
Hiperoxaluria primaria: una nueva mutación en el gen *AGXT* (*r197q*) causante de convulsiones neonatales.

José Guevara-Campos¹, Débora Riverol², Lucía González-Guevara³ y Rubén Tinedo¹.

¹Servicio de Pediatría, Hospital Felipe Guevara Rojas, Universidad de Oriente, El Tigre, Venezuela, ²Unidad de Investigación, Hospital Universitario de Canarias, España y

³Unidad de Epilepsia y Electroencefalografía, Centro Clínico “Esperanza Paraco”, El Tigre, Venezuela.

Palabras clave: Aciduria, *AGXT*, convulsiones, Hiperoxaluria primaria, mutación, piridoxina.

Resumen. La hiperoxaluria primaria es un error innato congénito del metabolismo de los aminoácidos que se transmite como rasgo autosómico recesivo. Existen dos tipos de hiperoxaluria: la primaria tipo I, que corresponde al déficit enzimático peroxisomal de la alanina glioxilato aminotransferasa en el hígado (*AGT*) y la tipo II al déficit de la glioxilato reductasa-hidroxi piruvato reductasa (*GRHPR*). La más frecuente es la tipo I (*AGT*). Se describe una lactante menor de un mes de edad, que a partir del primer día post nacimiento, presentaba crisis mioclónicas, espasmos tónicos tanto en vigilia como durante el sueño, que se hicieron más frecuentes y no respondían al uso de anticonvulsivantes. El electroencefalograma ictal presentó una actividad intermitente de puntas y puntas ondas de alto voltaje en el hemisferio derecho. A los ocho minutos posteriores a la administración de 150 mg endovenoso de piridoxina se observó tanto una disminución de la actividad epiléptica, así como de las manifestaciones clínicas. La determinación de los ácidos orgánicos en orina reveló un aumento en los niveles del ácido oxálico (3064 mmol/mol de creatinina). El estudio genético molecular del gen *AGXT*, mostró la existencia de una mutación R197Q, en el exón 5 de la paciente y del padre. Recibió tratamiento con piridoxina a la dosis de 50 mg/día. A los tres meses de edad, se logró una normalidad electroencefalográfica y bioquímica. Aunque es una causa rara de convulsiones neonatales, la hiperoxaluria, debido a nuevas mutaciones es una enfermedad subdiagnosticada por neonatólogos y pediatras.

Primary hiperoxaluria: a new mutation in gen AGXT (R197Q) cause of neonatal convulsions.

Invest Clin 2008; 49(4): 553 - 560

Key words: Aciduria, AGXT, convulsions, primary hyperoxaluria, mutation, pyridoxine.

Abstract. Primary hyperoxaluria is a congenital innate error of the metabolism of the amino acids, that is transmitted like an autosomal recessive character. Two types of hyperoxaluria exist: the primary type I, that corresponds to the peroxisomal enzymatic deficit of the alanine glyoxylate aminotransferase in the liver (AGT) and type II, due to the deficit of the glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase deficiency (GRHPR). The primary type I (AGT) is the most frequently. We report the case of a female infant of one month of age, that on her first day post birth, presented myoclonic convulsions and tonic spasms, both during wakefulness and sleep periods, that became more frequent and did not respond to the use of anti-convulsants. The ictal Electroencephalogram presented an intermittent activity of spikes and spike-waves of high voltage in the right hemisphere. Eight minutes after the intravenous administration of 150 mg of pyridoxine, it was observed a diminution of the epileptic activity, as well as the clinical manifestations. The determination of organic acids in urine revealed an increase in the concentration levels of oxalic acid (3064 mmol/mol of creatinine). The molecular genetic study of the *AGXT* gene, showed the existence of a R197Q mutation in exón 5 of the patient and her father. She received treatment with pyridoxine at a dose of 50 mg/day. When she reached the age of three months both a normal electroencephalogram and biochemistry were obtained. Although it is a rare cause of neonatal convulsions, hyperoxaluria, due to new mutations is an underdiagnosed disease by neonatologists and paediatricians.

