotesi più plausibile è quella per cui l'assenza della via di salvataggio delle purine in queste cellule (per il deficit di HPRT) determina un'alterazione nell'arborizzazione assonale di questi neuroni dopaminergici o una precoce degenerazione assonale ^{31,38}. Questo, però, prevederebbe alterazioni morfologiche che non sono state riscontrate nei vari studi ³⁹.

Vanno considerate altre ipotesi riguardanti i meccanismi biochimici intrinseci ³¹: Innanzitutto, siccome l'ATP è un prodotto a valle del processo mediato dall'enzima HPRT, un deficit di questo può essere la causa di un difetto energetico, che potrebbe spiegare l'alterazione del circuito dopaminergico. Da uno studio si è visto che concentrazioni ridotte di ATP in linfoblasti con mutazione di HPRT si associano ad una diminuita attività della poli(ADP-ribosio) sintetasi ⁴⁰. Questo compromette i meccanismi di riparazione del DNA della cellula, portando quindi ad accumulare mutazioni a livello

neuronale, la cui normale funzione risulterà alterata. Se colpiti i neuroni del centro respiratorio, tale ipotesi potrebbe essere anche una spiegazione delle morti improvvise che si riscontrano frequentemente nell'ambito della malattia di Lesch-Nyhan ⁴⁰.

Altra ipotesi parte dal fatto che il difetto di HPRT si associa ad una serie di alterazioni metaboliche che aumentano lo stress ossidativo nelle cellule e questa può essere la causa di deplezione dopaminergica, come succede in caso della malattia di Parkinson. Infatti, la mancanza di HPRT causa aumento dell'attività della xantina ossidasi, che porta alla produzione di anione superossido e aumenta la richiesta energetica mitocondriale, determinando un aumento di prodotti ossidanti e riducendo la concentrazione intracellulare di ATP, diminuendo così le difese delle cellule nei confronti degli stress ossidativi ²¹. Tuttavia, sembra che lo stress ossidativo non possa essere l'unico meccanismo alla base del deficit di dopamina e non esistono sufficienti evidenze per confermare questa ipotesi ⁴¹.

Il difetto di HPRT, infine, può anche avere un impatto negativo sul proteasoma, a causa della combinazione dei due meccanismi citati precedentemente (deficit di ATP e stress ossidativo). Anche in questo caso mancano sufficienti evidenze per confermare tale ipotesi ³¹.

Una nuova possibile spiegazione è scaturita da uno studio del 2008 ³¹. Partendo dal concetto che la generazione e differenziazione dei neuroni dopaminergici dipende da un intreccio di fattori e segnali cellulari, alcuni presenti da subito, altri che compaiono più tardivamente nelle fasi di sviluppo. Si è visto che anomalie di un particolare fattore di trascrizione (Nurr1) erano presenti in cellule con difetto di HPRT.

Nurr-1 è un fattore che controlla l'espressione di diversi aspetti fenotipici delle cellule dopaminergiche, sia biochimici, sia morfologici. Lo sviluppo di questi aspetti procede in parallelo, ma i due processi possono anche essere separati e questo, quindi, potrebbe darci una spiegazione della presenza di alterazioni biochimiche, senza la componente morfologica nei pazienti Lesch-Nyhan. Si tratta di studi preliminari, che richiederanno ulteriori approfondimenti in futuro.

1.4.3 Aspetti ematologici

L'anemia macrocitica, o semplicemente un riscontro di macrocitosi, è frequente nei bambini affetti da malattia di Lesch-Nyhan fin dai primi anni d'età. La causa alla base di questa condizione sembra essere l'aumento di utilizzo di acido folico correlato alla maggiore attivazione della sintesi *de novo* delle purine⁴². Nonostante questo, però, non c'è risposta alla terapia con somministrazione di acido folico.

Quindi, considerando la macrocitosi come una caratteristica molto comune dei pazienti con questa patologia, si possono evitare test diagnostici o tentativi di terapia, che risultano non necessari⁴³.

1.5 Presentazione clinica

I pazienti affetti da Lesch-Nyhan sono bambini che appaiono sani alla nascita, totalmente asintomatici. Successivamente, già dai primi giorni di vita, può manifestarsi l'iperuricemia tipica della malattia, nella maggior parte dei casi con il riscontro di cristalli arancioni nel pannolino, indice di cristalluria. In altri casi, i primi sintomi a manifestarsi sono quelli neurologici, con ipotonia e incapacità di mantenere eretto il capo. Più precoce è l'insorgenza dei sintomi, peggiore sarà la clinica e di conseguenza la prognosi del paziente.

Il fenotipo clinico presentato dai pazienti, oltre che al periodo di insorgenza, è strettamente legato all'entità del difetto enzimatico di HPRT, che, a sua volta, dipende dal genotipo⁴⁴. È importante, quindi, eseguire una corretta valutazione clinica del paziente per valutare la sintomatologia presente e la sua entità, distinguendo quadri di Lesch-Nyhan Disease, con fenotipo clinico completo, dalle varianti LND descritte in precedenza (HRH e HND) che differiscono principalmente per la minore gravità o l'assenza dei sintomi neuro comportamentali (Figura 2)^{11,45}.

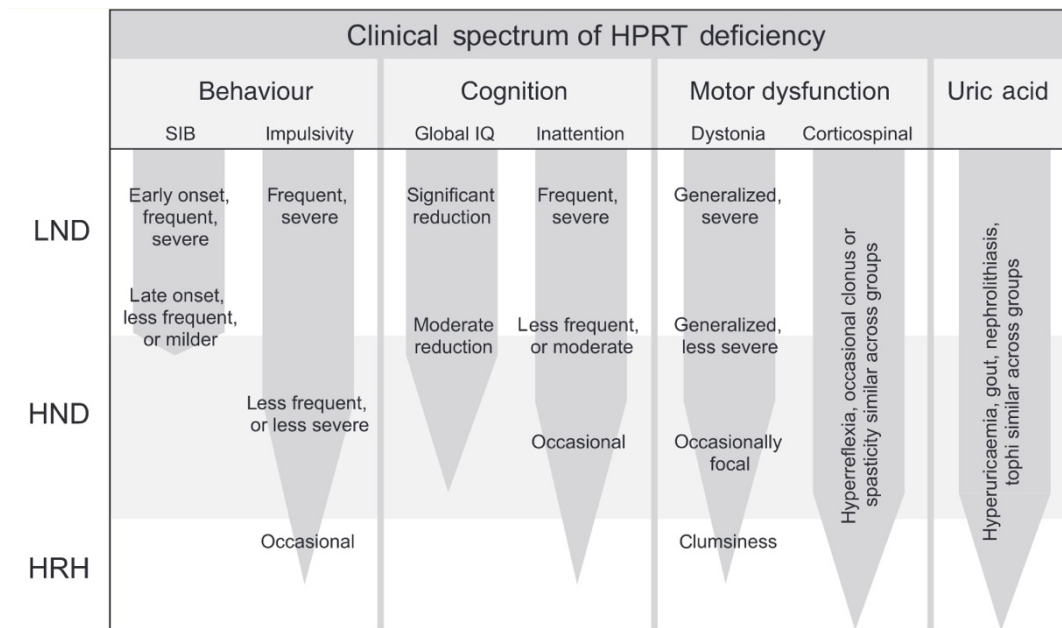


Figura 2: *Spettro clinico associato a difetto di HPRT*
(H. A. Jinnah et al, "Attenuated variants of Lesch-Nyhan disease", 2010)

La figura mostra una rappresentazione schematica delle manifestazioni cliniche associate al difetto di HPRT. Abbiamo tre categorie: LND, HND e HRH. L'iperuricemia è presente in tutte e tre le condizioni. Al contrario, le alterazioni comportamentali, cognitive e motorie sono distribuite in modo diverso. Lo spessore di ciascuna barra è indice della frequenza e gravità di tale manifestazione.

A differenza dell'iperuricemia, presente in tutti i quadri di difetto di HPRT, i sintomi neurocomportamentali si presentano con gravità maggiore o minore in relazione all'entità del difetto enzimatico e vanno ad influenzare in modo rilevante la prognosi del paziente. Per questo motivo, è stata proposta una classificazione della Lesch-Nyhan e delle sue varianti in 4 gruppi: ^{5,46}

- Gruppo 1: normale sviluppo psicomotorio, assenza di sintomi neurologici; include pazienti con deficit parziale di HPRT che determina una condizione di iperuricemia asintomatica. Questi pazienti sono indipendenti e hanno una vita normale, possono presentare talvolta distonia lieve associata all'esercizio fisico, deficit di attenzione o comportamento ossessivo-compulsivo, ma di lieve entità.
- Gruppo 2: sintomi neurologici lievi; i pazienti manifestano andatura distonica, disartria, balbuzie e lieve ritardo mentale; sono comunque soggetti indipendenti, che camminano e vivono da soli.
- Gruppo 3: sintomi neurologici severi; in questi pazienti la distonia diventa severa e li confina alla sedia a rotelle, con conseguente perdita della loro indipendenza. Non si riscontrano, tuttavia, alterazioni comportamentali.

- Gruppo 4: sindrome di Lesch-Nyhan classica; presentazione clinica tipica della Lesch-Nyhan, con comportamento auto-lesivo, coreoatetosi, ballismo, spasticità e incapacità di mantenere la posizione eretta o camminare.

1.5.1 Sintomi renali e articolari

L'iperuricemia è alla base della malattia, è tipica di tutti i pazienti affetti da deficit di HPRT, indipendentemente dall'entità. È presente fin dalla nascita e può manifestarsi con sintomi di entità diversa, prevalentemente di natura renale o articolare.

Spesso le manifestazioni renali rappresentano il sintomo di esordio della malattia, con riscontro di cristalli arancioni nel pannolino, già nei primi giorni di vita. Altre manifestazioni cliniche dell'iperuricemia comprendono: cristalluria, urolitiasi, nefrolitiasi, gotta e artrite giovanile.

Si dovrebbe considerare il sospetto diagnostico di Lesch-Nyhan in bambini con iperuricemia, associata a queste manifestazioni, anche se non ancora presenti i sintomi neurologici. Più precocemente verrà fatta la diagnosi, prima verrà iniziato il trattamento per ridurre l'iperuricemia e quindi prevenire lo sviluppo di tofi gottosi e insufficienza renale.

1.5.2 Sintomi neurologici e comportamentali

I sintomi neurologici solitamente compaiono verso i 3-6 mesi di vita, quindi più tardi rispetto ai sintomi da iperuricemia. Sono tipici delle forme più gravi di difetto di HPRT (LND e HND), mentre non si riscontrano nelle varianti più lievi (HRH). Tali sintomi si manifestano inizialmente con ipotonia e ritardo psicomotorio. La componente comportamentale è ancora più tardiva e di solito si presenta correlato allo sviluppo della dentizione. In alcuni casi può anche svilupparsi epilessia ⁴⁷.

Disturbi motori

Il sintomo motorio principale e precoce che caratterizza la malattia di Lesch-Nyhan è l'ipotonia massiva con ritardo dello sviluppo psicomotorio. Successivamente, si associa distonia d'azione, che può evolvere verso una forma di distonia generalizzata, determinando così l'assenza di qualunque autonomia motoria.

Nella maggior parte dei casi, infatti, questa condizione causa l'impossibilità di acquisire tappe fondamentali dello sviluppo: i pazienti sono costretti su una sedia a rotelle e completamente non autonomi nello svolgimento delle attività quotidiane.

Si riscontrano spesso anche movimenti involontari, quali coreoatetosi e ballismo, di solito non presenti a riposo, ma scatenati soprattutto da situazioni di eccitazione o ansia. Segni piramidali, come spasticità o iperreflessia, possono svilupparsi già precocemente oppure comparire più tardi.

Altre manifestazioni di natura motoria riscontrate frequentemente comprendono disartria, disfagia e opistotono.

La variabilità clinica dello spettro motorio dei casi descritti in letteratura sembra essere giustificata non tanto dalla diversa espressione fenotipica della malattia in sé, ma più che altro dal diverso utilizzo della terminologia. Anche l'età o uno stato ansioso del paziente al momento della valutazione possono spiegare queste differenze ⁴⁷.

Deficit cognitivo

Nella prima descrizione di malattia di Lesch-Nyhan il ritardo mentale veniva incluso nel quadro clinico caratteristico della malattia ⁹. Da studi successivi, però, è emerso che in realtà i pazienti Lesch-Nyhan presentano solitamente un ritardo mentale di grado moderato, mantengono la capacità di concentrarsi, la consapevolezza di sé e sono individui molto sociali ⁴⁸. In caso di deficit parziale di HPRT il grado di ritardo mentale è variabile, solitamente più lieve rispetto ai pazienti Lesch-Nyhan e si associa anche a deficit dell'attenzione ⁴⁹.

Manifestazioni comportamentali

Il comportamento autolesivo è una delle caratteristiche distintive della malattia di Lesch-Nyhan: si parla di Lesch-Nyhan Behaviour (LNB) ⁵⁰. Si presenta esclusivamente in pazienti con deficit completo di HPRT, ma non in tutti, alcuni pazienti possono non sviluppare mai nel corso della loro vita queste manifestazioni.

Solitamente le alterazioni del comportamento compaiono più tardivamente rispetto ai sintomi renali o motori, quando la dentizione è completata, in genere tra i 2 e i 16 anni e spesso l'insorgenza o l'aggravamento si associa a situazioni di stress psicologico ⁵.

Le prime manifestazioni del LNB sono rappresentate dal mordersi le labbra, le guance, la lingua o le dita, oppure sbattere la testa o gli arti contro ostacoli di vario genere. Non vi è un deficit sensoriale alla base di questi comportamenti: i pazienti percepiscono il dolore, così come tutte le altre sensazioni in modo integro ⁵⁰.

Sembrerebbe trattarsi più che altro di un comportamento ossessivo-compulsivo, che fa seguito ad un impulso incontrollabile ⁵. Alcuni pazienti, oltre all'automutilazione, sviluppano anche comportamenti aggressivi nei confronti di familiari e amici, quali sputare, colpire o utilizzare un linguaggio improprio ⁵¹.

I pazienti sono consapevoli del fatto che questi comportamenti, verso sé stessi e verso gli altri, non siano conformi, ma non sono in grado di controllarli. Talvolta riescono a percepire l'inizio di un attacco e, di conseguenza, avvisano i familiari, chiedendo anche di essere contenzionati per evitare lesioni gravi ⁵². Quando l'episodio compulsivo svanisce, i pazienti provano un forte senso di colpa e tendono a scusarsi per il loro comportamento.

1.5.3 Altre manifestazioni cliniche

Una caratteristica comune dei pazienti con Lesch-Nyhan è l'anemia megaloblastica, riscontrata nel 81-92% dei pazienti ⁴³. In alcuni casi è presente anche una forma severa, che necessita di trasfusioni di sangue per risolvere il quadro.

Altra manifestazione clinica che è possibile riscontrare in questi pazienti è rappresentata da problemi digestivi, in particolare dal reflusso gastroesofageo (GERD).

Infine, abbastanza comune è anche il riscontro di difetto di crescita in questi bambini, che può associarsi a scoliosi e lussazioni dell'anca come disturbi ortopedici più frequenti. Queste manifestazioni sono state osservate con maggiore frequenza nei pazienti con forma classica di LND, rispetto alle forme varianti ⁸.

1.6 Diagnosi

La diagnosi di malattia di Lesch-Nyhan va sospettata basandosi sulla clinica del paziente e poi confermata con esami biochimici, enzimatici e molecolari.

Se ci si trova di fronte ad un bambino con iperuricemia associata a ritardo dello sviluppo psicomotorio o altre manifestazioni di tipo neurologico, deve nascere il sospetto diagnostico per questa malattia. Le alterazioni comportamentali, che sono distintive di questa malattia, compaiono più tardivamente ed è necessario fare diagnosi il più precocemente possibile in modo da iniziare subito il trattamento e migliorare, per quanto possibile, l'outcome del paziente.

1.6.1 Diagnosi biochimica

Le indagini biochimiche si basano sulla valutazione dei livelli di acido urico sierico e di acido urico nelle urine. L'iperuricemia, infatti, è una condizione tipica di tutti i pazienti con deficit di HPRT, presente già a partire dalla nascita. I valori normali di acido urico nel siero dipendono dall'età e dal sesso, in generale si considera come indice significativo di LND un valore >8 mg/dl ⁵³. Importante è anche la valutazione del rapporto tra acido urico nelle urine e creatinina (UA/C) che può essere utilizzato come metodica di screening per questa patologia ⁵⁴. In condizioni fisiologiche questo rapporto ha un valore di 1.55 nel corso della prima settimana di vita e man mano tende a diminuire, diventando <1.0 dopo i 3 anni e 0.61 circa a 10 anni. Nei soggetti affetti da malattia di Lesch-Nyhan i valori di UA/C risulteranno aumentati.

Non sembrano esserci differenze di iperuricemia e/o iperuricosuria tra pazienti con LND classica e le forme varianti ⁵.

1.6.2 Diagnosi strumentale

In caso di sospetto di malattia è possibile eseguire indagini di neuroimaging, quali TC o RMN, che però, nei vari studi riportati in letteratura fino ad oggi, non si sono dimostrati utili ai fini diagnostici. La RMN ha evidenziato alcune alterazioni, quali una riduzione del volume cerebrale globale o più localizzata a livello di caudato e putamen, considerate, però, totalmente aspecifiche, ⁵⁵. Oltre a TC e RMN, anche l'esecuzione di uno studio elettroencefalografico (EEG) non è considerata diagnostica in questi pazienti.

1.6.3 Diagnosi enzimatica

Per confermare un sospetto diagnostico di Lesch-Nyhan o delle sue varianti è necessario andare ad eseguire un dosaggio dell'attività enzimatica di HPRT. Le tecniche utilizzate possono essere diverse. Il gold standard è rappresentato dalla tecnica radioenzimatica, anche se oggi è molto utilizzata la cromatografia liquida ⁵⁶. Nella maggior parte dei casi le analisi vengono svolte su eritrociti lisati. In alternativa, si considerano linfociti o fibroblasti.

Come abbiamo già descritto in precedenza, in base all'entità del deficit di HPRT riscontrato potremo suddividere i pazienti in tre categorie: LND (0-2%), HND (2-10%), HNH (>10%) ⁷.

1.6.4 Diagnosi molecolare

L'analisi molecolare rappresenta l'indagine definitiva per porre diagnosi di malattia. Si effettua andando a sequenziare il gene HPRT1 per ricercare delezioni, inserzioni, duplicazioni o mutazioni puntiformi a livello dei suoi nove esoni ⁵⁷.

Una volta accertata la malattia nel bambino, è necessario andare a fare una valutazione genetica della famiglia, in particolare della madre, per diagnosticare un possibile stato di portatore silente. Se la mutazione è nota, infatti, si procede con test genetico sulla madre per verificare la presenza o meno della stessa mutazione e nel caso in cui non si trovasse, si penserà ad una mutazione *de novo* comparsa nel figlio ⁵⁸.

Se, invece, la mutazione del bambino rimane ignota, si possono effettuare indagini biochimiche nella madre per valutare i livelli di acido urico plasmatico e di acido urico, ipoxantina e xantina nelle urine raccolte in 24 ore. Nel caso in cui questi valori risultino aumentati, potrebbero essere indice di uno stato di portatore della mutazione ⁵⁹.

In caso di gravidanze a rischio, ovvero quando c'è una familiarità nota per mutazione del gene HPRT1, è possibile fare diagnosi prenatale mirata, mediante amniocentesi, tra la 15^a e la 18^a settimana di gestazione, oppure villocentesi, eseguita tra la 10^a e la 12^a settimana. Sugli amniociti in coltura o sul campione di villi coriali viene fatta una valutazione molecolare, applicando la diagnosi genetica con la ricerca del gene HPRT mutato ⁶⁰, e enzimatica, misurando l'attività di HPRT. I livelli di HPRT ridotti aumentano il rischio di malattia del feto ^{61,62}.

1.6.5 Nuovi biomarker diagnostici

Uno studio recente ha analizzato campioni di sangue di 139 pazienti con deficit di HPRT, ricercando possibili metaboliti specifici della malattia, da utilizzare come biomarcatori diagnostici ⁶³. Ne sono stati analizzati molti, ma solo sei di questi sono stati ritenuti rilevanti: quattro derivati purinici, AICAR, ZTP, ATP e S-AMP, e due precursori del NAD (H), acido nicotinico e nicotinamide.

Non si è riscontrata una correlazione tra il profilo metabolico e la severità del quadro clinico, ma questi marcatori, soprattutto se usati in combinazione, sembrano avere un buon potere diagnostico e prognostico ⁶³.

1.6.6 Diagnosi differenziali

La principale diagnosi differenziale dei pazienti con deficit di HPRT è rappresentata dalla paralisi cerebrale, per via della distonia e del ritardo psicomotorio manifestati dai pazienti affetti. Altre diagnosi differenziali vanno prese in considerazione per via delle manifestazioni comportamentali e comprendono: sindrome di Rett, disordini dello spettro autistico, sindrome di Tourette, sindrome Cornelia de Lange, neuropatia sensitiva ereditaria e disautonomia familiare ⁵³.

1.7 Prognosi

I pazienti affetti da malattia di Lesch-Nyhan tendono ad avere un'aspettativa di vita ridotta rispetto alla popolazione sana. Tuttavia, grazie ai progressi nella disponibilità di trattamenti, la sopravvivenza è migliorata nel tempo, raggiungendo oggi una media di circa 30 anni ⁵³. Le cause di morte più comuni sono rappresentate dall'insorgenza di un quadro di insufficienza respiratoria o da infezioni, prevalentemente polmoniti da aspirazione.

Altre condizioni potenzialmente letali correlate alla patologia comprendono l'insufficienza renale e la malnutrizione, in caso di forme severe di disfagia, che risultano però più rare ad oggi, se trattate correttamente ⁶⁴. L'incidenza di insufficienza renale può essere ridotta con la diagnosi precoce e il tempestivo inizio del trattamento con allopurinolo.

Per quanto riguarda la malnutrizione, per migliorare l'outcome del paziente, si possono mettere in atto diversi comportamenti: una corretta valutazione nutrizionale, associata a eventuale riabilitazione deglutitoria e, nei casi più gravi, ricorso all'impiego di nutrizione enterale tramite gastrostomia o nutrizione parenterale. Sono stati riportati anche casi di morte improvvisa di soggetti affetti da Lesch-Nyhan, nei quali studi autoptici post-mortem hanno rivelato un possibile danno respiratorio, che quindi rimane la principale causa di morte ⁶⁴.

1.8 Terapia

La terapia della malattia di Lesch-Nyhan ha come obiettivo principale il controllo dell'iperuricemia. Il farmaco più utilizzato a questo scopo è l'allopurinolo, che va ad agire inibendo l'enzima xantina-ossidasi, così da bloccare la conversione di xantina e ipoxantina in acido urico e quindi ridurre i livelli di acido urico nel sangue. In questo modo, l'allopurinolo agisce prevenendo lo sviluppo delle complicanze dell'iperuricemia, che comprendono: cristalluria di acido urico, nefrolitiasi, artrite gottosa e tifo. Nei pazienti affetti da malattia di Lesch-Nyhan gli effetti di questo farmaco sono evidenti: vengono normalizzati i livelli di acido urico sierico, si riduce il rapporto acido urico urinario/creatinina (UA/C) e aumenta l'escrezione di ipoxantina e xantina con le urine ⁶⁵. È consigliato l'inizio della terapia con allopurinolo al momento della diagnosi di malattia, per ottenere risultati migliori e ridurre il più possibile il rischio di complicanze.

La dose iniziale di farmaco che viene somministrata è pari a 5-10 mg/kg al giorno, ma questa va adattata sulla base dei livelli di uricemia, di UA/C e anche di xantina ⁵.