Recibido: 04-07-2007. Aceptado: 13-03-2008.

INTRODUCCIÓN

La hiperoxaluria primaria es un error innato congénito del metabolismo de herencia autosómica recesiva, con una incidencia aproximada de un caso por cada millón de recién nacidos vivos (1, 2).

Se debe al déficit de una enzima peroxisomal hepática. La hiperoxaluria primaria más frecuente es la tipo I, debido a la mutación en el gen *AGXT* de la enzima alanina-glioxilato aminotrasferasa, enzima que metaboliza glioxilato para convertirlo

en glicina, el gen está localizado en el extremo del brazo largo del cromosoma 2-2q37) (3- 5).

Las mutaciones más frecuentes son la G170R Gly170 Arg, producto de un cambio G>A en el exón 4 responsable de una localización predominante de la AGT en mitocondria en vez del peroxisoma (6), detectado en un 33% de la población mundial y la mutación I244T Ile244Thr, producto de un cambio T > C en el exón 7 con un 9% de los alelos patológicos en el mundo.

La hiperoxaluria tipo II (7) es la menos frecuente debida a mutaciones en el gen *GRHPR* (de glioxilato reductasa-hidroxi piruvato reductasa) localizado en el cromosoma 9 (8, 9).

En ambas circunstancias se produce un exceso de oxalato, el cual se elimina por la vía renal, formando cristales que se depositan en diversos tejidos, tales como corazón, paredes de vasos sanguíneos, huesos, retina, y tracto urogenital (10).

Puede presentarse con diferentes manifestaciones clínicas, un retraso en el crecimiento, infecciones del tracto urinario, uremia, insuficiencia renal, radiológicamente con nefrocalcinosis y litiasis renal (11, 12).

La gran variabilidad clínica de la hiperoxaluria, no se correlaciona bien con las mutaciones del gen *AGXT* o con el grado de actividad enzimática residual (13, 14). La severidad de la enfermedad es muy variable, con una variante maligna infantil que progresa a insuficiencia renal en un periodo de meses después del nacimiento (12), mientras que se han descritos casos de familiares asintomáticos a pesar de poseer las mismas mutaciones (5, 13).

Los niveles elevados de oxalato en orina es la base del diagnóstico clínico, además, el estudio genético molecular del gen *AGXT* para localizar el defecto enzimático y la biopsia hepática para el estudio de la actividad de la enzima.

Los tratamientos disponibles no suelen ser satisfactorios. Hace años se propuso por primera vez la administración de dosis farmacológicas de piridoxina a pacientes con hiperoxaluria primaria tipo I (15) basándose en que la enzima AGT utiliza piridoxal fosfato como cofactor.

El efecto beneficioso de la administración prolongada de piridoxina, como parte de un tratamiento no quirúrgico de la enfermedad esta bien documentado (16) pero se muestra eficaz en un tercio de los pacientes tratados, se piensa que el mecanis-

mo de acción de la piridoxina esta relacionado con favorecer el plegamiento correcto de algunas formas mutadas del gen *AGXT*.

El objetivo de este trabajo es hacer la presentación de un caso raro de hiperoxaluria debido a una nueva mutación en el gen *AGXT*, en una lactante venezolana que se acompañaba de convulsiones neonatales.

CASO CLÍNICO

Lactante menor femenino de 32 días de edad, que inició su enfermedad al día siguiente de su nacimiento, la madre le notó "sacudidas", tipo mioclonías en miembros superiores e inferiores, de carácter cambiantes en forma erráticas, de breve duración. Estos episodios se repitieron varias veces día y ocurrían durante el sueño. A partir de los 22 días de edad, las mioclonías fueron mas frecuentes y de mayor intensidad, manteniendo su carácter errático y aparecieron los espasmos tónicos generalizados de breve duración, tanto en vigilia como en sueño, que no mejoraban con la administración de ácido valproico a las dosis de 15 mg/kg /día, administrado en dos dosis, con intervalo de doce horas.

Producto de segunda gestación de unión no consanguínea. Embarazo controlado sin problemas, la madre refirió movimientos raros durante el embarazo tipo "sacudidas". Parto por cesárea. Respiró y lloró espontáneamente al nacer. Peso 2.670g. Adecuado para su edad gestacional. (Percentil 25-50). Talla 49 cm (Percentil 75). Su alimentación fue exclusivamente lactancia materna. Sin antecedentes familiares de epilepsia, migraña, enfermedades neurológicas, ni litiasis renal.

Al examen físico:

Peso: 3.500 g (percentil 25). Talla: 49cm (-2DE). Circunferencia cefálica: 34,5 cm (percentil 25).

Aparentes buenas condiciones generales, no se apreciaron rasgos dismórficos, ni

estigmas cutáneos. Normocéfalo. Pares craneales normales. Pupilas isocóricas normoreactivas. Reflejos osteotendinosos normales en miembros superiores e inferiores. Sistema cardiopulmonar normal. No se detectaron visceromegalias.

Los exámenes de laboratorio realizados arrojaron los siguientes resultados: Hb 11,4 g/dL; Hto: 36%. Leucocitos: 6.170/mm³ con 64% de neutrófilos y 35% de linfocitos. Glucemia: 75 mg/dL. Pruebas de funcionalismo renal y hepático dentro de los límites normales. La concentración de electrolitos séricos fue: Sodio, 135 mEq/L; Potasio 5, mEq/L; Cloro, 110 mEq/L. El pH sanguíneo fue 7,32; la concentración de bicarbonato (HCO₃) fue de 13,9 mEq/L; la del anión Gap, 16,1 mEq/L.

La radiografía de tórax fue normal. La resonancia magnética cerebral (RNM) realizada antes de administrar piridoxina no reveló alteraciones.

En el electroencefalograma (EEG) ictal se apreció una actividad intermitente de punta y punta ondas de alto voltaje en el hemisferio derecho, se procedió a la administración endovenosa de 150 mg de piridoxina (Vitamina B6), a los ocho minutos posteriores a esta administración disminuyó la actividad convulsiva mioclónica y se hizo menos frecuente la actividad epiléptica en el encefalograma.

Se instauró tratamiento a base de piridoxina a una dosis de 50 mg/día. Previamente se tomaron muestra de sangre y orina para estudios metabólicos, con los siguientes resultados: Aminoácidos en sangre y orina normales. Test de Biotinidasa positivo. Test de Cistina-Homocisteina: negativo. T3 y T4 dentro de límites normales. La determinación de ácidos orgánicos en orina, mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas, detectó una elevación de ácido oxálico: 3064 mmol/mol de creatinina (VN: menos de 19 mmol/mol de creatinina).

El estudio de ultrasonográfico renal no mostró calcificaciones, ni aumento de la densidad parenquimatosa.

Se procedió al estudio genético molecular del gen *AGXT* (alanina glioxilato aminotransferasa), el gen de la hiperoxaluria primaria tipo I, localizado en el extremo del brazo largo del cromosoma 2-2q37, en la paciente, madre, padre y hermano, mediante el procedimiento de amplificación por PCR (Polimerase Chain Reaction) de la región de interés.

El rastreo de las mutaciones en el gen *AGXT* se realizó mediante la técnica SSCP (Single Strand Conformacional Polymorphisms). Los cambios encontrados en los patrones de migración fueron en los exones 5, 9, 10 y 11.

Se realizó secuenciación directa de estos exones con los siguientes resultados: *AGXT* e5F m902 GCA > GTA A186V, *AGXT* e 5F m 902 CGG > CAG R197Q, *AGXT* e9 F m902 rs 13408961 T295A, *AGXT* e 10R m 902 rs4426527 M340I, *AGXT* e 11F m902 AGG > AAG R381K.