Infatti, una complicanza associata al trattamento con allopurinolo è rappresentata dallo sviluppo di litiasi di xantina, una condizione molto rara, ma di possibile riscontro in questi pazienti, che richiede monitoraggio e aggiustamento della terapia ipouricemizzante ⁶⁶.

Un'alternativa all'allopurinolo nei pazienti con iperuricemia e gotta è il febuxostat, un potente inibitore non purinico della xantina ossidasi ⁶⁷. In pazienti adulti affetti da gotta questo farmaco somministrato giornalmente ad un dosaggio di 80mg o 120mg si è dimostrato avere un maggior effetto ipouricemizzante rispetto all'allopurinolo con dosaggio di 300mg ⁶⁸.

Tuttavia, nei bambini con malattia di Lesch-Nyhan il febuxostat rappresenta un farmaco di seconda scelta, da utilizzare nel caso in cui il paziente manifesti reazioni da ipersensibilità all'allopurinolo, quali sindrome di Steven Johnson o necrolisi epidermica tossica (di raro riscontro).

Oltre al trattamento dell'iperuricemia, sempre per quanto riguarda l'aspetto renale, sono fortemente indicate una corretta idratazione, con l'obiettivo di mantenere la diuresi superiore a 2-2.5 L/die e l'alcalinizzazione delle urine, con sodio bicarbonato e/o citrato di potassio, in modo da portare il pH urinario fra 6,5 e 7 così da ridurre il rischio di calcolosi ⁶⁹.

Per quanto concerne l'aspetto neurologico, siccome ad oggi rimane sconosciuta la patofisiologia alla base, risulta difficile pensare ad un trattamento efficace.

Considerata la forte ipotesi di deficit dopaminergico alla base dello sviluppo della sintomatologia neuro-comportamentale, si è pensato di utilizzare farmaci dopaminergici. Inizialmente, però, si è visto che l'utilizzo di levodopa causava un peggioramento dei sintomi motori nei pazienti ⁷⁰.

Bisogna, tuttavia, considerare l'età di insorgenza della deplezione di dopamina, perché questa influenza l'outcome dei pazienti e, di conseguenza, la risposta al farmaco in esame. Si è visto, infatti, che in topi adulti la distruzione di neuroni dopaminergici nigrostriatali causa una forma di parkinsonismo che migliora con la levodopa; invece, la stessa lesione in topi appena nati causa iperattività, esacerbata dal trattamento con levodopa ⁷¹. Questo significa probabilmente che un deficit dopaminergico precoce induce un adattamento neuronale che causa poi il fenotipo comportamentale, non attenuabile con la terapia dopaminergica. Per questo motivo, si è pensato di iniziare la terapia con levodopa precocemente, prima dello sviluppo della sintomatologia auto-mutilante, in modo da prevenirla. In uno studio recente è stata messa in atto la terapia in tre pazienti affetti da Lesch-Nyhan di 11-13 mesi e due di questi a distanza di 14/15 anni non hanno mai sviluppato alterazioni comportamentali, pur mantenendo distonia, ipotonia e le altre manifestazioni neurologiche ⁷².

Oltre alla levodopa, ci sono altre terapie in fase di studio, in particolare per il trattamento dell'aspetto comportamentale autolesivo dei pazienti. Tra queste troviamo innanzitutto il gabapentin, farmaco analgesico e anticonvulsivante ⁷³ e la tossina botulinica, che, sfruttando la sua funzione di blocco della conduzione neuromuscolare, se iniettata bilateralmente a livello dei muscoli masseteri, potrebbe andare a ridurre le auto-mutilazioni dei pazienti ⁷⁴.

Un altro farmaco che sembra avere effetti interessanti è la S-adenosil metionina (SAM), un coenzima presente fisiologicamente nel nostro organismo, che funziona da donatore di gruppi metilici, promuovendo in questo modo reazioni di trans-metilazione e quindi di sintesi di serotonina, dopamina e adrenalina ^{75,76}.

Ulteriore possibilità presa recentemente in considerazione è la Deep Brain Stimulation (DBS), un trattamento innovativo basato sulla stimolazione elettrica di particolari aree cerebrali, in questo caso il globo pallido interno. Questo trattamento è stato applicato in tre pazienti e ha determinato in tutti i casi un outcome positivo, con scomparsa delle manifestazioni comportamentali autolesive⁷⁷⁻⁷⁹.

Ad oggi, nonostante i risultati promettenti sull'utilizzo di queste terapie, le evidenze non sono ancora abbastanza solide da consentirne l'adozione come trattamento ufficiale. I farmaci che vengono utilizzati nella maggior parte dei pazienti hanno quindi uno scopo puramente sintomatico.

Per la spasticità e la distonia si usano principalmente le benzodiazepine, come diazepam, clorazepam, lorazepam, per il loro effetto miorilassante, e il baclofene, un miorilassante ad azione centrale che agisce da inibitore dell'acido gamma-aminobutirrico ⁴⁷. In alcuni pazienti si è testata anche la somministrazione di baclofene intratecale, che sembra avere buoni effetti sia sulla distonia, sia per quanto riguarda l'aspetto comportamentale, forse per un'interazione con i circuiti dopaminergici ^{80,81}.

Da un punto di vista non farmacologico, la riabilitazione fisica risulta molto importante, anche per quanto riguarda le componenti di disartria e disfagia, così come l'utilizzo di supporti per la deambulazione e ausili per il controllo della postura e la prevenzione delle deformità.

Per le manifestazioni comportamentali, oltre ai farmaci già citati, sono spesso utilizzati anche farmaci neurolettici, come il risperidone, che in alcuni casi sembra aver avuto un buon effetto ^{82,83}. In aggiunta alla terapia medica, è importante cercare di ridurre le situazioni di stress a cui viene sottoposto il paziente, in quanto queste influiscono negativamente sulla sintomatologia. A questo scopo viene in aiuto la psicoterapia.

Nonostante queste terapie e accorgimenti, però, il trattamento più comune ed efficace delle manifestazioni comportamentali rimane la contenzione fisica ⁸⁴. Questa prevede, ad esempio, l'utilizzo di guanti, per evitare l'esposizione delle mani, oppure i tutori per bloccare gli arti superiori e/o inferiori ⁸⁵, spesso richiesti dal paziente stesso.

Per quanto riguarda il trattamento odontoiatrico, questo merita un capitolo a parte, per via delle tipiche lesioni della mucosa orale che caratterizzano la malattia di Lesch-Nyhan nella sua forma tipica. In passato l'unica opzione terapeutica era rappresentata dall'estrazione totale degli elementi dentali, con conseguente danno alimentare permanente. Ad oggi, il trattamento di scelta come prevenzione del danno ai tessuti orali e periorali è rappresentato dai bite di contenimento, che, posti uno sull'arcata superiore e uno su quella inferiore, risultano essere efficaci nell'attutire il trauma masticatorio e le sue conseguenze, conservando la dentizione del paziente. Oggi questi dispositivi vengono realizzati in resina, sono in genere ben tollerati dai pazienti e facilmente gestibili da parte dei genitori ⁸⁶.

L'estrazione dentale viene riservata ai casi più gravi in cui non si riesce a evitare l'automutilazione con gli altri mezzi di contenzione. Non è un intervento di routine nei pazienti affetti, ma non è neanche l'ultima spiaggia in caso di mutilazione orale. Bisogna capire quando è il caso di agire e farlo il prima possibile per evitare complicanze, soprattutto di natura estetica ⁸⁷.

LE SCIENZE “OMICHE”

Per scienze “omiche” si intendono una serie di discipline nell’ambito della ricerca scientifica che studiano in modo sistematico e globale le componenti biologiche all’interno di un organismo. Il suffisso “-omica” può essere aggiunto ad una qualsiasi tecnica di biologia molecolare, qualora si voglia identificare un’analisi simultanea di un insieme di composti biologicamente attivi ⁸⁸.

A seconda delle categorie di dati analizzate (geni, trascritti, proteine o metaboliti), nell’ambito delle scienze “omiche” possiamo distinguere: genomica e epigenomica, trascrittomica, proteomica, metabolomica. Nell’approccio “multi-omico” vengono integrati tra loro tutti i dati “omici” ottenuti in modo da ottenere una visione più completa e dettagliata dei processi biologici (Figura 3) ⁸⁹.

Si utilizzano tecnologie ad alto rendimento, *high-throughput*, che sono in grado di analizzare un grande numero di dati in tempi relativamente brevi, come le tecniche di sequenziamento di nuova generazione (NGS), i microarray o la spettrometria di massa (MS) ⁹⁰. Nello specifico, la genomica e la trascrittomica si avvalgono del sequenziamento NGS, mentre la proteomica e la metabolomica si affidano alla spettrometria di massa ⁹⁰.

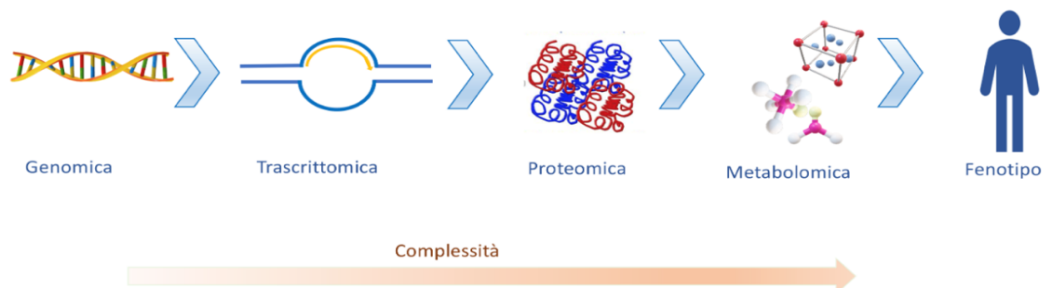


Figura 3: *Integrazione delle scienze “omiche” e livelli di complessità biologica* (Cervesato A, Raucci R, Buononato D, et al, “Application of proteomics and metabolomics to study inherited kidney disorders: from big data to precision medicine”, 2020)

In ambito biomedico le scienze “omiche” hanno una spiccata utilità. Infatti, rappresentano strumenti estremamente efficaci per comprendere a fondo le basi molecolari delle patologie, lo sviluppo biologico dei singoli individui e la risposta a eventuali interventi terapeutici. Gli studi di genomica e trascrittomica hanno contribuito a chiarire i modelli di espressione genica in diversi stati biologici, sia sani che malati.

Allo stesso modo, la proteomica e la metabolomica, sono risultate importanti nel comprendere il ruolo di svariate molecole e le loro interazioni negli organismi ⁹⁰.

2.1 Genomica

La decodifica del genoma umano, pubblicata con il “Progetto Genoma Umano” nel 2003, ha aperto una nuova era di ricerca scientifica nel campo biomedico, la cosiddetta era “post-genomic” ⁹¹. Da questi presupposti nasce la genomica, una disciplina nell’ambito delle scienze “omiche” che ha come oggetto di studio proprio il genoma umano. A differenza della genetica che si concentra sullo studio dei singoli geni, la genomica analizza l’intero genoma, valutando sia le mutazioni dei singoli geni, sia soprattutto le interazioni tra geni diversi e con l’ambiente esterno, interazioni che possono avere un importante significato nella patogenesi di alcune malattie ⁸⁸.

In questo modo è possibile mappare e studiare le varianti genetiche associate a patologie ereditarie in diverse popolazioni, con l’obiettivo di migliorare la comprensione fisiopatologica di fenotipi complessi.

Le tecnologie utilizzate sono migliorate molto negli anni, portando ad una importante riduzione dei costi ⁹². Tra queste troviamo le tecniche NGS per il sequenziamento dell’intero genoma e dell’esoma e il microarray di genotipi.

2.2 Trascrittomica

La trascrittomica è una disciplina che studia il trascrittoma, ovvero l’insieme degli RNA trascritti a partire dal genoma di un dato campione biologico, una cellula o un tessuto. I metodi utilizzati per questo tipo di valutazione includono i microarray di espressione dell’mRNA, il sequenziamento dell’RNA e la reazione a catena della polimerasi quantitativa in tempo reale (qRT-PCR o qPCR) ^{93,94}.

L’obiettivo della trascrittomica è quello di studiare l’espressione genica di specifici geni andando a quantificare i livelli di RNA trascritto.

In questo modo è possibile realizzare uno studio comparativo dell'espressione genica tra tessuti malati e sani, identificando i geni che mostrano cambiamenti significativi in condizioni patologiche.

Queste informazioni non solo approfondiscono la comprensione della patogenesi di una malattia, ma possono anche mettere in evidenza trascritti chiave da poter utilizzare come nuovi biomarcatori diagnostici ⁸⁸.

Oltre a questi importanti risultati, gli studi di trascrittomica hanno anche favorito lo sviluppo della ricerca scientifica nel campo degli RNA non codificanti, coinvolti in numerose patologie.

2.3 Proteomica

La proteomica ha come materia di studio l'insieme di proteine espresse in una cellula, un tessuto o nell'intero organismo. Identificando e caratterizzando il corredo proteico è possibile scoprire nuovi biomarcatori alla base di una patologia, ma anche analizzare possibili modifiche post-traduzionali, che svolgono un ruolo chiave nella regolazione delle funzioni cellulari ⁹⁵.

L'approccio proteomico, per isolare e identificare le proteine, si avvale dell'utilizzo combinato di elettroforesi bidimensionale (2DE) e spettrometria di massa ⁹⁶. Nell'ambito della proteomica è fondamentale la valutazione quantitativa, in modo da identificare i differenti dosaggi di proteine tra campioni sani e malati. Quindi, è necessario utilizzare sempre delle tecniche che permettano di mettere in atto una misurazione di tipo quantitativo ⁹⁷.

2.4 Metabolomica

La metabolomica si concentra sul metaboloma, vale a dire l'insieme di amminoacidi, acidi grassi, carboidrati o altri metaboliti, che nel loro insieme riflettono la funzione metabolica di un sistema biologico in specifiche condizioni nutrizionali, genetiche e ambientali ⁸⁸. Viene utilizzata in ambito biomedico per studiare a fondo i processi fisiopatologici coinvolti nello sviluppo e nella progressione delle patologie e identificare possibilmente nuovi biomarcatori diagnostici e prognostici ⁹⁸.

Infatti, il metaboloma rappresenta il prodotto finale dei vari processi cellulari e, di conseguenza, i cambiamenti nell'espressione genica, nella produzione proteica e nell'ambiente si riflettono su di esso.

A dimostrazione di ciò, in uno studio di metabolomica svolto su un campione di uomini finlandesi, noti portatori di polimorfismi a singolo nucleotide, si è dimostrata la correlazione tra questi e i fenotipi metabolici sierici riscontrati, fornendo importanti basi per studi futuri ⁹⁹.

La metabolomica può essere di due tipologie diverse, a seconda dei metaboliti analizzati e degli obiettivi dello studio. La metabolomica “*targeted*” si riferisce all'analisi di un numero limitato di metaboliti, selezionati in funzione di uno specifico obiettivo di ricerca. Al contrario, la metabolomica “*untargeted*” consiste in un'analisi globale e non selettiva di tutti i metaboliti presenti nel campione in esame, senza un'ipotesi predefinita ¹⁰⁰.

Oltre alla ricerca biomedica, dove gli studi di metabolomica hanno lo scopo di identificare biomarcatori di malattie, monitorare lo stato di salute e sviluppare nuovi approcci diagnostici e terapeutici, questa disciplina è stata anche utilizzata in farmacologia, per studiare gli effetti dei farmaci sul metabolismo, e in ambito nutrizionistico, al fine di valutare gli effetti dell'alimentazione sul metabolismo.

Da un punto di vista tecnico, la metabolomica comprende tre passaggi fondamentali: preparazione del campione con estrazione dei metaboliti, misurazione del metaboloma e analisi dei dati (Figura 4) ¹⁰¹.

2.4.1 Preparazione del campione

Le tipologie di campioni che possono essere studiati in metabolomica sono svariate e comprendono sangue, urina, tessuti, cellule o altri fluidi biologici. La scelta del campione dipende dagli obiettivi della ricerca e dalle informazioni che si desidera ottenere dallo studio.

È importante che la raccolta e la conservazione del campione vengano svolte in modo adeguato, per ridurre il più possibile errori in fase pre-analitica ¹⁰².

Altrettanto importante è la fase di estrazione dei metaboliti dal campione, che deve essere eseguita tenendo conto del loro rapido turnover, spesso nell'ordine di pochi secondi, e del conseguente rischio di alterare in modo significativo il profilo metabolico del campione. Esistono diversi approcci, i più tipici includono il congelamento e/o la denaturazione enzimatica con solventi organici.

Per i fluidi biologici o le cellule in coltura solitamente si aggiunge un solvente organico freddo, di modo che la bassa temperatura rallenti il metabolismo, mentre il solvente organico si occupa della denaturazione enzimatica permanente ¹⁰¹.

Per i campioni tissutali, invece, viene schiacciato il tessuto tra due piastre metalliche a temperatura di azoto liquido (pinza di Wollenberger ¹⁰³), in modo da determinarne il congelamento. Dopodiché, l'estrazione viene eseguita con solvente organico freddo.

2.4.2 Misurazione del metaboloma

Una volta preparato il campione, si passa alla fase di misurazione del metaboloma, che si avvale di strumenti analitici avanzati. Innanzitutto, si utilizza la Cromatografia Liquida ad Alte Prestazioni (UHPLC) con lo scopo di separare i vari metaboliti contenuti nel campione sulla base delle loro proprietà chimiche, come ad esempio l'idrofobicità. Questa tecnica viene utilizzata nella fase preliminare di analisi del campione, prima di passare alla spettrometria di massa: si parla di *LC-MS-based metabolomics* ¹⁰⁴. In questo modo si migliora la risoluzione analitica della spettrometria di massa e, in particolare, si va a ridurre la soppressione ionica (possibile durante il processo di ionizzazione elettrospray), si prevengono artefatti quantitativi e si separano gli isomeri (molto comuni tra i metaboliti), così che questi risultino successivamente identificabili ¹⁰¹.

In seguito, si passa alla spettrometria di massa (MS), che è la tecnica più utilizzata per lo studio dei metaboliti, in quanto consente di identificare e quantificare i metaboliti in un campione, sulla base del loro rapporto massa/carica (m/z).

Come prima cosa, l'estratto liquido da analizzare deve essere ionizzato, di modo tale che le molecole assumano una carica e che quindi risultino visibili al "rilevatore" della macchina. La tecnica più utilizzata per la ionizzazione è la ionizzazione elettrospray (ESI), che consiste nel pompare il campione tramite un ago sottile e applicarvi un'alta tensione elettrica, in modo da convertire le molecole di liquido in goccioline cariche, che infine generano ioni in fase gassosa per evaporazione del solvente ¹⁰⁵.

Una volta ottenute le particelle cariche, queste vengono separate sulla base del rapporto m/z da un analizzatore di massa. Lo strumento più utilizzato è Orbitrap, un elettrodo a forma di mandrino che crea un campo elettrico in cui gli ioni iniettati si muovono oscillando ad una frequenza che dipende dal loro rapporto m/z ¹⁰⁶.

Attraverso una formula, poi, il sistema converte queste oscillazioni in un segnale spettrale, determinando in modo molto preciso le masse.

2.4.3 Analisi dei dati

Ultimo step è quello di elaborazione e interpretazione dei risultati. La fase più importante è quella di identificazione dei metaboliti, che si basa sul confronto dei risultati ottenuti con database e librerie spettrali. Molto utilizzato è il programma Open Source XCMS, accessibile online tramite una piattaforma web ¹⁰⁷.

Infine, l'analisi statistica ci consente di capire se ci sono e quali sono i metaboliti che cambiano significativamente tra i campioni patologici e non.

In questo modo, si riescono a trarre le conclusioni di un determinato studio.

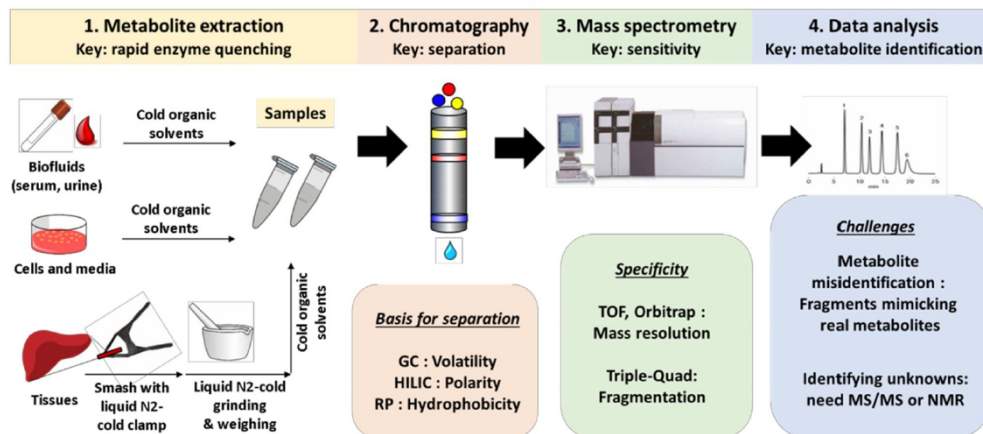


Figura 4: *Passaggi nell'analisi metabolomica* (Jang C, Chen L, Rabinowitz JD, "Metabolomics and Isotope Tracing", 2018)

Nella figura sono ben rappresentati i diversi passaggi che caratterizzano un'analisi metabolomica. Si parte dalla preparazione del campione, con il processo di estrazione dei metaboliti, eseguito con modalità diverse a seconda della tipologia di tessuti analizzata. Successivamente si passa alla cromatografia, che permette di separare i campioni sulla base di caratteristiche, come la volatilità (per i gas), la polarità o l'idrofobicità. La cromatografia è seguita dalla spettrometria di massa, punto cardine per la misurazione dei metaboliti in base al loro rapporto m/z . Infine, troviamo l'analisi dei dati, con l'identificazione dei metaboliti riscontrati.

BACKGROUND ED OBIETTIVI DELLO STUDIO

La malattia di Lesch-Nyhan (LND) è una malattia rara, geneticamente determinata ad ereditarietà recessiva legata al cromosoma X. Il gene HPRT1, ad oggi, è il solo gene riconosciuto come responsabile della malattia e ne sono state descritte più di 600 mutazioni diverse ⁵³. HPRT1 codifica per l'enzima ipoxantina-guanina fosforibosiltransferasi (HPRT), un enzima coinvolto nella via di salvataggio delle purine, che si occupa del recupero di ipoxantina e guanina per ottenere nucleotidi inosinici (IMP, precursore di AMP, ADP e ATP) e guanilnici (GMP, GDP, GTP) ². Un deficit di tale enzima comporta iperuricemia severa, a causa dell'accumulo, da un lato, di basi azotate non "recuperate" che vengono degradate dalla xantina ossidasi in acido urico, dall'altro di fosforibosilpirofosfato (PRPP), che, essendo il primo substrato della via di sintesi de novo delle purine, ne determina un'iperattività ⁵.

A seconda della mutazione presente, varierà l'attività enzimatica residua, determinando quadri fenotipici diversi, distinti principalmente in tre sottogruppi ⁸:

- Fenotipo classico della LND (OMIM 300322), causato da deficit completo dell'attività enzimatica e caratterizzato da iperuricemia e manifestazioni neurocomportamentali (disfunzione motoria, deficit intellettivo e disordini comportamentali con episodi di automutilazione);
- Fenotipo neurologico, definito HPRT-Related Neurological Dysfunction (HRND), causato da difetto enzimatico parziale, con attività residua <10% e caratterizzato da vari gradi di sintomi neuromuscolari, in assenza di disordini del comportamento;
- Fenotipo iperuricemico, definito HPRT-Related Hyperuricemia (HRH), con attività enzimatica residua >10% e quadro clinico definito unicamente da sintomi secondari all'accumulo di acido urico.