No se encontraron las mutaciones más frecuentes relacionadas con la hiperoxaluria primaria tipo I (I244T y la G170R) (Fig. 1).

Se observaron varios cambios en la secuencia de la paciente compartidos con su padre, en el haplotipo minor (Tabla I).

Los cambios encontrados que se consideraron como un polimorfismo, fueron A186V, rs13480961 y rs4426527, que no tienen consecuencias patológicas.

Otros dos cambios R197Q y R381K, no están descritos como polimorfismos y teóricamente tendrían potencial patogénico. Estos dos cambios fueron descartados como polimorfismos frecuentes, al no estar presentes en 120 muestras de ADN del banco de sangre.

En las Figs. 2 y 3 observamos los resultados de secuenciación del *AGXT* de la paciente.

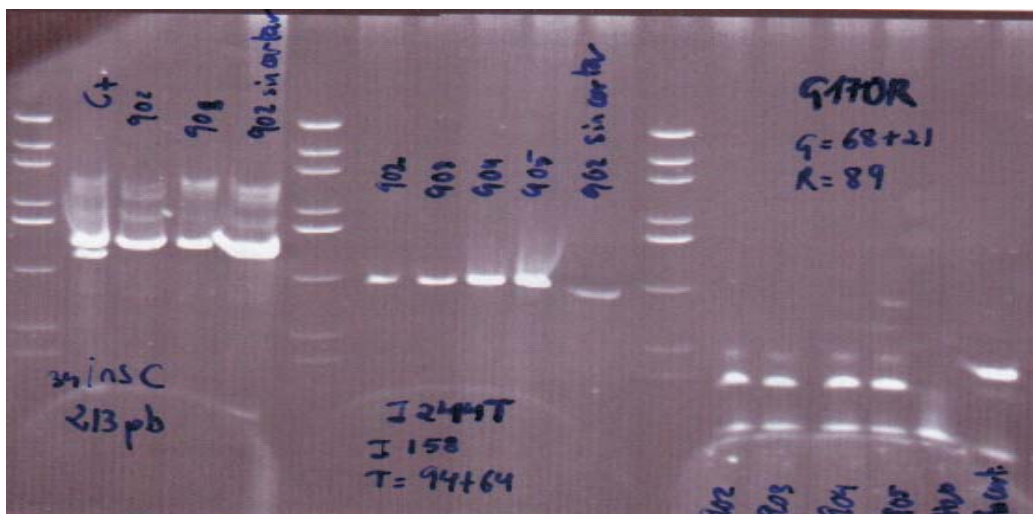


Fig. 1. Las muestras estudiadas no presentaron ninguna de las mutaciones mas frecuentes.

TABLA I
CAMBIOS EN LA SECUENCIA DE LA PACIENTE Y SU PADRE

Muestra	Exón5	Exón9	Exón 10	Exón11
902 paciente	GCA>GTA A186V CGG>CAG R197Q	rs13408961 T295A	rs4426527 M340I	AGG>AAG R381K
904 padre	GCA>GTA A186V CGG>CAG R197Q	rs13408961 T295A	rs4426527 M340I	AGG>AAG R381K