L'accumulo di acido urico giustifica le manifestazioni renali e articolari, mentre rimane ignoto come il deficit di HPRT possa determinare il quadro neurologico e comportamentale dei pazienti affetti da LND. Diversi studi, neurochimici, di imaging, ma anche in vitro e su modelli animali, hanno evidenziato alterazioni a carico del sistema dopaminergico e ad oggi questa è l'ipotesi più accreditata per spiegare il quadro clinico neurocomportamentale ²¹.

Nonostante questo, però, le terapie farmacologiche proposte, ad esempio la terapia dopaminergica sostitutiva con levodopa, hanno mostrato solo una parziale efficacia sulle alterazioni neurocomportamentali e rimangono, per questo, ancora in fase di studio ⁷². La terapia, ad oggi, ha uno scopo puramente sintomatico e si basa sull'utilizzo di benzodiazepine, baclofene (anche intratecale) e poi la contenzione fisica, che rimane la misura cardine per impedire le automutilazioni ricorrenti ⁸⁴.

Nel 2015 è stato portato a termine uno studio metabolomico *targeted* su campioni di sangue di una coorte di pazienti francesi affetti da Lesch-Nyhan e dalle varianti HND e HRH ⁶³. Sono stati misurati i livelli di metaboliti coinvolti nel metabolismo di basi azotate e nucleotidi, confrontando i pazienti affetti dalla malattia, con i controlli sani. Sei metaboliti si sono rivelati possibili biomarker fortemente predittivi, alcuni derivati purinici (AICAR, ZTP, ATP e Succinil-AMP), altri precursori di NAD(H) (acido nicotinico, nicotinamide). Non si è valutata una correlazione tra severità clinica del quadro patologico e concentrazione dei biomarker, così come non è stata valutata alcuna differenza significativa tra pazienti trattati e soggetti non sottoposti a trattamento.

Successivamente, nel 2016 uno studio metabolomico *untargeted* su campioni di tessuto cerebrale e di siero di topi con mutazione di HPRT (modello animale di Lesch-Nyhan) ha portato a risultati interessanti, dimostrando la presenza di sei metaboliti “anomali” nei topi *knockout* HPRT rispetto agli individui *wild-type* ¹⁰⁸. Due di questi metaboliti sono risultati significativi e sono AICAR (5-aminoimidazolo-4-carbossamide ribonucleotide), che risulta aumentato, e 1-MI4AA (1-metilimidazolo-4-acido acetico), che invece risulta ridotto. Entrambi partecipano al metabolismo dell'istidina e, di conseguenza, dell'istamina, confermando quindi l'ipotesi dopaminergica. Inoltre, AICAR è un intermedio nella via di sintesi delle purine e ciò spiegherebbe la correlazione tra il suo aumento e la malattia.

Questi studi hanno posto le basi per lo studio in esame, che si pone come obiettivo finale quello di comprendere il meccanismo fisiopatologico alla base delle alterazioni neurocomportamentali caratteristiche della malattia di Lesch-Nyhan.

Questo rappresenterebbe un importante passo per la comprensione della malattia e, come conseguenza, l'identificazione di terapie eziologiche efficaci per permettere un miglioramento della qualità di vita dei pazienti affetti.

La metabolomica è uno strumento molto importante per questi studi, perché offre la possibilità di studiare simultaneamente le reazioni enzimatiche alla base delle vie metaboliche, valutando i metaboliti prodotti, consumati e/o convertiti e ottenendo così un'istantanea della fisiologia di una cellula o organismo.

Lo scopo di questo studio, in particolare, è quello di eseguire analisi metabolomiche untargeted ad ampio spettro su campioni di plasma prelevati da una coorte di pazienti affetti da LDN classica seguiti presso l'IRCCS Giannina Gaslini di Genova. I dati "omici" ottenuti dai campioni LND verranno confrontati con i dati ottenuti da una popolazione controllo sana, al fine di comprendere come il difetto enzimatico alla base della patologia possa andare ad alterare i processi metabolici cellulari.

In aggiunta, verrà fatto anche un confronto con una serie di campioni raccolti in pazienti affetti da paralisi cerebrale infantile (PCI), che quindi presentano una sintomatologia neurologica in parte sovrapponibile ai pazienti LND, ma in assenza della malattia stessa.

Da ciò si deduce che l'obiettivo primario dello studio è quello di cercare di identificare una possibile relazione tra il disordine genetico e i metaboliti accumulati e/o deficitari nei soggetti malati. Tra gli obiettivi secondari, invece, rientrano:

- Identificare nuovi biomarkers per permettere una diagnosi precoce di LND;
- Identificare bersagli farmacologici per possibili trattamenti sperimentali;
- Valutare la correlazione tra le informazioni metabolomiche ottenute e le informazioni cliniche, biochimiche e genetiche dei pazienti per una migliore comprensione dei vari aspetti della patologia.

MATERIALI E METODI

4.1 Disegno dello studio

Abbiamo eseguito uno studio osservazionale prospettico monocentrico e biologico traslazionale, andando ad analizzare i campioni di plasma di soggetti seguiti o afferenti all'Istituto Giannina Gaslini di Genova, con diagnosi di malattia di Lesch-Nyhan nel suo fenotipo classico LND. Per ciascun paziente reclutato, previo consenso informato da parte dei genitori, sono state raccolte le informazioni anamnestiche e un campione di sangue venoso di 3-4 mL, durante i prelievi di routine eseguiti in occasione di un controllo clinico. I campioni ematici sono stati prelevati in provette contenenti acido etilendiamminotetraacetico (EDTA), un agente chelante di utilizzo comune in campo medico e di laboratorio. Nell'ambito degli studi metabolomici e genetici, l'EDTA serve non solo come anticoagulante, ma anche per prevenire la degradazione degli acidi nucleici, in quanto agisce bloccando l'attività DNAsica ¹⁰⁹.

I campioni sono stati raccolti nei pazienti a digiuno e sono stati inviati immediatamente alla Biobanca dell'Istituto. Qui, entro 60 minuti dal prelievo, sono stati centrifugati a 3000 RPM per 10-15 minuti, in modo da separare plasma/siero dalle altre componenti cellulari per poi passare alla fase di aliquotazione. Questa prevede l'estrazione del plasma dalle provette e la sua suddivisione in cryo-vials da 500 uL, successivamente poste in freezer a -80°C per la conservazione. Questi step sono molto importanti da seguire per la preparazione dei campioni di studi metabolomici, al fine di andare a ridurre il più possibile il rischio di errori in fase pre-analitica ¹⁰².

I campioni dei pazienti affetti dalla malattia sono stati confrontati con una popolazione di controlli sani (CTRL), raccolti in collaborazione con il Laboratorio Centrale e il Centro Trasfusionale dell'Istituto. I soggetti sani sono stati selezionati con un rapporto 1:1, per sesso (solo maschile) e fasce di età compatibili con quelle dei campioni LND, in modo da minimizzare i possibili bias di selezione. Dal campione ematico, centrifugato e mantenuto a 4°C per un massimo di 24h nel laboratorio, è stata prelevata un'aliquota di plasma, subito trasferita in freezer a -80°C per la conservazione.

Oltre ai CTRL, grazie alla collaborazione dell'UOC di Neuropsichiatria Infantile dell'Istituto, sono stati raccolti campioni di plasma da bambini affetti da paralisi cerebrale infantile (PCI) secondaria ad asfissia perinatale e non su base genetica. Questa coorte è stata selezionata per offrire un gruppo di confronto caratterizzato da un quadro neurologico in parte sovrapponibile alla LND, ma privo della mutazione genetica alla base. Le modalità di prelievo e la conservazione di questi campioni sono state identiche a quelle adottate per i pazienti LND.

Una volta conclusa la raccolta dei campioni dei pazienti arruolati, questi sono stati inviati presso il Laboratorio Core Facilities dell'Istituto per procedere all'analisi metabolomica *untargeted*. I dati ottenuti sono stati poi analizzati e valutati in correlazione alle informazioni cliniche disponibili, confrontando le varie popolazioni in analisi in modo da trarre le conclusioni dello studio.

4.2 Descrizione della coorte di studio

Lo studio è stato proposto a tutti i pazienti con difetto totale di HPRT, e quindi fenotipo classico LND, seguiti presso l'IRCCS Giannina Gaslini di Genova, includendo anche i pazienti che accedono all'Istituto per i controlli in occasione degli Open Day organizzati ogni anno. I campioni LND analizzati sono stati 38, corrispondenti a 24 pazienti affetti da forma completa di Lesch-Nyhan.

I criteri di selezione applicati per questa coorte di pazienti analizzati sono stati:

- Deficit di HPRT confermato da test enzimatici e/o test genetici;
- Volontà di partecipazione allo studio, espressa tramite consenso informato da parte dei genitori o da eventuali tutori, data l'impossibilità dei pazienti di esprimere assenso a causa della patologia di base.

Tra i criteri di esclusione, invece, troviamo:

- Deficit enzimatico parziale e/o assenza di coinvolgimento neurologico (varianti della Lesch-Nyhan, HRND e HRH);
- Concomitanza di altre malattie metaboliche;
- Riscontro di malattie croniche, indipendenti dalla malattia di Lesch-Nyhan.

Alcuni dei campioni utilizzati per lo studio erano già stati raccolti negli anni precedenti e conservati presso la Biobanca dell'istituto, altri sono stati prelevati tra la fine del 2024 e aprile 2025. Le fasce di età reperite spaziano da bambini sotto all'anno di vita, fino a pazienti adulti, con età superiore a trenta anni.

I campioni controllo (CTRL) sono stati raccolti tra marzo e aprile 2025. Sono stati selezionati presso il Laboratorio Centrale dell'Istituto soggetti sani, privi di patologie note e con esami nei limiti di normalità, compatibili per sesso e età con i pazienti LND. Per la popolazione adulta, sono stati inclusi i campioni di alcuni donatori volontari afferenti al Centro Trasfusionale dell'Istituto, anch'essi sani e con esami ematici non alterati. In totale sono stati raccolti e analizzati 36 campioni di pazienti sani.

Per quanto riguarda la popolazione di campioni di bambini con Paralisi Cerebrale Infantile (PCI), non si è potuto del tutto rispettare la corrispondenza di età e sesso, per via delle difficoltà di reclutamento dei pazienti. Sono stati raccolti 28 campioni in totale, 18 di sesso maschile e 10 di sesso femminile, distribuiti nelle varie fasce d'età.

4.3 Analisi metabolomica *untargeted*

L'analisi metabolomica *untargeted* è stata eseguita sui campioni di plasma delle tre popolazioni in analisi, raccolti ed elaborati precedentemente, per poi essere conservati in congelatore ad una temperatura di -80° C.

Prima fase è stata quella della preparazione dei campioni all'analisi vera e propria. I campioni sono stati fatti scongelare e successivamente sottoposti a vortex in modo da omogeneizzare il contenuto. Dopodiché, per ciascun campione sono stati prelevati 50 uL di plasma, trasferiti in una provetta in cui si è aggiunto il solvente freddo in rapporto 3:1, in questo caso 150 uL di metanolo (MeOH), con la funzione di separare la componente proteica e quindi estrarre i metaboliti. Dopo averli nuovamente passati al vortex, i campioni sono stati lasciati una notte a -20° C.

La mattina successiva i campioni sono stati centrifugati a 14.000 giri per 5 minuti ad una temperatura di 4° C. In questo modo nella provetta si è ottenuta una separazione tra le proteine precipitate e il surnatante contenente metaboliti. Sono stati quindi prelevati 100 uL di surnatante per ciascun campione e trasferiti in vial in vetro, adatti per la successiva analisi UHPLC-MS.

In seguito, si è passati alla fase di “asciugatura del campione”, mediata da un sistema chiamato Speedvac che agisce combinando vuoto, calore e rotazione in modo da andare a determinare l'evaporazione dei solventi acquosi presenti all'interno del campione stesso¹¹⁰. I campioni di controllo qualità (QC) sono stati preparati raggruppando i surnatanti ottenuti da tutti i campioni in analisi.

Prima di inserirli all'interno della macchina, in ciascun campione sono stati aggiunti 5 uL di MSK-QC-KIT. Si tratta di un kit di controllo qualità sviluppato da Cambridge Isotope Laboratories Inc. (Tewksbury, MA, USA) e utilizzato per valutare le prestazioni di metodi analitici basati sulla spettrometria di massa, sia in approcci metabolomici mirati (*targeted*) che non (*untargeted*). Il kit è composto da due fiale liofilizzate contenenti miscele di metaboliti marcati con ¹³C, tra cui amminoacidi (L-alanina, L-leucina, L-fenilalanina, L-triptofano, L-tirosina), zuccheri (D-glucosio, acido succinico, acido

citrico, D-saccarosio) e altri composti (caffaina, benzoato di sodio, propionato di sodio, stearato di sodio).

Per poterlo utilizzare, ciascuna fiala va sciolta in 1 mL di solvente (es. metanolo al 50%) in modo da ottenere la miscela. L'aggiunta di questo kit permette di valutare parametri come tempo di ritenzione, forma dei picchi e intensità del segnale per assicurare la qualità dei dati.

A questo punto, si è passati alla fase di analisi vera e propria. I campioni sono stati analizzati utilizzando un sistema UHPLC Vanquish Horizon accoppiato ad uno spettrometro di massa (MS) Fusion Tribrid Orbitrap ¹¹¹.

I metaboliti estratti sono stati iniettati direttamente dalla macchina all'interno delle colonne HILIC (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography), che, a differenza delle colonne C18, sono specifiche per i metaboliti più polari, come zuccheri, aminoacidi e basi azotate puriniche e pirimidiniche (Figura 5).

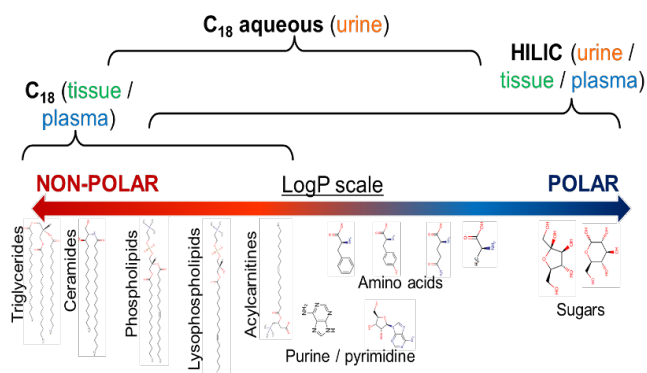


Figura 5: Colonne UHPLC, C18 e HILIC

Lo schema riporta i metaboliti che possono essere rilevati attraverso l'utilizzo delle due tipologie di colonne cromatografiche: C18 per i metaboliti non polari e HILIC per i metaboliti più polari. Tra i non polari troviamo la famiglia dei lipidi, mentre tra i polari rientrano zuccheri, aminoacidi e basi azotate (purine e pirimidine)

I metaboliti polari sono stati separati su una colonna ACQUITY UPLC BEH Amide (50 mm × 2,1 mm di diametro interno; dimensione delle particelle di 1,7 µm) accoppiata ad una pre-colonna VanGuard ACQUITY UPLC BEH Amide (5 mm × 2,1 mm di diametro interno; 1,7 µm) (Waters, Milford, MA, USA). La colonna è stata mantenuta ad una temperatura di 45 °C con un flusso di 0,4 mL/min.

La fase mobile utilizzata comprende due solventi diversi. Il solvente (A) è il più polare, composto da 500 mL di acqua, 10 mM (500 uL) di formiato di ammonio e 0,125% (625 uL) di acido formico. Il solvente (B), invece, è il più apolare e presenta una base di acetonitrile e acqua in rapporto 95:5 (475 mL di acetonitrile e 25 mL di acqua) e gli stessi modificatori della fase mobile, quindi formiato di ammonio e acido formico negli stessi dosaggi (rispettivamente 500 uL e 625 uL).

La separazione è stata condotta secondo il seguente gradiente.

- 0 min: 100% B
- 0–1 min: 100% B
- 1–3,9 min: da 100% a 70% B
- 3,9–5,1 min: da 70% a 30% B
- 5,1–6,4 min: da 30% a 100% B
- 6,4–7,5 min: 100% B

A queste tempistiche aggiungiamo 1 minuto per i passaggi pre-iniezione.

È stato utilizzato un volume di iniezione di 1 µL. La temperatura del campione è stata mantenuta a 4 °C.

Dopo la cromatografia, i campioni sono passati direttamente allo spettrometro di massa.

I parametri della sorgente ESI e dello spettrometro di massa (MS) erano i seguenti:

- Pressione del gas di nebulizzazione (sheath gas) 50 unità arbitrarie;
- Flusso del gas ausiliario (aux gas) 13 unità arbitrarie;
- Flusso del gas di sweeping 3 unità arbitrarie;
- Temperatura del capillare 260 °C;
- Temperatura del riscaldatore del gas ausiliario 425 °C.

I dati di spettrometria di massa sono stati raccolti in modalità Full Scan (MS) sia in ionizzazione positiva che negativa, utilizzando una risoluzione di 70.000, un target AgC 1e6 (pari a 1×10^6) e un tempo massimo di iniezione di 100 ms.

Per ciascuna polarità, positiva e negativa, abbiamo poi alternato scansioni MS e MS/MS (Spettrometria Tandem) in modalità di acquisizione dati-dipendente.

Per ogni scansione MS sono stati attivati un massimo di cinque esperimenti MS/MS. La soglia di intensità è stata impostata a 1,6e5 ($1,6 \times 10^5$), utilizzando una finestra di

isolamento di 1,4 Da. I valori m/z dei segnali già selezionati per MS/MS sono stati inseriti in una lista di esclusione per 20 secondi, per evitare ripetizioni.

Per le scansioni MS e MS/MS sono stati utilizzati rispettivamente: una risoluzione di 70.000 e 17.500, un'ampiezza corrente di $1e6$ (1×10^6) e $1e5$ (1×10^5) AgC e un tempo massimo di iniezione di 100 ms e 50 ms. Se in un evento di scansione non sono stati identificate altre voci della lista di inclusione, sono state selezionate altre masse. È stata utilizzata un'energia di collisione normalizzata a gradini di 30, 40 e 50.

4.4 Elaborazione dei dati

I dati sono stati elaborati utilizzando il software MS-DIAL ver.4.8 ¹¹² per la deconvoluzione, il rilevamento dei picchi, l'allineamento e l'identificazione dei composti. Le tabelle contenenti le aree dei picchi, ottenute da MS-DIAL combinando le due diverse polarità della MS, sono state poi esportate in un file .txt per ulteriori elaborazioni.

Per l'analisi statistica, i dati ottenuti sono stati importati in Perseus ¹¹³. All'interno di questo software è stato calcolato il coefficiente di variazione (CV) sui campioni controllo qualità (QC), andando ad escludere le variazioni di $CV > 0,4$. Prima dell'analisi, i dati sono stati trasformati in scala logaritmica (\log_2) e i campioni QC è stato rimosso.

Al fine di garantire la qualità dei dati, ogni caratteristica è stata filtrata per riga, richiedendo un valore valido di almeno il 70% per ogni gruppo. I dati mancanti sono stati sostituiti utilizzando metodi appropriati e, per normalizzare i valori di intensità, è stata usata la tecnica di sottrazione della mediana.

Inoltre, per l'individuazione dei composti in silicio, a partire dalle caratteristiche ioniche con gli eventi MS/MS associati, è stato utilizzato MS-FINDER ver.3.26 ¹¹⁴. La matrice di annotazioni di MS-FINDER è stata integrata con la matrice quantitativa utilizzando l'opzione "matching row by name" di Perseus e l'ID di allineamento è stato utilizzato come classificatore unico. È stata considerata solo l'annotazione dei composti con punteggio MS-FINDER Structure Rank > 5 .

4.5 Analisi statistica

Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il software gratuito Perseus¹¹³. L'analisi delle componenti principali (PCA) ha permesso di visualizzare similitudini e differenze tra i tre gruppi di campioni analizzati (Figura 9).

I metaboliti che mostravano una differenza significativa tra i gruppi analizzati sono stati selezionati usando il test statistico T di Student, considerando un *false discovery rate* (FDR) $\leq 0,05$ e utilizzando un parametro $S0 = 0,1$ per bilanciare contemporaneamente significatività statistica e rilevanza biologica. Tutto questo è stato poi graficato mediante Volcano Plot, dove i pallini neri rappresentano i metaboliti significativi che hanno un fold change ed una significatività elevata ($S0 > 0.1$, asse x e p-value < 0.05 , asse y). Il valore del p-value è stato espresso come logaritmo negativo in base 10 ($-\text{Log}_{10}$ p-value).

I metaboliti statisticamente modulati sono stati clusterizzati in modo non supervisionato e graficati mediante *heatmap*, una rappresentazione grafica a colori molto utilizzata in metabolomica, in cui si usano i colori rosso e blu per indicare rispettivamente un'espressione metabolica alta o bassa di uno specifico metabolita (Figura 10). Questa prima analisi può già permettere un iniziale confronto dei risultati tra le tre popolazioni in esame.

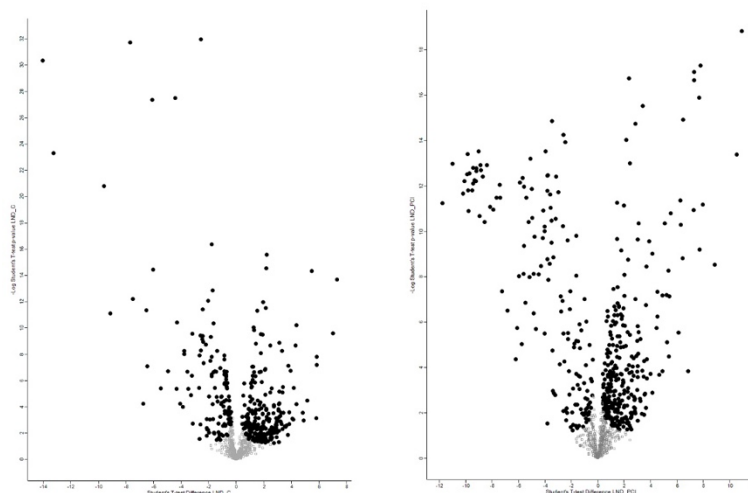


Figura 6: *Volcano plot*

Il volcano plot è una rappresentazione grafica dei metaboliti significativi emersi dallo studio metabolomico. Il grafico a sinistra rappresenta il volcano plot del confronto tra LND e CTRL, quello a destra, invece, tra LND e PCI. I pallini neri rappresentano i singoli metaboliti. Maggiore è il log del p-value, maggiore sarà la significatività statistica del metabolita.

RISULTATI

5.1 Descrizione delle popolazioni

Nello studio in oggetto sono stati arruolati 24 pazienti affetti dalla forma classica della malattia di Lesch-Nyhan (LND), caratterizzata da un deficit severo dell'attività enzimatica dell'enzima ipoxantina-guanina fosforibosiltransferasi (HPRT). Trattandosi di una patologia genetica con trasmissione legata al cromosoma X, tutti i pazienti considerati sono di sesso maschile. Le fasce di età coperte da questi pazienti sono molto eterogenee, da bambini sotto al primo anno di vita, fino a pazienti adulti, con età superiore a trent'anni. Nello specifico abbiamo arruolato (Figura 7): cinque pazienti con età inferiore ai 2 anni (20,8%), sei pazienti nella fascia 2-4 anni (25%), un paziente di età compresa tra 7-10 anni (4,3%), cinque pazienti nella fascia 11-20 anni (20,8%), tre pazienti tra 21-30 anni (12,5%) e, infine, quattro pazienti di età superiore ai 30 anni (16,7%).

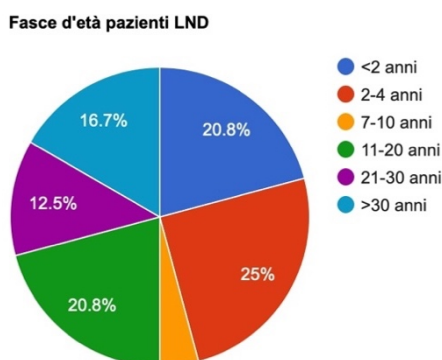


Figura 7: *Pie chart delle fasce d'età dei pazienti LND*

Nella figura è mostrata la pie chart riferita alle fasce d'età coperte dai 24 pazienti LND arruolati nello studio. Sono riportate le percentuali per ciascuna fascia, le più rappresentate risultano quella 2-4 anni (6 pazienti, 25%) e <2 anni e 11-20 anni (ciascuna 5 pazienti, 20,8%).

Per permettere una corretta interpretazione dei dati metabolomici ottenuti, sono stati valutati i parametri clinici e laboratoristici dei pazienti arruolati, per verificare che fossero stabili, compatibilmente con la patologia di base (Tabella 1).

In particolare, i livelli di acido urico nei pazienti al momento del prelievo rientrano in linea di massima nei limiti dei range di normalità (fino a 5.5 mg/dl nei bambini e fino a 7 mg/dl negli uomini adulti). Solamente in 4 pazienti su 24 si riscontra un valore >8 mg/dl (23, 31, 32, 36), verosimilmente perché il prelievo è stato fatto a scopo diagnostico nei primi mesi di vita, quindi prima di iniziare la terapia ipouricemizzante con allopurinolo.

Oltre a questo, sono stati valutati gli aspetti clinici dei pazienti (Tabella 1).

In primis, le manifestazioni neurologiche, quali distonia, discinesie, epilessia e spasticità. Tra queste, la distonia si è rivelata essere il sintomo prevalente, interessando 19 pazienti su 24 (circa 79% del totale). L'epilessia, invece, risulta essere meno comune, presentandosi in soli 3 pazienti su 24 (circa 12,5% del totale).

I disturbi del sonno sono abbastanza comuni, riscontrati in un terzo dei pazienti in analisi (8 su 24, circa 33%).

Le manifestazioni comportamentali caratteristiche della malattia di Lesch-Nyhan nella sua forma classica sono state riportate dalla totalità dei pazienti arruolati nelle fasce d'età 7-10 anni, 11-20 anni, 21-30 anni e >30 anni. Al contrario, tutti i bimbi di età <2 anni non presentano queste manifestazioni e nella fascia 2-4 anni, su 6 bambini 2 non hanno sviluppato comportamenti autolesionistici, 4, invece, sì. Questo è dovuto al fatto che solitamente le alterazioni del comportamento compaiono più tardi rispetto ai sintomi neurologici motori e ai sintomi renali da iperuricemia, di solito dopo i 2 anni di età o ancora più tardi, quando lo sviluppo della dentizione risulta completo ⁵.

Anche l'interessamento renale, altro aspetto tipico della Lesch-Nyhan, risulta essere molto frequente, interessando più della metà dei pazienti della popolazione (16 su 24, circa 66,7%). Infine, tra le altre manifestazioni della patologia abbiamo considerato l'anemia megaloblastica, in quanto spesso correlata alla Lesch-Nyhan ¹¹⁵. Tra i nostri pazienti, solamente 3 su 24 (12,5%) presentavano questa condizione al momento del prelievo del campione.

Paziente	Sesso	Età	Genetica	Acido urico	Distonia	Discinesie	Epilessia	Spasticità	Dist. sonno	Alt.comportamento	Int renale	Anemia
LND-1	M	2	c.200_201delTG ex3	5,3 mg/dl	+	+	-	-	+	+	-	-
LND-2	M	17	c.463C>T	2,3 mg/dl	+	-	-	-	+	+	+	+
LND-3	M	30	ex2-9del	3,0 mg/dl	+	-	+	+	+	+	+	+
LND-5	M	7	c.135-2A>C	5 mg/dl	+	-	-	-	-	+	+	-
LND-6	M	3	non nota	4,5 mg/dl	+	-	-	-	-	+	+	-
LND-7	M	2	c.485G>A	3,6 mg/dl	+	+	-	-	-	+	+	-
LND-8	M	15	c.486-1G>C	7,6 mg/dl	+	-	-	+	+	+	+	-
LND-9	M	1	c.113C>T	3,7 mg/dl	+	-	-	-	-	-	-	-
LND-10	M	17	ex2del	2,8 mg/dl	+	+	+	+	+	+	+	-
LND-11	M	2	c.208G>T	5 mg/dl	+	-	-	+	+	-	+	+
LND-13	M	16	c.607C>T	5,3 mg/dl	+	-	-	+	-	+	+	-
LND-17	M	4	c.418G>C	4,8 mg/dl	+	-	-	+	-	-	+	-
LND-21	M	22	ex4del	6 mg/dl	+	-	-	-	-	+	-	-
LND-23	M	10 mesi	c.212_213insG	8,5 mg/dl	+	-	-	+	-	-	-	-
LND-24	M	32	ex9del	3,7 mg/dl	+	-	-	-	-	+	+	-
LND-25	M	17	IVS2+1G>C	5,3 mg/dl	+	-	-	-	-	+	-	-
LND-26	M	30	c.329_332delinsTCT	3,8 mg/dl	-	-	-	-	-	+	-	-
LND-27	M	40	ex1,9del	4,2 mg/dl	-	-	-	-	-	-	-	-
LND-30	M	37	ex1-3del	3,6 mg/dl	+	+	-	+	+	+	+	-
LND-31	M	10 gg	ex2del	9,3 mg/dl	-	-	-	-	-	-	+	-
LND-32	M	4 mesi	c.89_96dup8	9 mg/dl	+	-	-	-	-	-	+	-
LND-36	M	16 mesi	c.233T>C ex3	10,5 mg/dl	+	-	+	+	-	-	+	-
LND-37	M	2	c.65T>G exon2	5,2 mg/dl	+	+	-	-	-	+	-	-
LND-38	M	42	IVS2+1G>C	4 mg/dl	-	-	-	+	+	+	+	-

Tabella 1: Caratteristiche clinico-laboratoristiche dei pazienti LND arruolati

Il “+” indica la presenza del sintomo, mentre il “-“ la sua assenza.

Un ulteriore aspetto rilevante, oltre alla valutazione clinica, è stato considerare le terapie in corso nei pazienti al momento del prelievo, con l’obiettivo di correlare tali trattamenti con i risultati ottenuti dalle analisi metabolomiche. Abbiamo considerato le classi di farmaci maggiormente utilizzate per il trattamento della patologia nei suoi vari aspetti: ipouricemizzanti (allopurinolo), ansiolitici e antiepilettici (in particolare le benzodiazepine, carbamazepina, acido valproico), anticolinergici (triesifenidile), neurolettici (risperidone, aloperidolo, quetapina), miorilassanti (baclofene) e farmaci ad azione dopaminergica (L-dopa, SAM). Nella categoria ‘altri farmaci’ consideriamo, ad esempio, PPI, acido folico, lattulosio, vitamina D, melatonina.

Come mostrato in Tabella 2, quasi la totalità dei pazienti arruolati è in terapia con ipouricemizzanti, allopurinolo, ad eccezione di due pazienti molto piccoli, il cui prelievo è stato fatto a 4 mesi uno e 16 mesi l’altro, ai fini diagnostici, quindi prima di iniziare qualunque tipo di terapia.

Per quanto riguarda gli altri farmaci, gli anticolinergici, i neurolettici, i miorilassanti e i farmaci ad azione dopaminergica non sono ampiamente utilizzati nella popolazione in esame (solo 3-4 pazienti su 24).

Gli ansiolitici/antiepilettici, invece, sono farmaci di più comune utilizzo, 9 pazienti su 24, pari al 37,5% del totale.

Paziente	Età	Ipouricizzanti	Ansiolitici/Antiepilettici	Anticolinergici	Neurolettici	Miorilassanti	Azione dopaminergica	Altri farmaci
LND-1	2	+	+	+	+	-	-	+
LND-2	17	+	+	-	+	-	-	+
LND-3	30	+	+	-	-	+	+	+
LND-5	7	+	+	+	-	-	-	+
LND-6	3	+	+	-	-	-	+	-
LND-7	2	+	-	-	-	-	-	-
LND-8	15	+	+	-	+	+	-	+
LND-9	1	+	-	-	-	-	-	+
LND-10	17	+	+	+	-	-	-	+
LND-11	2	+	-	-	-	-	-	+
LND-13	16	+	-	-	-	-	+	+
LND-17	4	+	-	-	-	-	-	-
LND-21	22	+	-	-	-	-	-	-
LND-23	10 mesi	+	-	-	-	-	-	-
LND-24	32	-	-	-	-	-	-	-
LND-25	17	-	-	-	-	-	-	-
LND-26	30	-	-	-	-	-	-	-
LND-27	40	-	-	-	-	-	-	-
LND-30	37	+	+	-	-	-	+	-
LND-31	10 gg	+	-	-	-	-	-	-
LND-32	4 mesi	-	-	-	-	-	-	-
LND-36	16 mesi	-	-	-	-	-	-	-
LND-37	2	+	-	-	-	-	-	-
LND-38	42	+	+	+	+	+	-	+

Tabella 2: *Terapie farmacologiche in atto al momento del prelievo nei pazienti LND arruolati.*

I simboli "+" e il "-" indicano rispettivamente l'assunzione o la non assunzione di un farmaco appartenente alla categoria indicata.

Per la seconda popolazione in esame, la popolazione di pazienti affetti da Paralisi cerebrale Infantile (PCI), sono stati analizzati un totale di 28 campioni, con quadri clinici di gravità differente: 19 tetraparesi, 4 emiparesi, 4 diplegie e 1 encefalopatia in corso di definizione. Purtroppo, non è stato possibile raccogliere tutti campioni da pazienti di sesso maschile, per ridurre i bias nel confronto con i LND. In ogni caso, i campioni di pazienti di sesso maschile sono 18, contro 10 pazienti di sesso femminile (Tabella 3).

Per quanto riguarda le fasce d'età, sono presenti le fasce centrali, mentre mancano quelle estreme, <2 anni, 21-30 e >30 anni (Figura 8). Le fasce più rappresentate sono quella compresa tra 7-10 anni (dieci pazienti, pari al 35,7% del totale) e quella tra 11-20 anni (nove pazienti, 32,15 del totale). I restanti nove pazienti rientrano nelle fasce 2-4 e 4-7 anni (rispettivamente quattro e cinque)

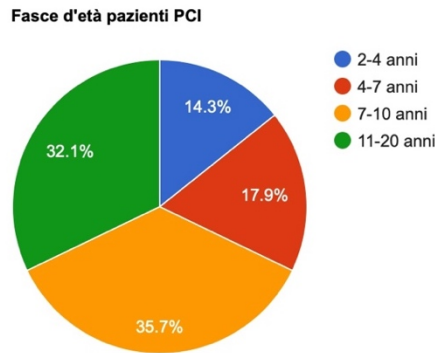


Figura 8: Pie chart delle fasce d'età dei pazienti PCI

Nella figura è mostrata la pie chart riferita alle fasce d'età coperte dai 28 pazienti PCI arruolati nello studio. Sono riportate le percentuali per ciascuna fascia, le più rappresentate risultano quella 7-10 anni (10 pazienti, 35,7%) e 11-20 anni (9 pazienti, 32,1%). Mancano le fasce più estreme, <2 anni e le fasce di età adulta.

Come mostrato in Tabella 3, abbiamo poi valutato alcuni aspetti clinici di questi pazienti, con particolare attenzione alle manifestazioni neurologiche che si sovrappongono in parte a quelle dei pazienti LND, in modo tale da ottenere un confronto con essi.

Paziente	Sesso	Età	Patologia di base	Epilessia	Distonia	Discinesie	Deambulazione	Dist. sonno	Alt. Comportamento
PCI-39	M	12	PCI emi dx	+	-	-	+	-	-
PCI-40	M	6	PCI emi sx	+	+	-	+	-	-
PCI-41	M	5	PCI tetra	+	-	-	-	-	-
PCI-42	M	3	PCI tetra	+	+	-	-	-	-
PCI-43	M	13	PCI tetra	+	-	-	+	-	-
PCI-44	M	13	PCI tetra	+	+	-	-	+	+
PCI-45	M	14	PCI tetra	+	+	-	-	-	+
PCI-46	M	6	PCI tetra	+	+	-	-	+	-
PCI-47	M	7	PCI tetra	+	-	-	-	+	-
PCI-48	M	4	PCI tetra	-	+	-	-	+	-
PCI-49	M	6	PCI tetra	-	-	+	-	-	-
PCI-50	M	7	in corso di definizione	+	-	-	-	+	-
PCI-51	M	10	PCI tetra	+	+	-	-	-	-
PCI-52	M	17	PCI tetra	+	+	-	-	-	-
PCI-53	M	10	PCI tetra	+	-	-	-	-	-
PCI-54	M	8	PCI diplo	+	-	-	+	+	+
PCI-55	M	12	PCI diplo	+	-	-	+	+	+
PCI-56	M	4	PCI tetra	+	-	-	+	-	-
PCI-57	F	14	PCI emi sx	-	-	-	+	-	-
PCI-58	F	10	PCI emi sin	+	-	-	+	-	-
PCI-59	F	9	PCI tetra	+	-	-	+	-	-
PCI-60	F	6	PCI tetra	+	+	-	-	-	-
PCI-61	F	16	PCI diplo	+	-	-	+	-	-
PCI-62	F	2	PCI tetra	+	-	-	-	-	-
PCI-63	F	9	PCI tetra	+	-	-	-	+	+
PCI-64	F	10	PCI tetra	-	+	+	-	+	-
PCI-65	F	8	PCI tetra	+	+	-	-	+	-
PCI-66	F	16	PCI diplo	+	-	-	+	+	+

Tabella 3: Caratteristiche cliniche dei pazienti PCI arruolati

Il “+” indica la presenza del sintomo, mentre il “-” la sua assenza.

Analogamente a quanto fatto per i pazienti LND, è stata fatta una valutazione della terapia farmacologica in atto al momento del prelievo, considerando le stesse categorie di farmaci, con l'esclusione degli ipouricemizzanti (Tabella 4).

Paziente	Ansiolitici/Antiepilettici	Anticolinergici	Neurolettici	Miorilassanti	Azione dopaminergica	Altri farmaci
PCI-39	+	-	-	-	-	-
PCI-40	+	-	-	-	-	-
PCI-41	+	-	-	-	-	-
PCI-42	+	-	-	+	-	+
PCI-43	+	-	-	-	-	+
PCI-44	+	-	-	+	-	+
PCI-45	+	+	-	-	+	-
PCI-46	+	-	-	-	-	+
PCI-47	+	-	-	-	-	+
PCI-48	+	+	-	-	-	+
PCI-49	-	-	-	-	-	+
PCI-50	+	-	-	-	-	-
PCI-51	+	-	-	-	-	+
PCI-52	+	+	-	-	-	+
PCI-53	+	-	-	+	-	+
PCI-54	+	-	-	-	-	-
PCI-55	+	-	-	-	-	+
PCI-56	+	-	-	-	-	-
PCI-57	-	-	-	-	-	-
PCI-58	+	-	-	-	-	+
PCI-59	+	-	-	-	-	-
PCI-60	+	-	-	-	-	+
PCI-61	+	-	-	+	-	-
PCI-62	+	-	-	-	-	-
PCI-63	+	-	-	-	-	+
PCI-64	+	-	-	+	-	+
PCI-65	+	-	+	+	-	+
PCI-66	+	-	-	-	-	+

Tabella 4: *Terapie farmacologiche in atto al momento del prelievo nei pazienti PCI arruolati*

I simboli "+" e il "-" indicano rispettivamente l'assunzione o la non assunzione di un farmaco appartenente alla categoria indicata.

In Figura 9 è riportato un confronto dei trattamenti farmacologici in atto al momento del prelievo del campione tra pazienti LND e PCI.

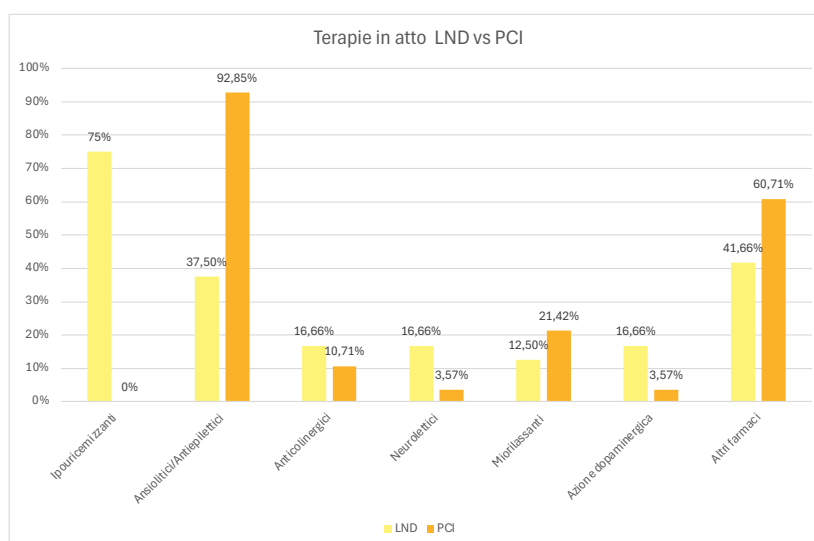


Figura 9: *Confronto delle terapie in atto tra LND e PCI*

In giallo sono rappresentate le percentuali relative ai pazienti LND, in arancio quelle dei PCI.

Infine, la terza popolazione inclusa nello studio è quella dei controlli sani (CTRL), rappresentata da un totale di 36 campioni provenienti da individui con esami nei limiti della norma e privi di comorbidità rilevanti ai fini delle analisi. Sono stati selezionati esclusivamente campioni di soggetti di sesso maschile, con un'adeguata distribuzione per fasce d'età, sovrapponibile rispetto a quella delle coorti LND e PCI (Figura 10). In questo modo è garantita una copertura omogenea, permettendo di ridurre i bias nei risultati.

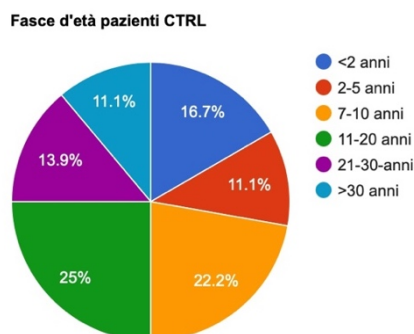


Figura 10: *Pie chart delle fasce d'età dei pazienti CTRL*

Nella figura è mostrata la pie chart riferita alle fasce d'età coperte dai 36 controlli sani arruolati nello studio. Sono riportate le percentuali per ciascuna fascia, tutte equamente rappresentate.

Paziente	Sesso	Età	Comorbidità	Terapie in atto
CTRL-67	M	19	+	+
CTRL-68	M	3	-	-
CTRL-69	M	11 mesi	-	-
CTRL-70	M	8	-	-
CTRL-71	M	7	-	-
CTRL-72	M	1	-	-
CTRL-73	M	9	-	-
CTRL-74	M	11	-	-
CTRL-75	M	13	-	-
CTRL-76	M	15	+	+
CTRL-77	M	11	-	-
CTRL-78	M	10	-	-
CTRL-79	M	13	-	-
CTRL-80	M	10	-	-
CTRL-81	M	38	-	-
CTRL-82	M	7	-	-
CTRL-83	M	8	+	+
CTRL-84	M	39	+	-
CTRL-85	M	37	-	-
CTRL-86	M	12	+	-
CTRL-87	M	10	-	-
CTRL-88	M	3 mesi	+	+
CTRL-89	M	27	-	-
CTRL-90	M	29	-	+
CTRL-91	M	28	-	-
CTRL-92	M	22	-	-
CTRL-93	M	50	-	-
CTRL-94	M	2 mesi	+	-
CTRL-95	M	1	-	-
CTRL-96	M	28	-	-
CTRL-97	M	2	-	-
CTRL-98	M	11	+	-
CTRL-99	M	5	+	-
CTRL-100	M	3	-	-
CTRL-101	M	7 mesi	-	-
CTRL-102	M	17	-	-

In Tabella 5 sono riportate le caratteristiche dei singoli CTRL, con anche eventuali terapie o comorbidità in atto al momento del prelievo, comunque non considerate rilevanti a priori per i risultati dello studio.

Tabella 5: *Caratteristiche dei pazienti arruolati come controlli sani (CTRL)*

I simboli "+" e "-" indicano rispettivamente la presenza o l'assenza delle voci citate, comorbidità e terapie in atto.

Per ciascun campione è stata effettuata una analisi mediante UHPLC/MS con colonne C18 e HILIC, rispettivamente per metaboliti non polari e polari, ionizzate con carica positiva e negativa. Per il seguente studio verranno trattati a scopo preliminare soltanto i metaboliti ottenuti mediante la colonna HILIC, quindi i più polari.

Complessivamente, l'analisi metabolomica *untargeted* del plasma delle tre popolazioni in esame (LND, PCI e CTRL) ha consentito di identificare un totale di 802 metaboliti, dei quali 400 risultano essere statisticamente significativi. Di questi 400, 216 mostrano una significatività nel confronto tra LND e CTRL, che è quella più rilevante dal nostro punto di vista.

Esclusi da questi 216 metaboliti dai 400 significativi, abbiamo estrapolato anche quelli che risultano significativamente modulati nel confronto tra LND e PCI, in totale 122. I 184 metaboliti rimanenti non sono stati presi in considerazione, in quanto significativi unicamente per un confronto tra PCI e CTRL, che non rientra negli obiettivi dello studio.

L'analisi delle componenti principali (PCA), riportata in Figura 11, ha evidenziato una buona segregazione tra le tre popolazioni, suggerendo la bontà delle analisi condotte.

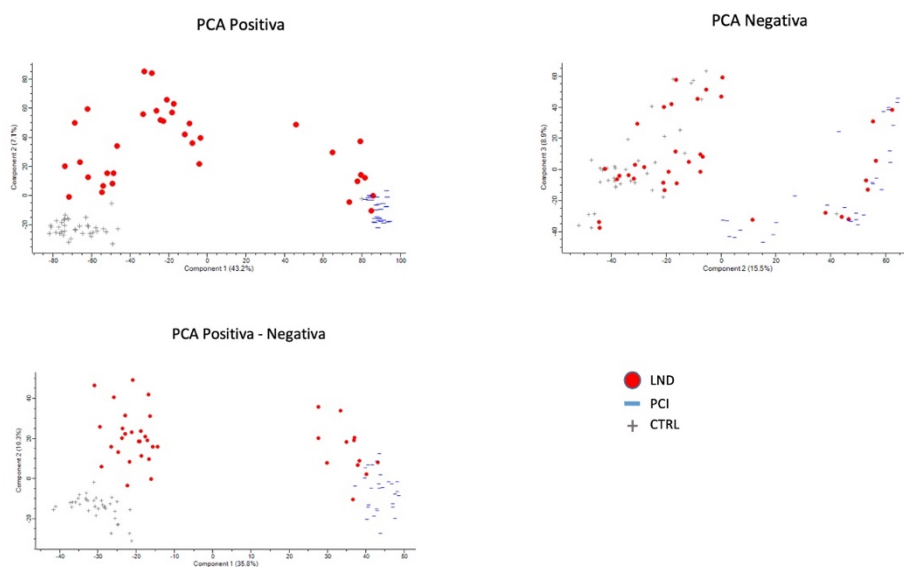


Figura 11: PCA, *Principal Component Analysis*

Nella figura sono raffigurati i grafici relativi alle PCA dei campioni analizzati, rispettivamente con ionizzazione positiva, negativa e un confronto positiva-negativa. I pallini rossi stanno ad indicare i campioni dei pazienti Lesch-Nyhan (LND), le linee blu sono i campioni dei pazienti con Paralisi Cerebrale Infantile (PCI), mentre i simboli + stanno per i controlli sani (CTRL).