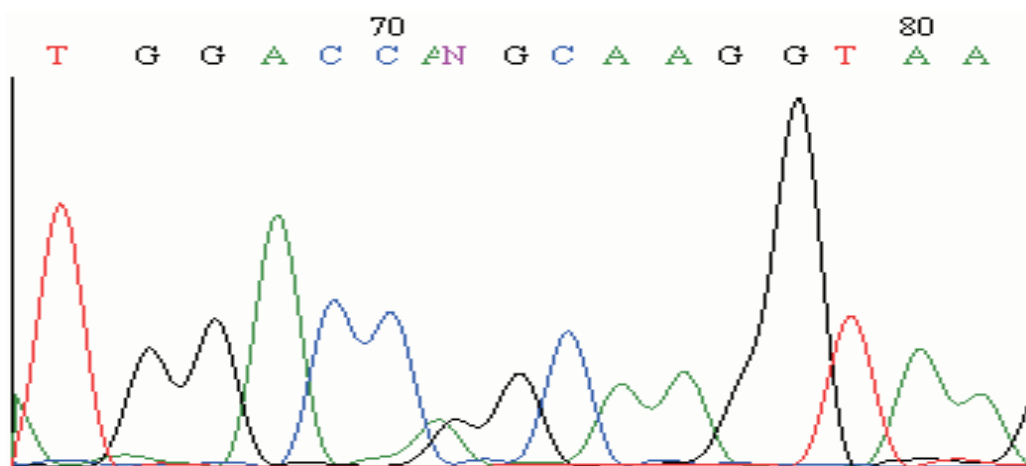


Fig. 2. Resultado de secuenciación AGXT e5F m902 CCG>CAG R197 Q.

Mediante expresión en *Escherichia coli*, se intentó evaluar las consecuencias funcionales de los cambios R197Q y R381K que no afectaron significativamente la actividad enzimática de la proteína.

Se consideró a la variante R197Q como la patológica, responsable de las manifestaciones clínicas de la paciente.

Actualmente la paciente se encuentra asintomática sin convulsiones y desarrollo

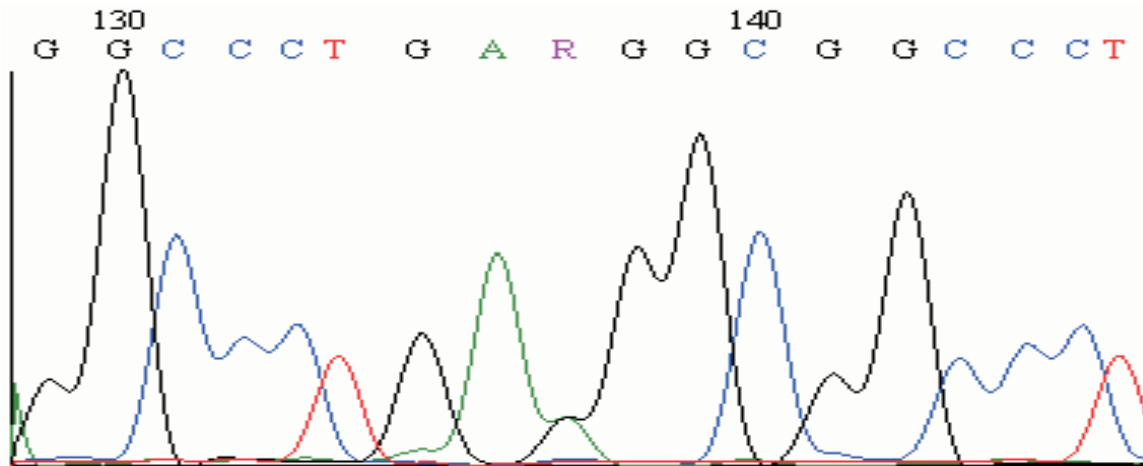


Fig. 3. Resultado de secuenciación AGXT c11F m902 AGG>AAG R381K.

psicomotor adecuada para su edad. Recibe 100 mg diarios de piridoxina. Los estudios encefalográficos realizados posteriormente revelaron una normalidad de la actividad eléctrica cerebral. La cuantificación de los niveles de ácido oxálico en orina descendieron a los niveles dentro de límites normales.

DISCUSIÓN

La hiperoxaluria primaria tipo 1, es un trastorno infrecuentemente diagnosticado en la infancia, pero más raro es la presencia de hiperoxaluria con crisis convulsivas neonatales. En nuestro conocimiento este es el primer caso reportado de hiperoxaluria con crisis convulsivas neonatales.

Cochat y col (2) describieron en 78 infantes como sintomatología inicial de la hiperoxaluria, fallas para el crecimiento en el 22% de los casos, infecciones del tracto urinario en el 21% y uremia en el 14%.