Una rappresentazione visiva più semplice e immediata delle somiglianze e differenze tra i profili metabolici delle tre popolazioni può essere ottenuta mediante sfruttando una *heatmap* gerarchico-clusterizzata non supervisionata, che vediamo rappresentata in Figura 12. I colori rosso e blu indicano rispettivamente un'espressione metabolica alta e bassa di uno specifico metabolita e le loro sfumature sono utilizzate per tutto ciò che sta nel mezzo. Le tre colonne sono indicative delle tre popolazioni analizzate, blu per i CTRL, fucsia per le PCI e rosa per i LND.

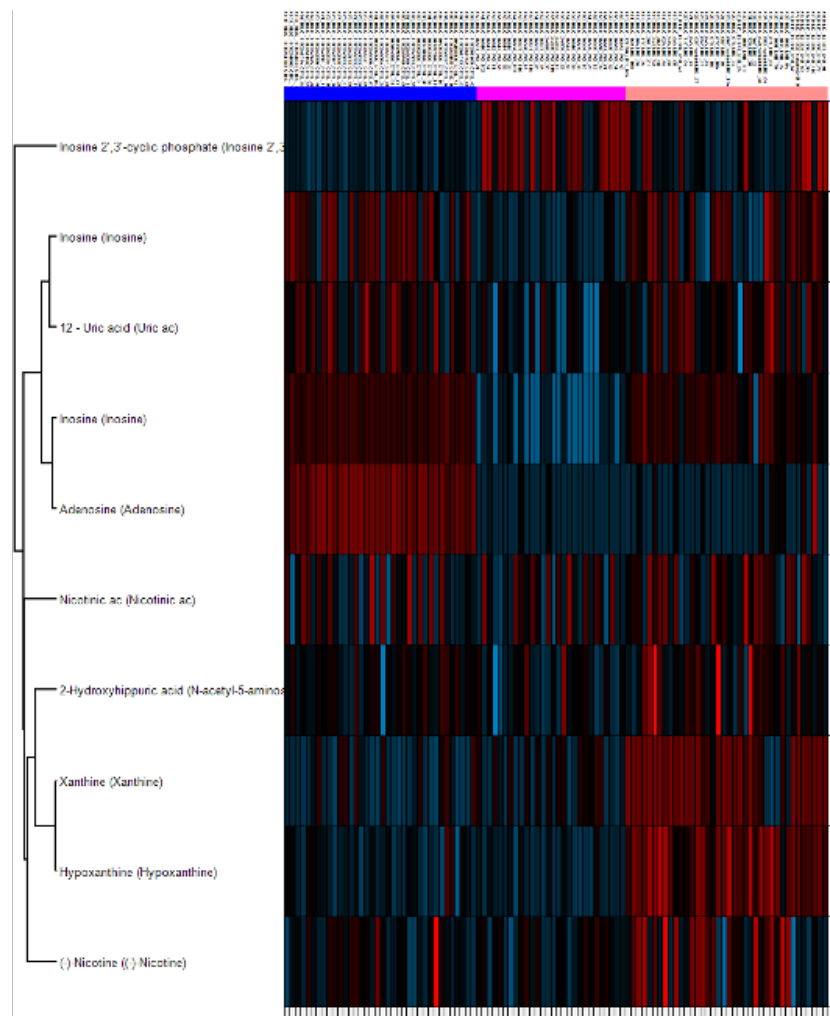


Figura 12: *Heatmap dei metaboliti significativi*

Nella figura è mostrata una *heatmap*, ovvero una rappresentazione grafica a colori spesso utilizzata nell'ambito della metabolomica per valutare le concentrazioni di metaboliti in determinati cluster di campioni. Il rosso indica una maggiore concentrazione, il blu, invece, minore concentrazione. La colonna blu è quella dei CTRL, quella centrale fucsia dei PCI e quella rosa a destra dei LND.

Per valutare quali fossero le vie metaboliche più coinvolte nelle alterazioni riscontrate, si è fatta una Enrichment Analysis. Il termine ‘enrichment’ in bioinformatica indica quanto un insieme predeterminato di metaboliti risulta sovra-rappresentato rispetto a quanto ci si aspetterebbe. L’enrichment ratio, infatti, è un valore che valuta l’arricchimento di un certo pathway metabolico rispetto all’intero dataset e si calcola come rapporto tra i risultati osservati (*observed hits*) e i risultati attesi (*expected hits*).

I grafici riportati in Figura 13 mostrano le vie metaboliche che sono risultate significativamente alterate tra LND e controlli sani. Un Enrichment Ratio >1 indica che il pathway considerato risulta sovrarappresentato rispetto a quanto ci si aspetterebbe. Il codice colore, invece, rappresenta il p value e le vie metaboliche più significativamente alterate sono quelle rosse scure, perché associate ad un p value inferiore.

Come riportato nel grafico, i metabolismi maggiormente coinvolti comprendono: il metabolismo purinico, il metabolismo dell’istidina e il metabolismo dei neurotrasmettitori (dopamina e serotonina),

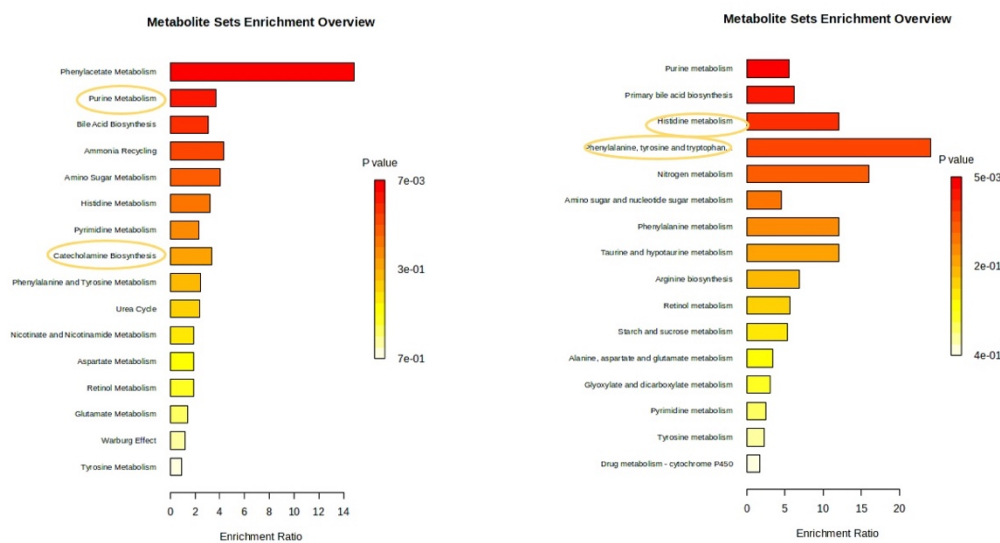


Figura 13: Grafico di arricchimento (enrichment)

I grafici in figura mostrano le vie metaboliche che risultano maggiormente alterate nei pazienti LND rispetto ai controlli sani (CTRL). I metabolismi più significativi che analizzeremo in seguito sono quelli cerchiati in giallo.

In Figura 14 è mostrato un altro grafico di Enrichment, che mostra l'arricchimento di metaboliti di determinate condizioni patologiche, rispetto ai dati attesi.

Notiamo che la Lesch-Nyhan si trova molto in alto tra le condizioni più significativamente arricchite e il rosso acceso della barra indica un p value basso e quindi un risultato altamente significativo. Anche l'Enrichment Ratio risulta essere molto elevato (circa 650), suggerendo un forte arricchimento di metaboliti associati a questa condizione rispetto a quanto atteso casualmente

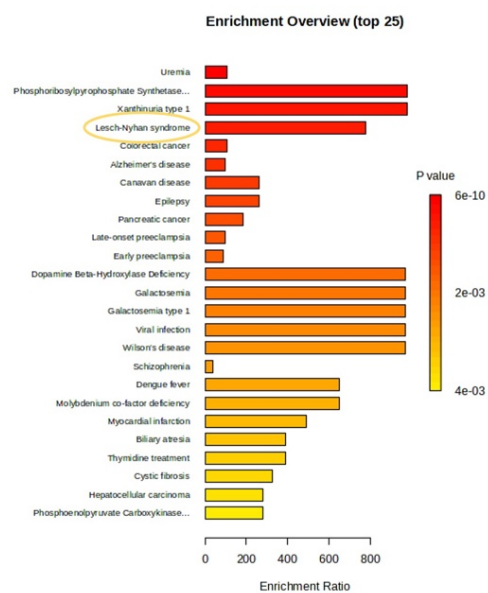


Figura 14: Grafico di arricchimento (enrichment)

Il grafico in figura mostra l'arricchimento di determinate condizioni sulla base dei metaboliti riscontrati dalle analisi. Quelle più rosse sono le condizioni che presentano un forte arricchimento di metaboliti in relazione ai risultati ottenuti.

In tabella 5 sono riportati, suddivisi per metabolismi, i principali metaboliti riscontrati come significativi nel confronto tra LND e controlli sani. Per ognuno è riportato il fold change, che indica la significatività biologica e il p value, espresso come logaritmo in base 2, che indica la significatività statistica.

Metabolita	Formula chimica	Polarizzazione	FOLD CHANGE	Log2(pValue)
METABOLISMO DELLE PURINE				
Ipoxantina	C5H4N4O	positiva	2,215707579	15,58775378
Xantina	C5H4N4O2	positiva	8,00320217	10,32393545
Adenosina	C10H13N5O4	positiva	-9,583770959	20,80567022
Inosina	C10H12N4O5	positiva	-1,620490523	2,019019457
IMP	C7H6O4	positiva	1,691179879	2,466550953
METABOLISMO DELL'ISTIDINA				
Istidina	C6H9N3O2	positiva	-0,64315291	1,831997427
1-MI4AA	C6 H8 N2 O2	positiva	1,768907375	8,100137369
METABOLISMO DELLA DOPAMINA				
Dopamina	C7 H7 N O3	positiva	1,44293578	1,942063477
Fenilalanina	-	positiva	1,201675551	6,065269525
METABOLISMO ENERGETICO				
Nicotinammide	C6 H6 N2 O	positiva	1,897224171	9,487813921
Triptofano	C11H12N2O2	positiva	-0,733884864	6,086392557
Chinurenina	C10H12N2O3	positiva	-0,578176827	3,369193567
METABOLISMO DEGLI AMMINOACIDI				
Arginina	C6H14N4O2	positiva	-3,86705827	3,997266894
Glutammina	C5H10N2O3	positiva	-0,698952166	1,888820416
Lisina	C10H13N5	positiva	1,91722067	3,469854376
Treonina	-	positiva	2,963952691	2,059761607
Isoleucina	C15H26O	positiva	1,100274412	5,8498285
Valina	C12H20O3	positiva	3,594731072	2,495301713
METABOLISMO DEI LIPIDI				
Glicerol trivalerato	-	positiva	4,302305839	8,68512694
Carnitina	C13H25NO4	positiva	0,526003071	2,341805759
Acido linoleico	C18H32O2	positiva	-2,466918679	9,347033516
Acido arachidonico	-	positiva	-0,54360964	4,776398035
Acido ricinoleico	C18H34O3	positiva	-2,451092321	9,170276444
LPC (16:0)	-	positiva	-0,783681678	2,563567913
LPC (18:0)	C26H54NO7P	positiva	-0,703178362	6,680391719
LPC (20:3)	C34H49NO4S	positiva	-0,62827966	3,510927289
PC(o-18:2(9Z,12Z)/18:2(9Z,12Z))	-	positiva	-0,862336357	6,319703963
PE(P-16:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))	-	positiva	-0,889899026	4,429724401

Tabella 5: Estratto di metaboliti significativamente alterati nei pazienti LND rispetto ai controlli sani

5.2 Metabolismo delle purine

Le analisi metabolomiche condotte hanno evidenziato alterazioni significative in numerosi metaboliti coinvolti nel metabolismo delle purine, con variazioni sia in aumento che in diminuzione nei campioni LND rispetto ai CTRL e ai PCI.

Ipoxantina e xantina risultano aumentate nei LND rispetto alle PCI e ai CTRL, che tra loro non presentano differenze significative (Figura 15).

Inosina e adenosina, invece, risultano ridotte nei LND rispetto ai CTRL, ma non rispetto ai PCI. Infatti, l'adenosina risulta equivalente in LND e PCI, mentre l'inosina aumentata nei LND rispetto ai PCI (Figura 15).

I grafici riportati nelle pagine seguenti (da Figura 15 a Figura 24) mostrano il confronto dei range di fold change dei vari metaboliti tra le tre popolazioni in esame. In giallo i pazienti LND, in arancione i PCI e in azzurro i CTRL.

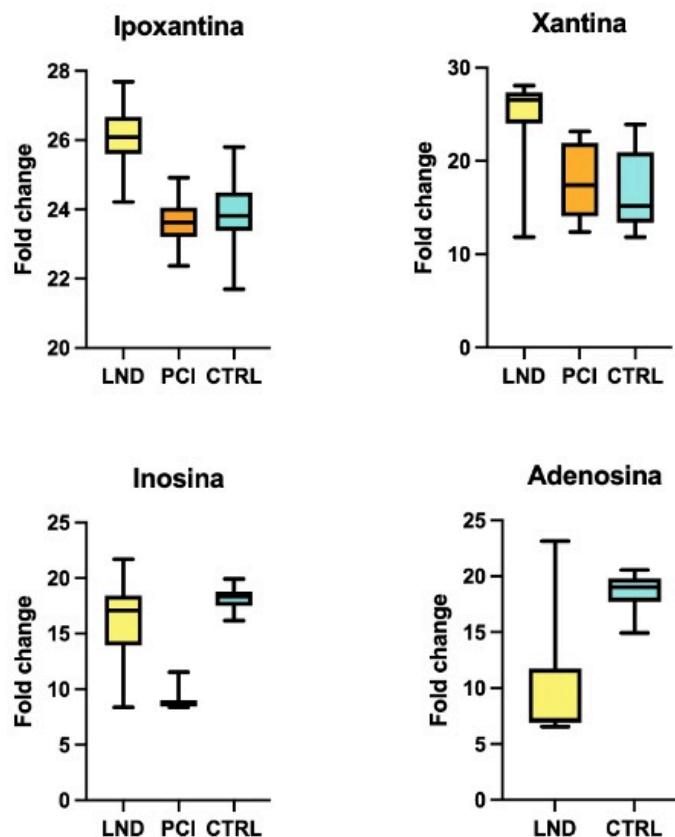


Figura 15: Rappresentazione grafica di alcuni metaboliti purinici

IMP, Inosina Monofosfato, importante precursore di AMP e GMP e a monte dell'inosina nella via del metabolismo purinico, è risultato essere aumentato nei campioni LND rispetto ai CTRL, ma non rispetto ai campioni PCI, che presentano una concentrazione maggiore di tale metabolita (Figura 16).

L'acido urico è stato trovato come significativamente aumentato nel confronto tra LND e PCI, ma non confrontato con i CTRL (Figura 16).

Situazione simile ma opposta per un altro metabolita, AIR, 5-amino-4-imidazole ribonucleotide, un intermedio della via di sintesi delle purine. AIR è risultato essere ridotto nei pazienti LND rispetto ai PCI, ma senza riscontro di alterazioni significative rispetto ai CTRL (Figura 16).

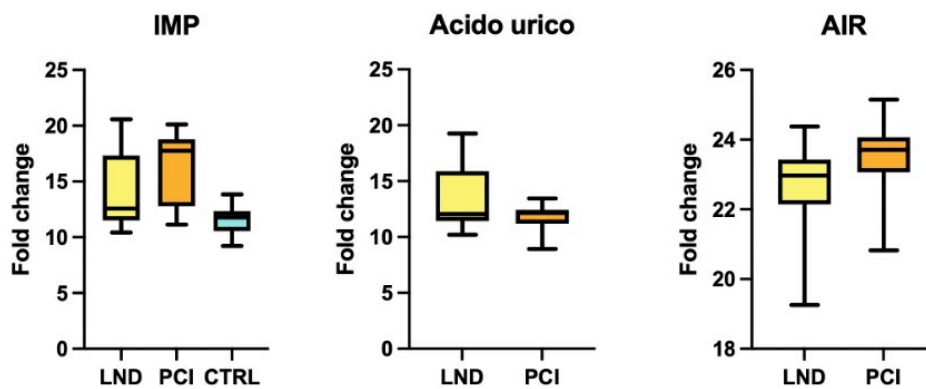


Figura 16: Rappresentazione grafica di alcuni metaboliti purinici

5.3 Metabolismo dell'istidina

Altra via metabolica all'interno della quale si sono riscontrate alterazioni dei metaboliti interessanti è quella dell'istidina. Si tratta di un aminoacido essenziale, quindi non prodotto endogenamente, ma introdotto nell'organismo esclusivamente tramite la dieta.

Le analisi metabolomiche condotte hanno portato alla valutazione di una riduzione dell'istidina nei pazienti LND rispetto ai CTRL, ma non rispetto ai PCI, nei quali risulta ancora più ridotta (Figura 17).

Altro metabolita facente parte di questa via metabolica che si è dimostrato alterato è l'N-metilimidazoloacetato (1-MI4AA), prodotto finale del processo di metilazione dell'istamina. Infatti, l'istidina può andare incontro due vie metaboliche diverse: la decarbossilazione a istamina (tramite HDC, istidina decarbossilasi), che poi sarà metilata o deaminata, oppure la via catabolica, con la produzione una serie di metaboliti intermedi che poi portano come prodotto finale al glutammato.

1-MI4AA risulta essere aumentato rispetto nei LND rispetto ai CTRL, che non mostrano differenze significative con i PCI (Figura 17).

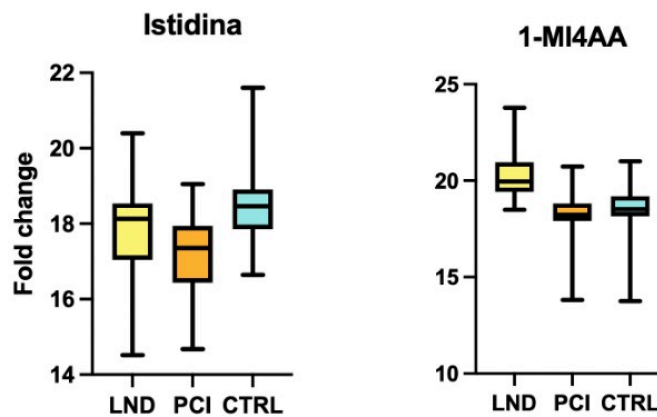


Figura 17: Rappresentazione grafica di due metaboliti del metabolismo dell'istidina

5.4 Metabolismo della dopamina

Nell'ambito del metabolismo della dopamina, abbiamo riscontrato un aumento della dopamina stessa, che risulta maggiore nei campioni LND rispetto ai CTRL, mentre non mostra alcuna rilevanza significativa nel confronto tra LND e PCI (Figura 18).

Oltre alla dopamina, anche la fenilalanina è risultata aumentata, sia rispetto ai CTRL, sia nel confronto con i PCI (Figura 18). La fenilalanina è un amminoacido essenziale, precursore della tirosina, da cui poi si forma L-DOPA (3,4-diidrossifenilalanina) e, infine, dopamina.

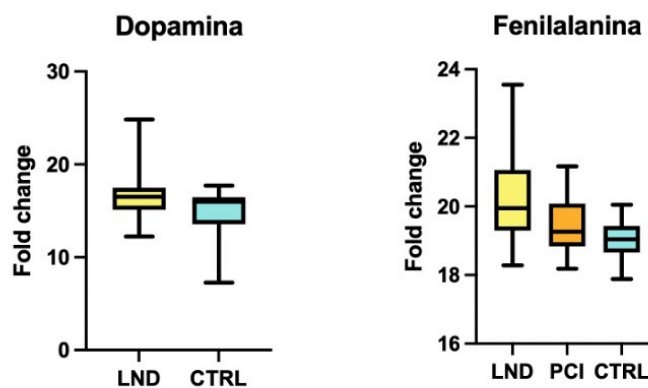


Figura 18: Rappresentazione grafica di due metaboliti del metabolismo della dopamina

5.5 Metabolismo energetico

Per metabolismo energetico intendiamo l'insieme delle vie biochimiche che le cellule sfruttano per produrre, immagazzinare e utilizzare energia. La principale fonte di energia delle nostre cellule è rappresentata dall'ATP (adenosina trifosfato).

Dalle nostre analisi non sono stati riscontrati metaboliti correlati all'ATP, ad eccezione dell'adenosina di cui abbiamo parlato nell'ambito del metabolismo purinico (Figura 15).

La via energetica che ci ha dato risultati significativi è stata quella del NAD(H). Infatti, sebbene non sia stato riscontrato il NAD(H) stesso tra gli 800 metaboliti rilevati, sono risultati significativamente modulanti nel confronto tra le tre coorti di pazienti alcuni suoi precursori.

In particolare, la nicotinamide, precursore di NAD nella via di salvataggio, il triptofano, un aminoacido essenziale e la chiurenina, intermedio del metabolismo del triptofano, che in parte costituisce la via di sintesi de novo del NAD.

La nicotinamide è risultata aumentata nei campioni LND rispetto a CTRL e a PCI (Figura 19). Triptofano e chinurenina, al contrario, appaiono ridotti nei LND rispetto ai CTRL, senza differenze significative con i PCI (Figura 19).

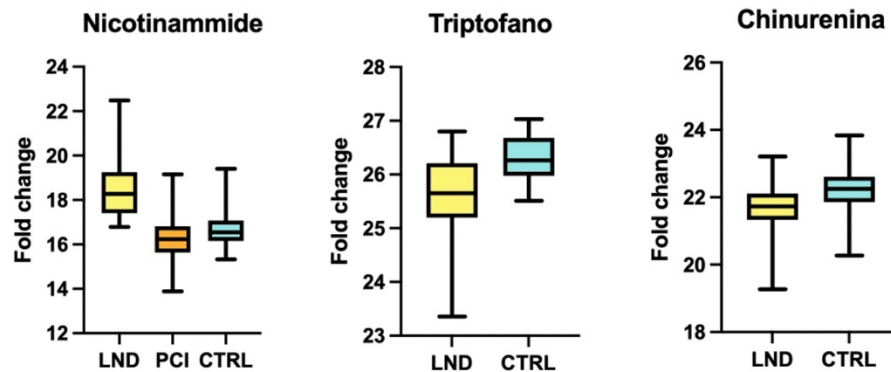


Figura 18: Rappresentazione grafica di alcuni metaboliti del metabolismo della dopamina

5.6 Metabolismo degli aminoacidi

Oltre agli aminoacidi di cui abbiamo già discusso nell'ambito di altri metabolismi (istidina, fenilalanina, triptofano), si sono riscontrate anche altre variazioni.

Tra gli aminoacidi non essenziali troviamo arginina e glutammina, che sono risultate essere ridotte nei LND rispetto ai CTRL, ma, nel caso dell'arginina, non rispetto ai PCI, nei quali l'arginina risulta più espressa (Figura 20).

Nel gruppo degli aminoacidi essenziali, invece, la lisina, espressa come glicil-lisina (Gly-Lys), è aumentata nei pazienti LND rispetto alle altre popolazione in esame. La treonina, riscontrata legata alla glicina come nel caso della lisina (Gly-Thr), si presenta aumentata nei LND rispetto ai CTRL, ma i valori nei pazienti PCI superano i LND. Queste variazioni sono mostrate nei grafici della Figura 20.

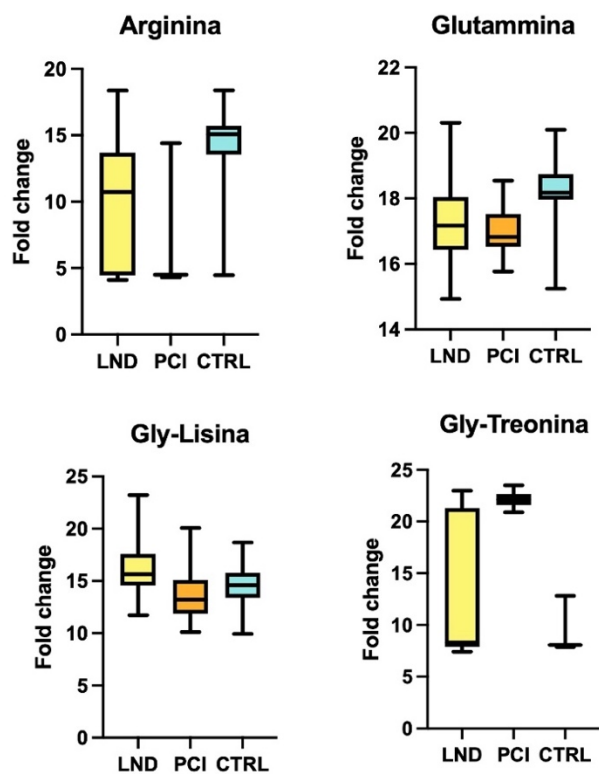


Figura 20: Rappresentazione grafica di alcuni aminoacidi

Interessanti sono anche i risultati relativi ai BCAA, Branched-Chain Amino Acids, ovvero aminoacidi a catena ramificata, che comprendono leucina, isoleucina e valina. Si è riscontrato un aumento di leucil-isoleucina e leucil-valina nei pazienti LND rispetto ai CTRL e ai PCI (Figura 21).

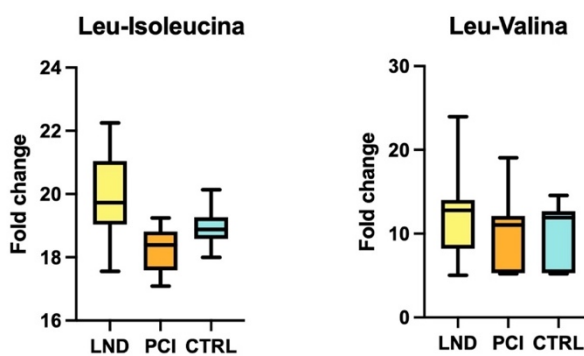


Figura 21: Rappresentazione grafica di alcuni BCAA

5.7 Metabolismo lipidico

Nell'ambito del metabolismo lipidico, sono emersi alcuni risultati degni di nota.

Per quanto riguarda gli acidi grassi, acido arachidonico e acido linoleico sono risultati diminuiti nei pazienti LND rispetto ai CTRL e uguali ai PCI (Figura 22).

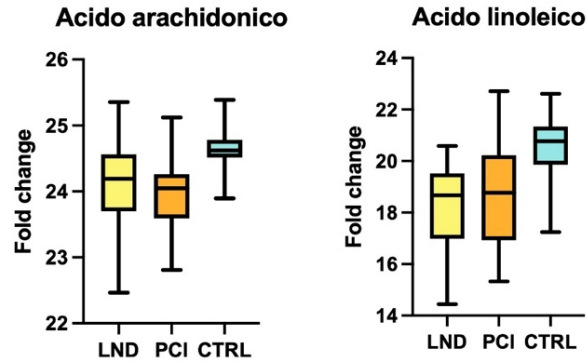


Figura 22: Rappresentazione grafica dei principali acidi grassi risultati dall'analisi

La carnitina, utilizzata per il trasporto all'interno dei mitocondri delle catene di acidi grassi utilizzate per le beta ossidazione, risulta, invece, aumentata nei LND rispetto ai CTRL (Figura 23). Altro metabolita, la cui alterazione può risultare interessante, è rappresentato dal glicerol trivalerato, un triestere composto da glicerolo unito a tre catene di acido valerico. Questo è risultato aumentato significativamente nei pazienti LND rispetto agli altri due gruppi, CTRL e PCI (Figura 23).

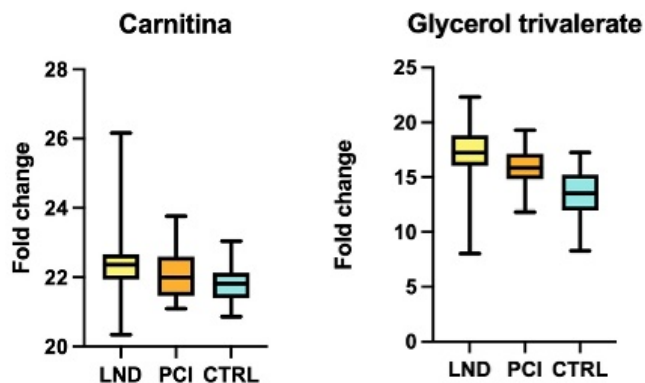


Figura 23: Rappresentazione grafica di altri metaboliti lipidici significativi

I fosfolipidi sono risultati diminuiti nei pazienti LND rispetto alle altre popolazioni, in particolare il gruppo di lisofosfatidilcoline (LPC 16:0 / 18:0 / 20:3), alcune fosfatidicoline (PC) e fosfatidiletanolammine (PE), come mostrato in Figura 24.

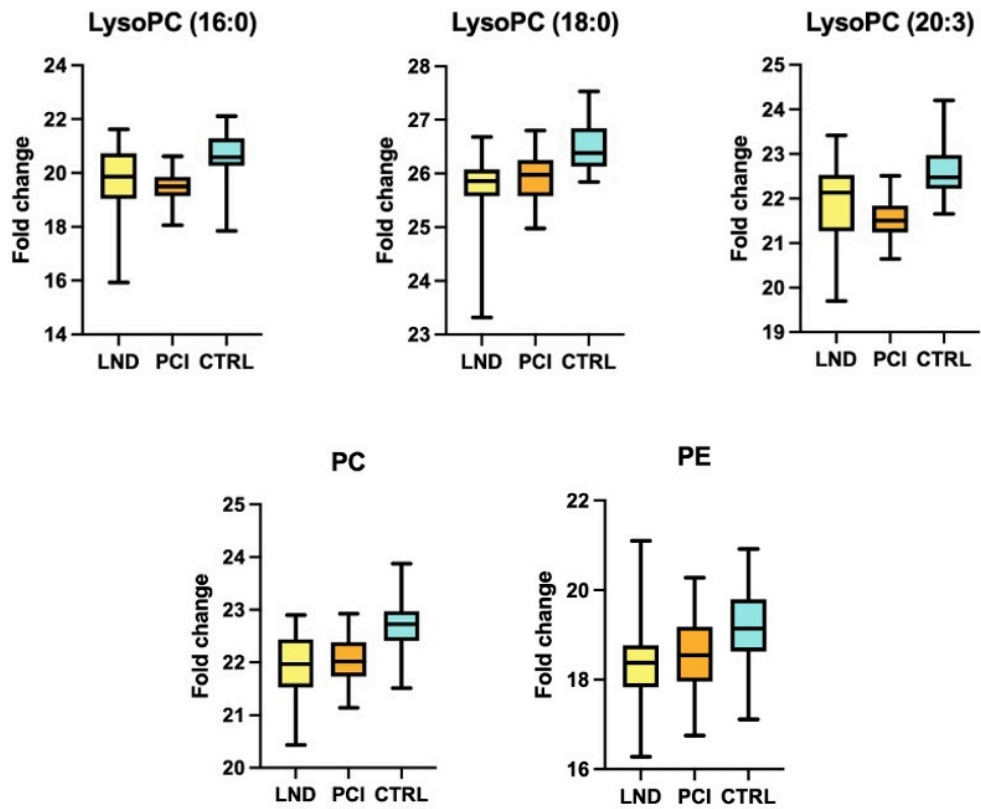


Figura 24: Rappresentazione grafica di altri metaboliti lipidici significativi

DISCUSSIONE

La malattia di Lesch-Nyhan è una patologia genetica rara causata da difetto severo dell'enzima HPRT. Questo difetto spiega l'iperuricemia, e quindi i sintomi articolari e renali, mentre rimangono ignote le cause delle manifestazioni neuro-comportamentali tipiche della malattia nella sua forma classica.

Nel nostro studio abbiamo arruolato un totale di 24 pazienti LND, 36 CTRL abbinati per fasce d'età e sesso (maschile) e 28 PCI.

L'analisi preliminare dei 400 metaboliti risultati statisticamente significativi dall'analisi UHPLC/MS con colonna HILIC con polarità positiva e negativa evidenzia che il difetto enzimatico responsabile della LND non altera esclusivamente il metabolismo purinico, bensì determina modificazioni trasversali nel network metabolico. In particolare, abbiamo riscontrato alterazioni nell'ambito del metabolismo energetico, lipidico, amminoacidico, con particolare interesse nel metabolismo dell'istidina, e dopaminergico. Dei 400 metaboliti, più della metà (216) sono risultati significativamente modulati nel confronto tra LND e CTRL; 122, invece, rappresentano i metaboliti significativamente alterati tra LND e PCI. I restanti 62, unicamente significativi nel confronto tra PCI e CTRL, non sono stati presi in considerazione, in quanto non oggetto di interesse specifico dello studio.

Prima osservazione da fare è che nell'Enrichment Analysis, utilizzando un programma agnostico, vale a dire uno strumento che non richiede a priori un'ipotesi su quelli che sono i pathway coinvolti, ne è emerso un profilo metabolomico fortemente compatibile con la Lesch-Nyhan, rafforzando l'affidabilità e la rilevanza biologica dell'analisi effettuata (Figura 14). Da ciò deduciamo che il profilo metabolico dei pazienti analizzati mostra una firma distintiva compatibile con la malattia, contribuendo alla comprensione dei meccanismi fisiopatologici o alla possibile identificazione di biomarcatori.

Nell'ambito del metabolismo purinico abbiamo ottenuto delle conferme nelle variazioni di alcuni metaboliti correlati al deficit dell'enzima HPRT. In particolare, l'aumento di ipoxantina e xantina, associato alla riduzione di adenosina e inosina sono perfettamente in linea con le attese, così come l'aumento di acido urico, lievemente aumentato nei LND

rispetto ai PCI nonostante la terapia ipouricemizzante (Figura 15 e Figura 16). La completa mancanza dell'enzima cardine della via di salvataggio delle purine, che converte ipoxantina e guanina rispettivamente in IMP e GMP causa necessariamente un aumento dei prodotti a valle che non riescono ad essere recuperati, quindi ipoxantina, che verrà convertita in xantina dalla xantina ossidasi e poi in acido urico (Figura 1). Anche la riduzione di inosina e adenosina può essere spiegata dall'alterazione della via di salvataggio delle basi (Figura 15).

Dato il difetto enzimatico, ci aspetteremmo anche una riduzione dell'IMP, prodotto della reazione da guanina e ipoxantina. Tuttavia, IMP è risultato essere aumentato nei LND rispetto ai CTRL, ma non rispetto ai PCI (Figura 16). L'aumento rispetto ai CTRL può essere spiegato dalla stimolazione della via di sintesi de novo, che risulta essere compensatoria alla carenza dell'enzima della via di salvataggio, per via dell'aumento di PRPP non consumato da HPGRT²⁰. Questa via porta come prodotto finale a IMP, che quindi risulta essere aumentato. Nei pazienti PCI, invece, un aumento ulteriore di IMP rispetto ai LND si potrebbe correlare con l'aumentato stress ossidativo o, in generale, il mancato turnover cellulare a livello neuronale, che quindi determina un minor consumo di AMP e GMP, prodotti a partire da IMP.

Questi risultati confermano quanto descritto dallo studio metabolomico *targeted* di Ceballos-Picot et al. del 2015⁶³, nel quale, analizzando globuli rossi di soggetti affetti da LND, risultava un aumento di ipoxantina e S-AMP, associata ad una riduzione di inosina e ATP; IMP restava invariato. Oltre a questo, lo studio riportava anche un aumento di AICAR (5-aminoimidazolo-4-carbossamide ribonucleotide) e del suo prodotto fosforilato ZTP. L'aumento di questo metabolita era stato valutato anche da un altro importante studio di metabolomica su tessuto cerebrale da topi HPRT mutati¹⁰⁸, permettendo di considerare AICAR come potenziale biomarker diagnostico della patologia.

AICAR è un intermedio del metabolismo purinico, incluso nella via di sintesi de novo e precursore di IMP (Figura 25). Una volta in circolo, AICAR ha la tendenza ad accumularsi all'interno dei globuli rossi, dove viene fosforilato a ZMP e vi permane per tutta la vita della cellula (120 giorni)¹¹⁶.

Nel nostro studio AICAR non è stato rilevato tra i vari metaboliti identificati, probabilmente a causa delle sue concentrazioni estremamente basse nel plasma.

Questa ipotesi è supportata dal fatto che, essendo AICAR una sostanza dopante, sono stati effettuati numerosi tentativi allo scopo di sviluppare test affidabili per la sua rilevazione nel plasma e urine, senza però ottenere risultati soddisfacenti ¹¹⁷.

Dal nostro studio, tuttavia, è emerso un altro intermedio della via di sintesi de novo delle basi puriniche, AIR (5-amminoimidazolo ribonucleotide), precursore di AICAR (Figura 25). Questo è risultato essere ridotto nei LND rispetto ai PCI, mentre non è stata riscontrata una differenza statisticamente significativa nel confronto con i CTRL (Figura 16). Come spiegazione a questo fenomeno potremmo pensare al fatto che nei LND c'è un aumento della via di sintesi de novo delle purine, con quindi consumo dei precursori più a monte, tra cui AIR, associata ad un accumulo dei prodotti a valle (AICAR).

Di conseguenza, la diminuzione dei livelli di AIR potrebbe essere indirettamente correlata con l'aumento di AICAR e quindi rappresentare in futuro un potenziale parametro utile da valutare nel sospetto diagnostico della malattia.

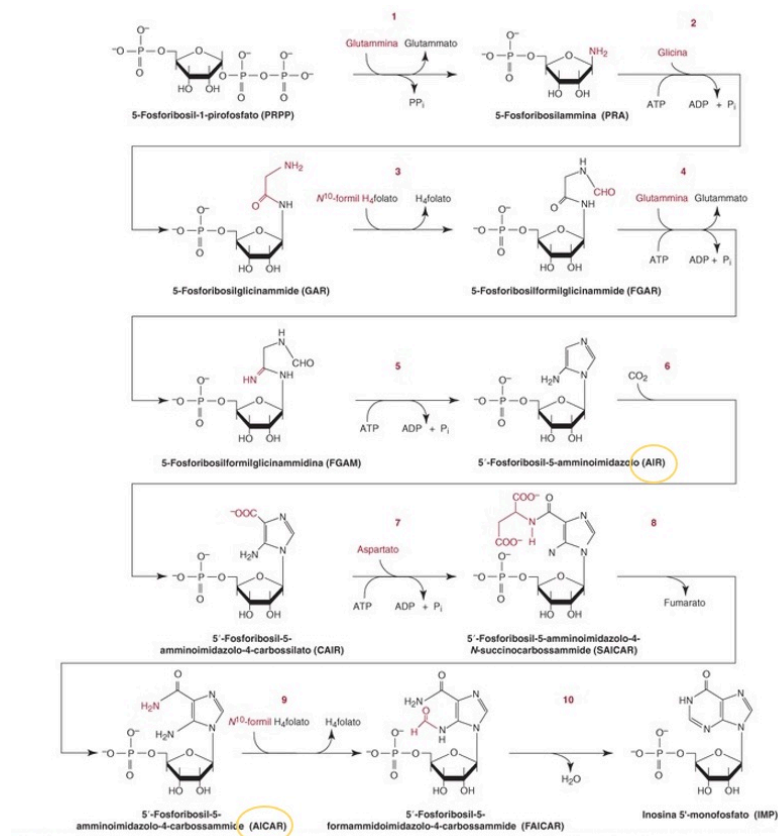


Figura 25: Sintesi de novo dei ribonucleotidi purinici (Devlin TM. Biochimica con aspetti clinici (capitolo 20). 5^a edizione. Edises)

Nella figura sono rappresentate le diverse reazioni che portano alla sintesi de novo dei ribonucleotidi purinici. Cerchiati in giallo vediamo AIR e AICAR, metaboliti di interesse nell'ambito della malattia di Lesch-Nyhan

Per quanto riguarda il metabolismo dell'istidina, la riduzione di questo amminoacido essenziale osservata nei pazienti LND (Figura 17) potrebbe avere un'origine dietetica, nonostante il profilo nutrizionale di questi bambini risulti generalmente adeguato nella maggior parte dei casi.

In alternativa, alcuni studi effettuati su pazienti con ischemia cerebrale hanno dimostrato che l'istidina possiede un ruolo neuroprotettivo molto importante, in quanto promuove la migrazione astrocitaria ^{118,119}. Per questo motivo, nei pazienti LND potrebbe esserci una maggiore migrazione dell'istidina a livello cerebrale, portando quindi ad una sua riduzione nel plasma. Questo, inoltre, spiegherebbe anche perché i valori di istidina nei pazienti con PCI, con un danno neuronale maggiore, risultano ancora più bassi rispetto ai campioni LND.

Per quanto riguarda l'N-metilimidazoloacetato (1-MI4AA), prodotto finale della metilazione dell'istamina (Figura 26), il suo aumento (Figura 17) è risultato in contrasto con quanto emerso dallo studio di Tschirmer et al ¹⁰⁸. In questa analisi metabolomica *untargeted* su tessuto cerebrale di topi HPRT mutati 1-MI4AA è risultato ridotto rispetto ai controlli. La sua riduzione si associa ad un'alterata trasmissione istaminergica nei tessuti cerebrali, quindi, alla base della teoria di deplezione dopaminergica che ad oggi rimane la più accreditata per spiegare le manifestazioni neuro-comportamentali della Lesch-Nyhan.

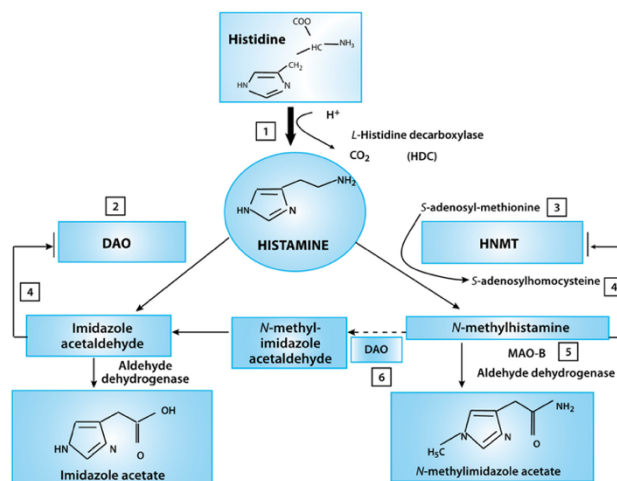


Figura 26: *Metabolismo dell'istamina*
 (Tatarinova, Deiss et al. "The impact of MNRI Therapy on the Levels of Neurotransmitters Associated with Inflammatory Processes", 2020)

Nella figura è mostrata il pathway metabolico dell'istamina. L'istidina è precursore dell'istamina, che poi può seguire due vie diverse: metilazione o deaminazione. 1-MI4AA è il prodotto finale della metilazione.

L'aumento di 1-MI4AA nel plasma di pazienti affetti da LND non è mai stato riportato in letteratura. Il confronto con i dati pubblicati da Tschirner et al.¹⁰⁸ risulta limitato, in quanto basato su campioni di tessuto cerebrale prelevato da modelli murini HPRT-mutati e non da soggetti umani.

Alla luce di tutte queste alterazioni, sarebbe auspicabile in futuro approfondire il ruolo della via istaminergica attraverso studi specifici e mirati.

Anche la dopamina è risultata aumentata nei campioni LND rispetto ai CTRL, senza alcuna differenza significativa rispetto a PCI (Figura 18). Questo potrebbe sembrare in contrasto con l'ipotesi dopaminergica sostenuta in letteratura come possibile causa delle manifestazioni neuro-comportamentali della patologia²⁴⁻³¹. In realtà, però, dobbiamo considerare che si tratta della dopamina plasmatica, quindi presente in periferia e non a livello dei tessuti cerebrali o del liquor, valutata negli studi precedentemente citati. Questo aumento della dopamina nei pazienti LND potrebbe essere spiegato dall'utilizzo dei farmaci neurolettici, come risperidone o quetapina. Tali farmaci, infatti, agiscono bloccando i recettori dopaminergici D2 a livello centrale e l'organismo può rispondere a feedback aumentando la sintesi e il rilascio di dopamina. Tuttavia, questo compenso è variabile e, nel caso degli antipsicotici atipici, che sono quelli più utilizzati in questo ambito, dato che il blocco D2 è minore, sarà minore anche il compenso atteso. Inoltre, all'interno delle popolazioni LND e PCI analizzate, pochi pazienti risultavano in terapia con neurolettici al momento del prelievo, 4 su 24 per LND e 1 su 28 per PCI (Tabella 2 e Tabella 4), non sufficienti a determinare un aumento significativo della dopamina nel gruppo. Quindi, i neurolettici non sembrano essere la causa di questo risultato.

Altra ipotesi è quella correlata allo stress cronico. Lo stress, infatti, attiva l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene con aumento del rilascio del cortisolo e attiva direttamente anche il sistema simpatico, stimolando la produzione e rilascio di catecolamine, noradrenalina e adrenalina, da parte della midollare del surrene. Noradrenalina e adrenalina, però, derivano dalla dopamina, che di conseguenza può risultare aumentata nel plasma. È stato infatti dimostrato che in condizioni di aumento del tono simpatico, per stress di natura fisica o anche psicologica, i livelli plasmatici di dopamina aumentano, seppur in misura minore rispetto a quelli di noradrenalina e adrenalina^{120,121}.

I pazienti affetti da LND sono sottoposti a stress cronico, non solo fisico a causa della compromissione motoria tipica della patologia, ma anche psicologico, dovuto al tipico ‘Lesch-Nyhan Behaviour’ che li caratterizza ⁵⁰. Per questo motivo, i livelli di dopamina plasmatica potrebbero risultare aumentati.

La fenilalanina segue l’andamento della dopamina (Figura 18), in quanto risulta essere precursore della tirosina, da cui poi si forma L-dopa e dopamina (Figura 27).

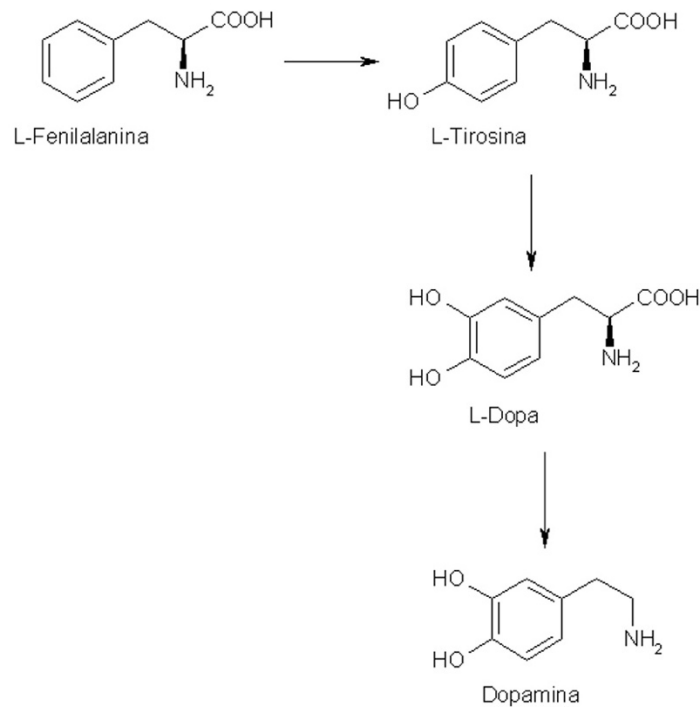


Figura 27: Sintesi della dopamina

La figura mostra i passaggi che portano alla sintesi di dopamina. Si parte dalla fenilalanina, convertita in tirosina, che successivamente viene trasformata in L-dopa e, infine, dopamina.