Patwardhan y Higgins describieron un recién nacido de cinco horas de edad, con hiperoxaluria, hipotonía, cianosis, taquipnea y taquicardia inexplicables (11).

La existencia de convulsiones en un recién nacido, obliga a descartar una encefalopatía hipóxica-isquémica. En nuestro caso no existían antecedentes perinatales que

permitieran sospechar de su existencia y la RNM cerebral no era compatible con ese diagnóstico, al no mostrar los signos característicos de este proceso. Tampoco se pudo demostrar la existencia de hipoglucemia, ni de trastorno electrolítico al encontrarse dentro de los límites normales los valores de glicemia, sodio, potasio, calcio y magnesio.

La paciente presentó al inicio de la enfermedad crisis convulsivas mioclónicas erráticas, que no mejoraron con el tratamiento anticonvulsivo, lo cual obligó a descartar la existencia de un error innato del metabolismo, el cual se puede presentar exclusivamente con convulsiones durante el período neonatal. La actividad epiléptica en el encefalograma, que mejoró con la administración de vitamina B6, orientó el diagnóstico hacia una dependencia de piridoxina, hacia un defecto que tendría como cofactor a la piridoxina en su vía metabólica ó algún efecto beneficioso en la epilepsia intractable como ha sido reportado por otros autores (17).

Las convulsiones en la dependencia a piridoxina son debido probablemente a un defecto en la síntesis del neurotransmisor, el ácido gammaaminobutírico (GABA) resultante de una anomalía innata en la unión del fosfato de piridoxal a la enzima

descarboxilasa del ácido glutámico (GAD-65) (18).

Los trastornos innatos del metabolismo de los aminoácidos y de los ácidos orgánicos en orina fueron descartados, salvo por la elevación del ácido oxálico a niveles de 3064 mmol/mol creatinina, que, sin elevación del ácido glicérico, nos permitió afirmar que se trataba de una hiperoxaluria primaria 1, en la cual la enzima alanin glioxalato aminotransferasa, utiliza como cofactor a la vitamina B6, para transformar el glioxalato en glicina, evitando la producción aumentada de oxalato. El mecanismo de acción de la piridoxina en la hiperoxaluria probablemente esté relacionado con favorecer el plegamiento correcto de algunas formas mutadas de AGXT (3).

El análisis molecular del gen AGXT, ha logrado identificar numerosas mutaciones responsables de la enfermedad, así como varios marcadores polimórficos, de utilidad en el diagnóstico de la hiperoxaluria primaria (19).

El resultado que la mutación R197Q no haya afectado significativamente la actividad enzimática mediante expresión *E. coli* no descarta que la mutación no sea patogénica, ya que hay precedentes de mutaciones patogénicas en este gen (ej. G170R), que expresadas en *Escherichia coli* no dan cambios muy importantes, pero si en células de mamífero (efecto sobre el tráfico intracelular, distribución subcelular) (3).

Diecisiete mutaciones en el gen AGXT y cinco sitios polimórficos intragénicos han sido identificadas (20), ninguno relacionado con convulsiones neonatales.

La falta de correlación genotipo-fenotipo probablemente es indicativa del efecto de genes modificadores y /o factores ambientales en el desarrollo de la enfermedad (3).

Aunque no se pudo demostrar mutaciones en el alelo materno, sin embargo esto podría explicarse debido probablemente a las mutaciones en zonas no codifican-

tes, como el promotor del gen, como ha sido reportado en casos publicados de pacientes afectados por una hiperoxaluria, donde no se ha podido identificar los alelos patológicos por medio de la secuenciación de los exones del gen AGXT (3).

El mecanismo por el cual se desencadenan las convulsiones neonatales, puede explicarse por el efecto neurotóxico del ácido glicólico en el sistema nervioso central. La glicina es un neurotransmisor inhibitorio, mientras que el ácido glioxílico y el ácido glicólico son considerados neurotóxicos (21, 22).

La hiperoxaluria debe ser considerada como una causa de convulsiones en un neonato afectado de las mismas y que nuevas mutaciones, aunque raras, pueden ser la causa de la hiperoxaluria primaria (23).