In merito al metabolismo energetico, sono risultati significativamente modulati alcuni metaboliti nell’ambito della produzione di NAD. Il NAD è un coenzima fondamentale per il nostro organismo, coinvolto nella glicolisi, nel ciclo di Krebs, nella catena di trasporto degli elettroni e utilizzato per la produzione di ATP. Può essere prodotto a partire dal triptofano, seguendo la via sintesi *de novo*, che porta ad acido chinolonico e successivamente niacina, un substrato fondamentale per la sintesi di NAD. Alternativa è rappresentata dalla via di salvataggio, a partire dalla nicotinamide (niacinammide, una forma di vitamina B3), che però necessita dell’utilizzo di ATP come fonte energetica ¹²² (Figura 28).

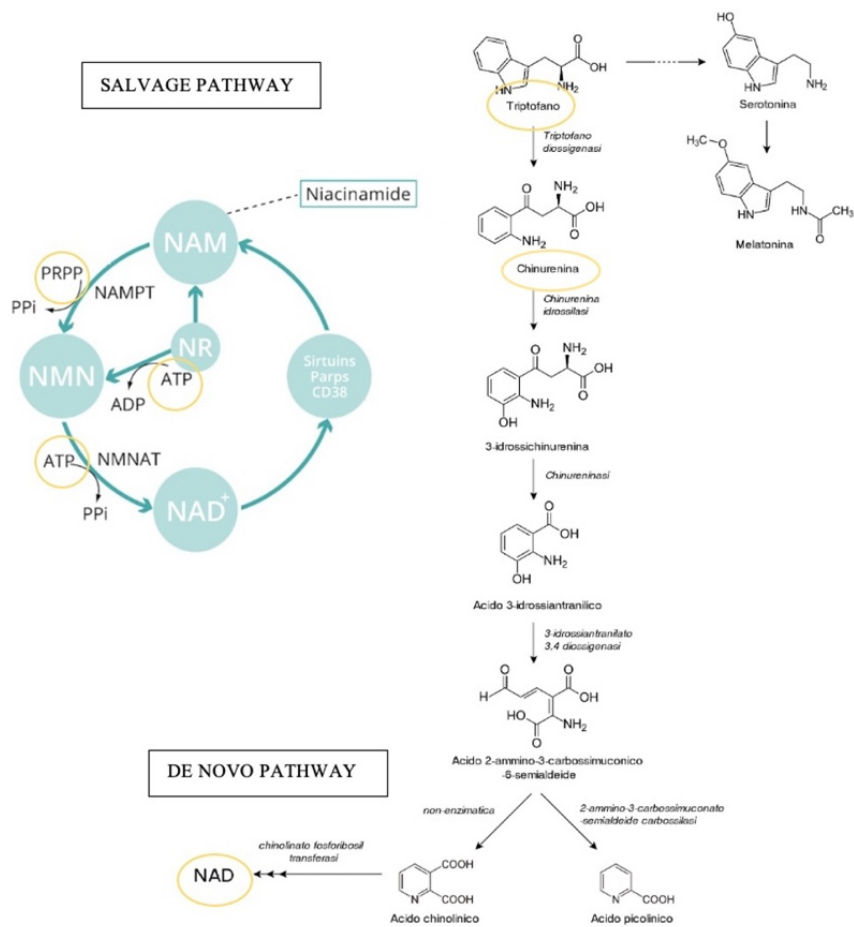


Figura 28: Sintesi del NAD

Nella figura sono mostrate le due possibili vie metaboliche di sintesi per il NAD, la via di sintesi *de novo*, che parte dal triptofano e la via di salvataggio, che ricicla la niacinamide, portando a NAM, NMN e poi NAD. Si evidenzia nella via di salvataggio la necessità di energia sotto forma di ATP e la presenza di PRPP.

Nei pazienti LND vi è una riduzione dei livelli di ATP dovuta al mancato funzionamento del riciclaggio delle purine e all'aumento dell'attivazione della sintesi *de novo* che ne consuma in quantità maggiori. Questo dato è stato anche confermato dallo studio metabolomico di Ceballos-Picot et al ⁶³. Siccome manca ATP, la produzione di NAD viene garantita principalmente dalla via *de novo*, a partire dal triptofano, che infatti risulta essere ridotto, così come la L-chinurenina, intermedio della via metabolica (Figura 19; Figura 28). A conferma di ciò, nei pazienti LND si osserva un aumento della nicotinammide rispetto ai CTRL (Figura 19), verosimilmente dovuto ad una ridotta attivazione della via di salvataggio, che ne favorisce l'accumulo.

Un'ulteriore possibile spiegazione dell'inibizione della via di salvataggio del NAD a favore della sintesi *de novo* riguarda il PRPP. Questo metabolita viene utilizzato come cofattore nella conversione del NAM in NMN (Figura 28), ma rappresenta anche il punto di partenza per la sintesi *de novo* dei nucleotidi purinici. Nei pazienti LND questa via risulta essere la via preferenziale di utilizzo del PRPP, non avendo altra scelta per formare nucleotidi purinici e, di conseguenza PRPP verrà meno utilizzato per il NAD, portando ad una maggiore stimolazione della via alternativa.

Nei campioni LND sono risultati significativamente alterati anche alcuni amminoacidi, tra cui arginina e glutammina, ridotte, mentre lisina, treonina, isoleucina e valina risultano aumentati (Figura 20). Sebbene tali risultati non appaiano particolarmente significativi, la letteratura riporta alcuni studi condotti nell'ambito della malattia di Lesch-Nyhan che hanno evidenziato alterazioni del profilo amminoacidico nel liquido cerebrospinale e su campioni di tessuto cerebrale ^{123,124}.

Per questo motivo, a scopo speculativo, potrebbe essere interessante un eventuale confronto con i livelli degli stessi amminoacidi nel liquor o, laddove possibile, nel tessuto cerebrale post-mortem, al fine di valutare una potenziale correlazione.

I BCAA, in particolare isoleucina e valina, risultano aumentati in circolo nei pazienti LND (Figura 21). Ipotizziamo che l'aumento sia dovuto ad una competizione con altri amminoacidi a livello del trasportatore LAT1, un trasportatore aspecifico presente a livello della barriera emato-encefalica (Figura 29).

In particolare, data la carenza di dopamina e serotonina a livello cerebrale, i loro precursori, triptofano e tirosina, tenderanno a passare in misura maggiore, determinando quindi un aumento dei BCAA in circolo.

Teniamo comunque sempre presente che nei pazienti LND è stato riportato un aumento del turnover proteico, il quale potrebbe contribuire a giustificare le alterazioni riscontrate nel profilo amminoacidico ¹²⁵.

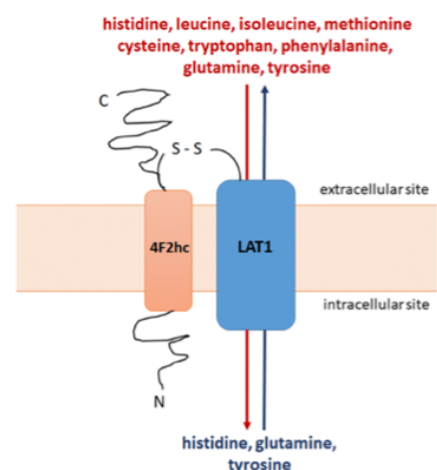


Figura 29: Trasportatore LAT1

Per quanto riguarda, infine, il metabolismo lipidico, le alterazioni metabolomiche osservate nella nostra coorte potrebbero essere spiegate da due ipotesi principali.

Lo studio di Vinokurov et al.¹²⁶ ha valutato la correlazione tra il difetto enzimatico di HPRT e la funzionalità mitocondriale su colture di cellule neuronale, mostrando una minore funzionalità mitocondriale nei pazienti LND. A ciò consegue da un lato l'aumento nella produzione di ROS, che però non sembra essere causa dell'aumentato stress ossidativo dati i normai livelli di glutazione (principale antiossidante endogeno), dall'altro possibili alterazioni nel processo di beta-ossidazione degli acidi grassi¹²⁷.

Queste evidenze potrebbero giustificare l'aumento di carnitina e del triestere, glicerol trivalerato riscontrati nei pazienti LND (Figura 23).

Anche gli acidi grassi dovrebbero essere aumentati, come risultato anche in uno studio multi-omico recente, effettuato su globuli rossi di tre fratelli affetti da LND¹²⁸.

In realtà, però, gli acidi grassi rilevati dal nostro studio, acido arachidonico, linoleico, non vengono principalmente utilizzati come fonte energetica tramite beta-ossidazione, ma altre funzioni importanti all'interno del nostro organismo. La riduzione dei livelli di questi acidi grassi nei pazienti LND (Figura 22) potrebbe in parte essere attribuibile ad un'insufficiente assunzione dietetica dell'acido linoleico, che è un acido grasso essenziale, precursore per la sintesi di acido arachidonico.

In alternativa, dato il ruolo di questi acidi grassi come componenti delle membrane cellulari, l'elevato turnover nei pazienti LND potrebbe spiegarne la diminuzione.

Analogo ragionamento può essere valido per spiegare le alterazioni di LPC, PC e PE (Figura 24). Alterazioni dei fosfolipidi, in particolare LPC, sono state dimostrate in differenti studi, in associazione a patologie neurodegenerative, quali Parkinson e Alzheimer. In uno studio di lipidomica su campioni di corteccia cerebrale prelevati post-mortem da pazienti affetti da Parkinson si è riscontrato un aumento dei TAGs, triacilgliceroli, associati ad una riduzione di LPC, probabilmente a causa dell'aumentato turnover cellulare¹²⁹. Riguardo all'Alzheimer, i pazienti affetti presentano ridotti acidi grassi a livello cerebrale e quindi richiedono un rifornimento dal compartimento plasmatico, che viene soddisfatto da LPC¹³⁰. Per questo motivo, è congruo attendersi una riduzione plasmatica dei livelli di LCP, come riscontrato nella nostra casistica (Figura 24). Inoltre, una riduzione dei livelli di LPC sembra essere anche un fattore di rischio che potrebbe favorire la comparsa della patologia.

Anche PC e PE sono risultate ridotte in alcuni studi condotti sia su tessuto cerebrale e liquor, sia su plasma, sempre in pazienti affetti da malattie neurodegenerative ¹³¹.

Considerando che i pazienti LND e PCI presentano alterazioni neurologiche in parte sovrapponibili a quelle osservate nelle patologie neurodegenerative esaminate, i risultati del nostro studio confermano quanto già riportato in letteratura, rafforzando così l'ipotesi di una possibile correlazione tra le patologie neurodegenerative e le alterazioni del metabolismo lipidico.

CONCLUSIONI

Il presente studio, nonostante la sua natura monocentrica, ha permesso l'arruolamento di un totale di 24 pazienti con diagnosi di malattia di Lesch-Nyhan (LND), rappresentando, al meglio delle nostre conoscenze, la più ampia analisi metabolomica *untargeted* su plasma di pazienti affetti da LND attualmente disponibile in letteratura scientifica.

Le alterazioni metabolomiche rilevate risultano fortemente indicative della malattia. Infatti, l'Enrichment Analysis, condotta utilizzando un programma del tutto agnostico, ha mostrato sotto la voce Lesch-Nyhan un importante arricchimento di metaboliti rispetto a quanto atteso, rafforzando l'affidabilità e la rilevanza biologica dei dati ottenuti.

Sono stati identificati 400 metaboliti significativamente modulati nel confronto tra LND e CTRL o LND e PCI, coinvolgendo trasversalmente numerose vie metaboliche. Questo suggerisce che il difetto enzimatico alla base della malattia non si limita ad una alterazione della singola via del metabolismo delle purine, ma si ripercuote sull'intero network del metabolismo cellulare. Da ciò nasce la necessità di approfondire i meccanismi biologici sottostanti a questa patologia, con l'intento di identificare nuovi biomarcatori diagnostici e potenziali target terapeutici.

Nello specifico, oltre alle attese alterazioni nel metabolismo purinico, la nostra analisi ha rivelato significative modificazioni nel metabolismo degli amminoacidi, in particolare dell'istidina, nel metabolismo della dopamina, nel metabolismo energetico, con particolare attenzione al NAD, e nel metabolismo lipidico.

Uno dei principali limiti dello studio è stato il campione biologico utilizzato. Sebbene il plasma sia facilmente accessibile, esso fornisce informazioni meno specifiche e dettagliate rispetto, ad esempio, al liquor, limitando così l'interpretazione degli aspetti neurologici della patologia.

Inoltre, questa analisi rappresenta una prima valutazione dei risultati ottenuti alla UHPLC-MS con colonna HILIC, una tecnica che consente di identificare con maggiore specificità i metaboliti più polari, quindi amminoacidi, zuccheri e anche basi azotate, ma risulta meno efficace nell'analisi dei metaboliti apolari, principalmente di natura lipidica.

Un ulteriore limite dello studio è rappresentato dalla sua natura monocentrica. Tuttavia, questo può anche essere considerato un punto di forza, poiché ha permesso di mantenere

uno standard uniforme nel prelievo e nella conservazione dei campioni delle tre popolazioni in esame, riducendo così i potenziali bias nei risultati. Inoltre, nonostante l'impostazione monocentrica, il numero di pazienti arruolati è stato soddisfacente e il fatto che tutti fossero seguiti in follow-up presso il nostro Istituto ha facilitato la raccolta accurata e completa dei dati clinici, fondamentali per il confronto con i dati metabolomici.

In conclusione, questi dati preliminari risultano promettenti e offrono numerosi spunti per ulteriori approfondimenti. Tra le prospettive future dello studio vi è l'implementazione dell'analisi metabolomica mediante la valutazione dei metaboliti identificabili tramite UHPLC/MS con colonne C18, al fine di ottenere una visione più esaustiva dei pathways alterati nelle LND, ampliando e approfondendo quanto emerso nel presente studio pilota. Inoltre, sugli stessi campioni utilizzati per questa analisi preliminare, sarà possibile condurre analisi di proteomica e lipidomica, arricchendo il quadro multi-omici e fornendo quindi una rappresentazione più completa e integrata del profilo molecolare della malattia.

Qualora da questi studi più approfonditi emergessero alterazioni rilevanti in una specifica via metabolica, si potrebbe pensare anche di avviare un'analisi metabolomica *targeted*, mirata su quella specifica via, al fine di indagarla in modo più dettagliato.

Infine, una collaborazione multicentrica consentirebbe di aumentare la numerosità campionaria e, quindi, valutare la riproducibilità dei dati e eventualmente consolidare i risultati ottenuti.

BIBLIOGRAFIA

1. Pareek V, Pedley AM, Benkovic SJ. Human de novo purine biosynthesis. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2021;56(1):1-16. doi:10.1080/10409238.2020.1832438
2. Devlin TM. *Biochimica con aspetti clinici (capitolo 20)*. 5° edizione. Edises
3. Ali ES, Ben-Sahra I. Regulation of nucleotide metabolism in cancers and immune disorders. *Trends Cell Biol.* 2023;33(11):950-966. doi:10.1016/j.tcb.2023.03.003
4. Tran DH, Kim D, Kesavan R, et al. De novo and salvage purine synthesis pathways across tissues and tumors. *Cell.* 2024;187(14):3602-3618.e20. doi:10.1016/j.cell.2024.05.011
5. Torres RJ, Puig JG. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) deficiency: Lesch-Nyhan syndrome. *Orphanet J Rare Dis.* 2007;2(1):48. doi:10.1186/1750-1172-2-48
6. Moffatt BA, Ashihara H. Purine and Pyrimidine Nucleotide Synthesis and Metabolism. *Arab Book.* 2002;1:e0018. doi:10.1199/tab.0018
7. Fu R, Sutcliffe D, Zhao H, et al. Clinical severity in Lesch-Nyhan disease: the role of residual enzyme and compensatory pathways. *Mol Genet Metab.* 2015;114(1):55-61. doi:10.1016/j.ymgme.2014.11.001
8. Madeo A, Di Rocco M, Brassier A, Bahi-Buisson N, De Lonlay P, Ceballos-Picot I. Clinical, biochemical and genetic characteristics of a cohort of 101 French and Italian patients with HPRT deficiency. *Mol Genet Metab.* 2019;127(2):147-157. doi:10.1016/j.ymgme.2019.06.001
9. Lesch M, Nyhan WL. A familial disorder of uric acid metabolism and central nervous system function. *Am J Med.* 1964;36:561-570. doi:10.1016/0002-9343(64)90104-4
10. Seegmiller JE, Rosenbloom FM, Kelley WN. Enzyme defect associated with a sex-linked human neurological disorder and excessive purine synthesis. *Science.* 1967;155(3770):1682-1684. doi:10.1126/science.155.3770.1682
11. Jinnah HA, Ceballos-Picot I, Torres RJ, et al. Attenuated variants of Lesch-Nyhan disease. *Brain J Neurol.* 2010;133(Pt 3):671-689. doi:10.1093/brain/awq013
12. Jolly DJ, Esty AC, Bernard HU, Friedmann T. Isolation of a genomic clone partially encoding human hypoxanthine phosphoribosyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982;79(16):5038-5041. doi:10.1073/pnas.79.16.5038
13. Hara K, Kashiwamata S, Ogasawara N, et al. A female case of the Leach-Nyhan syndrome. *Tohoku J Exp Med.* 1982;137(3):275-282. doi:10.1620/tjem.137.275
14. AlBakheet A, AlQudairy H, Alkhalifah J, Almoaily S, Kaya N, Rahbeeni Z. Detailed genetic and clinical analysis of a novel de novo variant in HPRT1: Case report of a

female patient from Saudi Arabia with Lesch-Nyhan syndrome. *Front Genet.* 2022;13:1044936. doi:10.3389/fgene.2022.1044936

15. Aral B, de Saint Basile G, Al-Garawi S, Kamoun P, Ceballos-Picot I. Novel nonsense mutation in the hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase gene and nonrandom X-inactivation causing Lesch-Nyhan syndrome in a female patient. *Hum Mutat.* 1996;7(1):52-58. doi:10.1002/(SICI)1098-1004(1996)7:1<52::AID-HUMU7>3.0.CO;2-R
16. De Gregorio L, Nyhan WL, Serafin E, Chamoles NA. An Unexpected Affected Female Patient in a Classical Lesch–Nyhan Family. *Mol Genet Metab.* 2000;69(3):263-268. doi:10.1006/mgme.2000.2967
17. Ogasawara N, Stout JT, Goto H, Sonta S, Matsumoto A, Caskey CT. Molecular analysis of a female Lesch-Nyhan patient. *J Clin Invest.* 1989;84(3):1024-1027. doi:10.1172/JCI114224
18. Fu R, Ceballos-Picot I, Torres RJ, et al. Genotype-phenotype correlations in neurogenetics: Lesch-Nyhan disease as a model disorder. *Brain J Neurol.* 2014;137(Pt 5):1282-1303. doi:10.1093/brain/awt202
19. Fu R, Chen CJ, Jinnah HA. Genotypic and phenotypic spectrum in attenuated variants of Lesch-Nyhan disease. *Mol Genet Metab.* 2014;112(4):280-285. doi:10.1016/j.ymgme.2014.05.012
20. 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(6):1166-1173. doi:10.1016/S0021-9258(19)56968-X
21. Visser JE, Bär PR, Jinnah HA. Lesch–Nyhan disease and the basal ganglia. *Brain Res Rev.* 2000;32(2):449-475. doi:10.1016/S0165-0173(99)00094-6
22. Bassermann R, Gutensohn W, Jahn H, Springmann JS. Pathological and immunological observations in a case of Lesch-Nyhan-syndrome. *Eur J Pediatr.* 1979;132(2):93-98. doi:10.1007/BF00447375
23. R. W. E. Watts, Spellacy E, Gibbs DA, Allsop J, McKeran RO, Slavin GE. Clinical, Post-mortem, Biochemical and Therapeutic Observations on the Lesch-Nyhan Syndrome with Particular Reference to the Neurological Manifestations. *QJM Int J Med.* 1982;51(1):43-78. doi:10.1093/oxfordjournals.qjmed.a067707
24. Lloyd KG, Hornykiewicz O, Davidson L, et al. Biochemical evidence of dysfunction of brain neurotransmitters in the Lesch-Nyhan syndrome. *N Engl J Med.* 1981;305(19):1106-1111. doi:10.1056/NEJM198111053051902
25. Silverstein FS, Johnston MV, Hutchinson RJ, Edwards NL. Lesch-Nyhan syndrome: CSF neurotransmitter abnormalities. *Neurology.* 1985;35(6):907-907. doi:10.1212/WNL.35.6.907

26. Jankovic J, Caskey TC, Stout JT, Butler IJ. Lesch-Nyhan syndrome: a study of motor behavior and cerebrospinal fluid neurotransmitters. *Ann Neurol.* 1988;23(5):466-469. doi:10.1002/ana.410230507
27. Wong DF, Harris JC, Naidu S, et al. Dopamine transporters are markedly reduced in Lesch-Nyhan disease in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(11):5539-5543. doi:10.1073/pnas.93.11.5539
28. Ernst M, Zametkin AJ, Matochik JA, et al. Presynaptic dopaminergic deficits in Lesch-Nyhan disease. *N Engl J Med.* 1996;334(24):1568-1572. doi:10.1056/NEJM199606133342403
29. Bitler CM, Howard BD. Dopamine Metabolism in Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase-Deficient Variants of PC12 Cells. *J Neurochem.* 1986;47(1):107-112. doi:10.1111/j.1471-4159.1986.tb02837.x
30. Yeh J, Zheng S, Howard BD. Impaired differentiation of HPRT-deficient dopaminergic neurons: a possible mechanism underlying neuronal dysfunction in Lesch-Nyhan syndrome. *J Neurosci Res.* 1998;53(1):78-85. doi:10.1002/(SICI)1097-4547(19980701)53:1<78::AID-JNR8>3.0.CO;2-G
31. Lewers JC, Ceballos-Picot I, Shirley TL, Mockel L, Egami K, Jinnah HA. Consequences of impaired purine recycling in dopaminergic neurons. *Neuroscience.* 2008;152(3):761-772. doi:10.1016/j.neuroscience.2007.10.065
32. A potential animal model for Lesch-Nyhan syndrome through introduction of HPRT mutations into mice - PubMed. Accessed March 18, 2025. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3029599/>
33. Finger S, Heavens RP, Sirinathsinghji DJ, Kuehn MR, Dunnett SB. Behavioral and neurochemical evaluation of a transgenic mouse model of Lesch-Nyhan syndrome. *J Neurol Sci.* 1988;86(2-3):203-213. doi:10.1016/0022-510x(88)90099-8
34. Dunnett SB, Sirinathsinghji DJ, Heavens R, Rogers DC, Kuehn MR. Monoamine deficiency in a transgenic (Hprt-) mouse model of Lesch-Nyhan syndrome. *Brain Res.* 1989;501(2):401-406. doi:10.1016/0006-8993(89)90659-8
35. Jinnah HA, Langlais PJ, Friedmann T. Functional analysis of brain dopamine systems in a genetic mouse model of Lesch-Nyhan syndrome. *J Pharmacol Exp Ther.* 1992;263(2):596-607.
36. Jinnah HA, Wojcik BE, Hunt M, et al. Dopamine deficiency in a genetic mouse model of Lesch-Nyhan disease. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 1994;14(3 Pt 1):1164-1175. doi:10.1523/JNEUROSCI.14-03-01164.1994
37. Tschirner SK, Gutzki F, Schneider EH, Seifert R, Kaefer V. Neurotransmitter and their metabolite concentrations in different areas of the HPRT knockout mouse brain. *J Neurol Sci.* 2016;365:169-174. doi:10.1016/j.jns.2016.04.025

38. Ceballos-Picot I, Mockel L, Potier MC, et al. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase regulates early developmental programming of dopamine neurons: implications for Lesch-Nyhan disease pathogenesis. *Hum Mol Genet.* 2009;18(13):2317. doi:10.1093/hmg/ddp164
39. Egami K, Yitta S, Kasim S, et al. Basal ganglia dopamine loss due to defect in purine recycling. *Neurobiol Dis.* 2007;26(2):396-407. doi:10.1016/j.nbd.2007.01.010
40. McCreanor GM, Harkness RA. Lesch-Nyhan syndrome and its pathogenesis: normal nicotinamide-adenine dinucleotide but reduced ATP concentrations that correlate with reduced poly(ADP-ribose) synthetase activity in HPRT-deficient lymphoblasts. *J Inherit Metab Dis.* 1995;18(6):737-747. doi:10.1007/BF02436765
41. Visser JE, Smith DW, Moy SS, et al. Oxidative stress and dopamine deficiency in a genetic mouse model of Lesch-Nyhan disease. *Dev Brain Res.* 2002;133(2):127-139. doi:10.1016/S0165-3806(02)00280-8
42. McKeran RO. Factors in the pathogenesis of the brain damage and anaemia in the Lesch-Nyhan syndrome. *Ciba Found Symp.* 1977;(48):83-96. doi:10.1002/9780470720301.ch6
43. Cakmakli HF, Torres RJ, Menendez A, et al. Macrocytic anemia in Lesch-Nyhan disease and its variants. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet.* 2019;21(2):353-360. doi:10.1038/s41436-018-0053-1
44. Page T, Bakay B, Nissinen E, Nyhan WL. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase variants: correlation of clinical phenotype with enzyme activity. *J Inherit Metab Dis.* 1981;4(4):203-206. doi:10.1007/BF02263652
45. Torres RJ, Puig JG, Jinnah HA. Update on the phenotypic spectrum of Lesch-Nyhan disease and its attenuated variants. *Curr Rheumatol Rep.* 2012;14(2):189-194. doi:10.1007/s11926-011-0231-5
46. Puig JG, Torres RJ, Mateos FA, et al. The spectrum of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) deficiency. Clinical experience based on 22 patients from 18 Spanish families. *Medicine (Baltimore).* 2001;80(2):102-112. doi:10.1097/00005792-200103000-00003
47. Jinnah HA, Visser JE, Harris JC, et al. Delineation of the motor disorder of Lesch-Nyhan disease. *Brain.* 2006;129(5):1201-1217. doi:10.1093/brain/awl056
48. Anderson LT, Ernst M, Davis SV. Cognitive abilities of patients with Lesch-Nyhan disease. *J Autism Dev Disord.* 1992;22(2):189-203. doi:10.1007/BF01058150
49. Schretlen DJ, Harris JC, Park KS, Jinnah HA, del Pozo NO. Neurocognitive functioning in Lesch-Nyhan disease and partial hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase deficiency. *J Int Neuropsychol Soc JINS.* 2001;7(7):805-812. doi:10.1017/s135561770177703x

50. Bozano A, Schiaffino A, Spessa A, et al. Description of the Lesch-Nyhan neurobehavioral disorder and its management through participant observation of three young individuals. *JIMD Rep.* 2020;52(1):63-71. doi:10.1002/jmd2.12100
51. Schroeder SR, Oster-Granite ML, Berkson G, et al. Self-injurious behavior: gene-brain-behavior relationships. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2001;7(1):3-12. doi:10.1002/1098-2779(200102)7:1<3::aid-mrdd1002>3.0.co;2-#
52. Isola G, Piccardo I, De Mari A, Alberti G, Migliorati M. Oral Self-Mutilation in Lesch-Nyhan Patients: A Cross-Sectional Study. *J Clin Med.* 2022;11(20):5981. doi:10.3390/jcm11205981
53. Nanagiri A, Shabbir N. Lesch-Nyhan Syndrome. In: *StatPearls.* StatPearls Publishing; 2025. Accessed January 27, 2025. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556079/>
54. Kaufman JM, Greene ML, Seegmiller JE. Urine uric acid to creatinine ratio--a screening test for inherited disorders of purine metabolism. Phosphoribosyltransferase (PRT) deficiency in X-linked cerebral palsy and in a variant of gout. *J Pediatr.* 1968;73(4):583-592. doi:10.1016/s0022-3476(68)80274-4
55. Harris JC, Lee RR, Jinnah HA, Wong DF, Yaster M, Bryan RN. Craniocerebral magnetic resonance imaging measurement and findings in Lesch-Nyhan syndrome. *Arch Neurol.* 1998;55(4):547-553. doi:10.1001/archneur.55.4.547
56. Rylance HJ, Wallace RC, Nuki G. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase: assay using high performance liquid chromatography. *Clin Chim Acta.* 1982;121(2):159-165. doi:10.1016/0009-8981(82)90054-7
57. Edwards A, Voss H, Rice P, et al. Automated DNA sequencing of the human HPRT locus. *Genomics.* 1990;6(4):593-608. doi:10.1016/0888-7543(90)90493-e
58. McKeran RO, Andrews TM, Howell A, Gibbs DA, Chinn S, Watts WE. The diagnosis of the carrier state for the Lesch-Nyhan syndrome. *Q J Med.* 1975;44(174):189-205.
59. Puig JG, Mateos FA, Torres RJ, Buño AS. Purine metabolism in female heterozygotes for hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase deficiency. *Eur J Clin Invest.* 1998;28(11):950-957. doi:10.1046/j.1365-2362.1998.00392.x
60. Liu N, Zhuo ZH, Wang HL, et al. Prenatal diagnosis based on HPRT1 gene mutation in a Lesch-Nyhan family. *J Obstet Gynaecol J Inst Obstet Gynaecol.* 2015;35(5):490-493. doi:10.3109/01443615.2014.969209
61. Zoref-Shani E, Bromberg Y, Goldman B, et al. Prenatal diagnosis of Lesch-Nyhan syndrome: experience with three fetuses at risk. *Prenat Diagn.* 1989;9(9):657-661. doi:10.1002/pd.1970090909
62. Graham GW, Aitken DA, Connor JM. Prenatal diagnosis by enzyme analysis in 15 pregnancies at risk for the Lesch-Nyhan syndrome. *Prenat Diagn.* 1996;16(7):647-651. doi:10.1002/(SICI)1097-0223(199607)16:7<647::AID-PD932>3.0.CO;2-S

63. Ceballos-Picot I, Le Dantec A, Brassier A, et al. New biomarkers for early diagnosis of Lesch-Nyhan disease revealed by metabolic analysis on a large cohort of patients. *Orphanet J Rare Dis.* 2015;10:7. doi:10.1186/s13023-014-0219-0
64. Neychev VK, Jinnah HA. Sudden death in Lesch-Nyhan disease. *Dev Med Child Neurol.* 2006;48(11):923-926. doi:10.1017/S0012162206002015
65. Torres RJ, Prior C, Puig JG. Efficacy and safety of allopurinol in patients with hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase deficiency. *Metabolism.* 2007;56(9):1179-1186. doi:10.1016/j.metabol.2007.04.013
66. Brock WA, Golden J, Kaplan GW. Xanthine calculi in the Lesch-Nyhan syndrome. *J Urol.* 1983;130(1):157-159. doi:10.1016/s0022-5347(17)51011-3
67. Takano Y, Hase-Aoki K, Horiuchi H, et al. Selectivity of febuxostat, a novel non-purine inhibitor of xanthine oxidase/xanthine dehydrogenase. *Life Sci.* 2005;76(16):1835-1847. doi:10.1016/j.lfs.2004.10.031
68. Becker MA, Schumacher HR, Wortmann RL, et al. Febuxostat compared with allopurinol in patients with hyperuricemia and gout. *N Engl J Med.* 2005;353(23):2450-2461. doi:10.1056/NEJMoa050373
69. Oh MM, Ham BK, Kang SH, et al. Urine alkalinization may be enough for the treatment of bilateral renal pelvis stones associated with Lesch-Nyhan syndrome. *Urol Res.* 2011;39(5):417-419. doi:10.1007/s00240-011-0364-z
70. Visser JE, Schretlen DJ, Bloem BR, Jinnah HA. Levodopa is not a useful treatment for Lesch-Nyhan disease. *Mov Disord.* 2011;26(4):746-749. doi:10.1002/mds.23478
71. Breese GR, Baumeister AA, McCown TJ, et al. Behavioral differences between neonatal and adult 6-hydroxydopamine-treated rats to dopamine agonists: relevance to neurological symptoms in clinical syndromes with reduced brain dopamine. *J Pharmacol Exp Ther.* 1984;231(2):343-354. doi:10.1016/S0022-3565(25)21630-5
72. Visser JE, Chorin O, Jinnah HA. Very Early Levodopa May Prevent Self-Injury in Lesch-Nyhan Disease. *Pediatr Neurol.* 2024;155:156-159. doi:10.1016/j.pediatrneurol.2024.03.020
73. McManaman J, Tam DA. Gabapentin for self-injurious behavior in Lesch-Nyhan syndrome. *Pediatr Neurol.* 1999;20(5):381-382. doi:10.1016/s0887-8994(98)00166-0
74. 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(9):636-639.
75. Dolcetta D, Parmigiani P, Salmaso L, et al. Quantitative Evaluation of the Clinical Effects of S-Adenosylmethionine on Mood and Behavior in Lesch-Nyhan Patients.

Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2013;32(4):174-188.
doi:10.1080/15257770.2013.774012

76. Momosaki K, Kido J, Matsumoto S, et al. The Effect of S-Adenosylmethionine Treatment on Neurobehavioral Phenotypes in Lesch-Nyhan Disease: A Case Report. *Case Rep Neurol*. 2019;11(3):256-264. doi:10.1159/000502568
77. 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):414-416.
doi:10.3171/jns.2003.98.2.0414
78. Deon LL, Kalichman MA, Booth CL, Slavin KV, Gaebler-Spira DJ. Pallidal deep-brain stimulation associated with complete remission of self-injurious behaviors in a patient with Lesch-Nyhan syndrome: a case report. *J Child Neurol*. 2012;27(1):117-120. doi:10.1177/0883073811415853
79. 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):118-122. doi:10.1111/ner.12261
80. Pozzi M, Piccinini L, Gallo M, Motta F, Radice S, Clementi E. Treatment of motor and behavioural symptoms in three Lesch-Nyhan patients with intrathecal baclofen. *Orphanet J Rare Dis*. 2014;9(1):208. doi:10.1186/s13023-014-0208-3
81. Satow T, Ogawa M, Komuro T. Intrathecal baclofen therapy for Lesch-Nyhan disease: illustrative case. *J Neurosurg Case Lessons*. 2021;1(1). doi:10.3171/CASE202
82. Allen SM, Rice SN. Risperidone antagonism of self-mutilation in a Lesch-Nyhan patient. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 1996;20(5):793-800.
doi:10.1016/0278-5846(96)00059-0
83. Allen SM, Freeman JN, Davis WM. Evaluation of risperidone in the neonatal 6-hydroxydopamine model of Lesch-Nyhan syndrome. *Pharmacol Biochem Behav*. 1998;59(2):327-330. doi:10.1016/s0091-3057(97)00411-5
84. Olson L, Houlihan D. A review of behavioral treatments used for Lesch-Nyhan syndrome. *Behav Modif*. 2000;24(2):202-222. doi:10.1177/0145445500242003
85. Cusumano FJ, Penna KJ, Panossian G. Prevention of self-mutilation in patients with Lesch-Nyhan syndrome: review of literature. *ASDC J Dent Child*. 2001;68(3):175-178.
86. Ragazzini G, Delucchi A, Calcagno E, Servetto R, Denotti G. A Modified Intraoral Resin Mouthguard to Prevent Self-Mutilations in Lesch-Nyhan Patients. *Int J Dent*. 2014;2014:396830. doi:10.1155/2014/396830

87. Goodman EM, Torres RJ, Puig JG, Jinnah HA. Consequences of Delayed Dental Extraction in Lesch-Nyhan Disease. *Mov Disord Clin Pract*. 2014;1(3):225-229. doi:10.1002/mdc3.12040
88. Hasin Y, Seldin M, Lusi A. Multi-omics approaches to disease. *Genome Biol*. 2017;18(1):83. doi:10.1186/s13059-017-1215-1
89. Cervesato A, Raucci R, Buononato D, et al. Application of proteomics and metabolomics to study inherited kidney disorders: from big data to precision medicine. *G Ital Nefrol*. 2020;37(6).
90. Dar MA, Arafah A, Bhat KA, et al. Multiomics technologies: role in disease biomarker discoveries and therapeutics. *Brief Funct Genomics*. 2023;22(2):76-96. doi:10.1093/bfgp/elac017
91. Cavalli-Sforza LL. The Human Genome Diversity Project: past, present and future. *Nat Rev Genet*. 2005;6(4):333-340. doi:10.1038/nrg1596
92. Ragoussis J. Genotyping technologies for genetic research. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2009;10:117-133. doi:10.1146/annurev-genom-082908-150116
93. Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent JM. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet*. 1999;21(1 Suppl):10-14. doi:10.1038/4434
94. Ozsolak F, Milos PM. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. *Nat Rev Genet*. 2011;12(2):87-98. doi:10.1038/nrg2934
95. Carvunis AR, Roth FP, Calderwood MA, Cusick ME, Superti-Furga G, Vidal M. Interactome Networks. In: *Handbook of Systems Biology*. Elsevier; 2013:45-63. doi:10.1016/B978-0-12-385944-0.00003-4
96. Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*. 2003;422(6928):198-207. doi:10.1038/nature01511
97. Yates JR, Eng JK, McCormack AL, Schieltz D. Method to correlate tandem mass spectra of modified peptides to amino acid sequences in the protein database. *Anal Chem*. 1995;67(8):1426-1436. doi:10.1021/ac00104a020
98. Bujak R, Struck-Lewicka W, Markuszewski MJ, Kaliszan R. Metabolomics for laboratory diagnostics. *J Pharm Biomed Anal*. 2015;113:108-120. doi:10.1016/j.jpba.2014.12.017
99. Kettunen J, Tukiainen T, Sarin AP, et al. Genome-wide association study identifies multiple loci influencing human serum metabolite levels. *Nat Genet*. 2012;44(3):269-276. doi:10.1038/ng.1073
100. Roberts LD, Souza AL, Gerszten RE, Clish CB. Targeted metabolomics. *Curr Protoc Mol Biol*. 2012;Chapter 30:Unit 30.2.1-24. doi:10.1002/0471142727.mb3002s98

101. Jang C, Chen L, Rabinowitz JD. Metabolomics and Isotope Tracing. *Cell*. 2018;173(4):822-837. doi:10.1016/j.cell.2018.03.055
102. Yin P, Peter A, Franken H, et al. Preanalytical aspects and sample quality assessment in metabolomics studies of human blood. *Clin Chem*. 2013;59(5):833-845. doi:10.1373/clinchem.2012.199257
103. Wollenberger A, Ristau O, Schoffa G. Eine einfache Technik der extrem schnellen Abkühlung größerer Gewebestücke. *Pflüg Arch Für Gesamte Physiol Menschen Tiere*. 1960;270(4):399-412. doi:10.1007/BF00362995
104. Furlani IL, da Cruz Nunes E, Canuto GAB, Macedo AN, Oliveira RV. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry for Clinical Metabolomics: An Overview. *Adv Exp Med Biol*. 2021;1336:179-213. doi:10.1007/978-3-030-77252-9_10
105. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*. 1989;246(4926):64-71. doi:10.1126/science.2675315
106. Zubarev RA, Makarov A. Orbitrap mass spectrometry. *Anal Chem*. 2013;85(11):5288-5296. doi:10.1021/ac4001223
107. Smith CA, Want EJ, O'Maille G, Abagyan R, Siuzdak G. XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Anal Chem*. 2006;78(3):779-787. doi:10.1021/ac051437y
108. Tschirner SK, Bähre H, Kaefer A, Schneider EH, Seifert R, Kaefer V. Non-targeted metabolomics by high resolution mass spectrometry in HPRT knockout mice. *Life Sci*. 2016;156:68-73. doi:10.1016/j.lfs.2016.05.031
109. Barra GB, Santa Rita TH, Vasques J de A, Chianca CF, Nery LFA, Costa SSS. EDTA-mediated inhibition of DNases protects circulating cell-free DNA from *ex vivo* degradation in blood samples. *Clin Biochem*. 2015;48(15):976-981. doi:10.1016/j.clinbiochem.2015.02.014
110. Luo X, Li L. Effects of Solvent Evaporation Methods and Short-Term Room Temperature Storage on High-Coverage Cellular Metabolome Analysis. *Metabolites*. 2023;13(10):1052. doi:10.3390/metabo13101052
111. Muehlbauer LK, Jen A, Zhu Y, et al. Rapid multi-omics sample preparation for mass spectrometry. *Anal Chem*. 2023;95(2):659-667. doi:10.1021/acs.analchem.2c02042
112. Tsugawa H, Cajka T, Kind T, et al. MS-DIAL: data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis. *Nat Methods*. 2015;12(6):523-526. doi:10.1038/nmeth.3393

113. Tyanova S, Temu T, Sinitcyn P, et al. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat Methods*. 2016;13(9):731-740. doi:10.1038/nmeth.3901
114. Lai Z, Tsugawa H, Wohlgemuth G, et al. Identifying metabolites by integrating metabolome databases with mass spectrometry cheminformatics. *Nat Methods*. 2018;15(1):53-56. doi:10.1038/nmeth.4512
115. Cakmakli HF, Torres RJ, Menendez A, et al. Macrocytic anemia in Lesch-Nyhan disease and its variants. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet*. 2019;21(2):353-360. doi:10.1038/s41436-018-0053-1
116. Thomas A, Vogel M, Piper T, et al. Quantification of AICAR-ribotide concentrations in red blood cells by means of LC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem*. 2013;405(30):9703-9709. doi:10.1007/s00216-013-7162-0
117. Wong JKY, Kwok WH, Chan GHM, et al. Doping control study of AICAR in post-race urine and plasma samples from horses. *Drug Test Anal*. 2017;9(9):1363-1371. doi:10.1002/dta.2205
118. Tang S, Thiruma VA, Roy GC, et al. Neuroprotective actions of a histidine analogue in models of ischemic stroke. Published online 2007. Accessed June 15, 2025. https://iris.cnr.it/handle/20.500.14243/146127?utm_source=chatgpt.com
119. Histidine provides long-term neuroprotection after cerebral ischemia through promoting astrocyte migration - PMC. Accessed June 15, 2025. https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4611873/?utm_source=chatgpt.com
120. Van Loon GR. Plasma dopamine: regulation and significance. *Fed Proc*. 1983;42(13):3012-3018.
121. Tomei G, Capozzella A, Ciarrocca M, et al. Plasma dopamine in workers exposed to urban stressor. Published online 2007. doi:10.1177/0748233707080043
122. Luo S, Zhao J, Zheng Y, Chen T, Wang Z. Biosynthesis of Nicotinamide Mononucleotide: Current Metabolic Engineering Strategies, Challenges, and Prospects. *Fermentation*. 2023;9(7):594. doi:10.3390/fermentation9070594
123. Rassin DK, Lloyd KG, Kelley WN, Fox I. Decreased amino acids in various brain areas of patients with Lesch-Nyhan syndrome. *Neuropediatrics*. 1982;13(3):130-134. doi:10.1055/s-2008-1059611
124. Angus Harkness R. 50 Lesch-Nyhan Syndrome: Reduced Amino Acid Concentrations in Csf and Brain. *Pediatr Res*. 1988;24(1):119-119. doi:10.1203/00006450-198807000-00074
125. Thompson GN, Pacy PJ, Watts RW, Halliday D. Protein metabolism in phenylketonuria and Lesch-Nyhan syndrome. *Pediatr Res*. 1990;28(3):240-246. doi:10.1203/00006450-199009000-00019

126. Vinokurov AY, Soldatov VO, Seregina ES, et al. HPRT1 Deficiency Induces Alteration of Mitochondrial Energy Metabolism in the Brain. *Mol Neurobiol.* 2023;60(6):3147-3157. doi:10.1007/s12035-023-03266-2
127. Wajner M, Amaral AU. Mitochondrial dysfunction in fatty acid oxidation disorders: insights from human and animal studies. *Biosci Rep.* 2015;36(1):e00281. doi:10.1042/BSR20150240
128. Reisz JA, Dzieciatkowska M, Stephenson D, Gamboni F, Morton DH, D'Alessandro A. Red Blood Cells from Individuals with Lesch–Nyhan Syndrome: Multi-Omics Insights into a Novel S162N Mutation Causing Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase Deficiency. *Antioxidants.* 2023;12(9):1699. doi:10.3390/antiox12091699
129. Yilmaz A, Ashrafi N, Ashrafi R, et al. Lipid profiling of Parkinson's disease brain highlights disruption in Lysophosphatidylcholines, and triacylglycerol metabolism. *Npj Park Dis.* 2025;11(1):1-9. doi:10.1038/s41531-025-01023-x
130. Semba RD. Perspective: The Potential Role of Circulating Lysophosphatidylcholine in Neuroprotection against Alzheimer Disease. *Adv Nutr.* 2020;11(4):760-772. doi:10.1093/advances/nmaa024
131. Whiley L, Sen A, Heaton J, et al. Evidence of altered phosphatidylcholine metabolism in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2014;35(2):271-278. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2013.08.001

RINGRAZIAMENTI

Giunta al termine di questo percorso, desidero esprimere la mia più sincera gratitudine a tutte le persone che, con il loro sostegno e la loro presenza, hanno contribuito alla mia crescita accademica e personale, rendendo possibile il raggiungimento di un traguardo per me molto importante.

I primi ringraziamenti vanno ai miei relatori e correlatori, il cui supporto, guida e disponibilità sono stati fondamentali per la realizzazione di questo elaborato. In particolare, desidero ringraziare il Prof. Maghnie, per aver accolto con grande interesse il progetto e avermi dato la sua fiducia nel portarlo a termine.

Un ringraziamento speciale va alla Dott.ssa Madeo e al Dott. La Rosa, che hanno creduto in me senza esitazione, affidandomi questo difficile lavoro. Annalisa e Alessandro, vi ringrazio per avermi introdotta ad un mondo nuovo, per avermi guidata con pazienza e soprattutto per avermi trasmesso la passione e l'entusiasmo che mettete ogni giorno in tutto quello che fate. Grazie a voi, oggi ho una visione più chiara del medico e della persona che voglio diventare.

Ringrazio anche il Dott. Gandullia, responsabile della UOC di Gastroenterologia e Endoscopia Digestiva, per avermi accolta nel suo reparto in questi ultimi due anni e per avermi sempre fatta sentire parte del gruppo, coinvolgendomi nelle diverse attività.

Ci tengo, inoltre, a ringraziare l'Associazione LND Famiglie Italiane ONLUS, per aver sostenuto questo progetto e per il costante impegno a favore dei ragazzi affetti da Lesch-Nyhan e delle loro famiglie.

Infine, il mio ringraziamento va all'Istituto Giannina Gaslini, che in questi anni ha rafforzato la volontà di continuare su una strada che sento sempre più mia. Ringrazio tutto il suo personale: medici, specializzandi, infermieri, OSS, tecnici del laboratorio centrale e personale del core facilities, e tutti coloro che, con un sorriso e una parola gentile, hanno contribuito a rendere concretamente realizzabile un lavoro che all'inizio mi sembrava troppo grande. A tutti voi, il mio più sincero GRAZIE.