AGRADECIMIENTO

Nuestro agradecimiento Al Dr. Eduardo Salido, de la Unidad de Investigación del HUC, Canarias-España, por el procesamiento de las muestras y por el apoyo en la revisión del texto, sin los cuales no hubiera sido posible este trabajo.

REFERENCIAS

1. **Danpure CJ.** Primary hiperoxaluria. In: Metabolic and Molecular bases of inherited disease. Scriver CR y cols. (eds). New York: Mac Graw-Hill; 2001.p.3323-3367.
2. **Cochat P, Deloraine A, Rotily M, Olive F, Liponski I, Deries N.** Epidemiology of primary hiperoxaluria type I. *Nephrol Dial Trasplant* 1995; 10:3-7.
3. **Santana A, Torres A, Salido E.** Patología molecular de la hiperoxaluria primaria. *Nefrología* 2003; 23:90-97.
4. **Purdue PE, Lumb MJ, Fox MN, Grifo G, Hamon-Benais C, Povey S, Danpure CJ.** Characterization and chromosomal mapping of a genomic clone encoding human alanine: glyoxylate aminotransferase. *Genomics* 1991; 10:34-42.

5. **Tarn AC, von Schnakenburg C, Rumsby G.** Primary hiperoxaluria type I: Diagnostic relevance of mutations and polymorphism in the alanine, glyoxylate aminotransferase gene (AGTX). *J Inher Metab Dis* 1997; 20: 689-696.
6. **Purdue PE, Allsop J, Isaya G, Rosaenberg LE, Danpure CJ.** Mistargeting of peroxisomal L-alanine: glyoxylate aminotransferase to mitochondrial in primary hyperoxaluria patients depends upon activation of a cryptic mitochondrial targeting sequence by point mutation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 8:10900-10904.
7. **Leumann E, Hoppe B.** The primary hyperoxalurias. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 1986-1993.
8. **Cramer SD, Ferree PM, Lin K, Milliner D, Holmes RP.** The gene encoding hydroxypyruvate reductase (GRHPR) is mutated in patients with primary hyperoxaluria type II. *Hum Mol Genet* 1999; 8:2063-2069.
9. **Rumsby G, Cregeen DP.** Identification and expression of a cDNA for human hydroxypyruvate/glyoxylate reductase. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1446:383-388.
10. **Neuhaus TS, Belzer T, Blau M, Hoppe B, Sidhu H, Leumann E.** Urinary oxalate excretion in urolithiasis and nephrocalcinosis. *Arch Dis Child* 2000; 82:322-326.
11. **Patwardhan A, Higgins C.** Primary hiperoxaluria type I: An Unprecedented presentation at birth. *Indian Pediatrics* 2005; 42:173-174.
12. **Cochat P, Noriega PC, Mahmoud MA, Jamieson NV, Scheinman JI, Rolland M O.** Primary hyperoxaluria in infants: medical, ethical, and economic issues. *JPediatr* 1999; 135:746-750.
13. **Hoppe B, Danpure CJ, Rumsby G, Fryer P, Jennings PR, Blau N, Schubiger G, Neuhaus T, Leumann E.** A vertical (pseudo-dominant) pattern of inheritance in the autosomal recessive disease primary hyperoxaluria type I: lack of relationship between genotype, enzymic phenotype and disease severity. *Am J Kidney Dis* 1997; 29:36-44.
14. **Danpure CJ, Jennings PR, Fryer P, Purdue PE, Allsop J.** Primary hyperoxaluria type I: Genotypic and phenotypic heterogeneity. *J Inher Metab Dis* 1994; 17:487-499.
15. **Gibbs DA, Watts RW.** The action of pyridoxine in primary hyperoxaluria. *Clin Sci* 1970; 38:277-286.
16. **Miliner DS, Eickholt JT, Bergstralh EJ, Wilson DM, Smith LH.** Results of long-term treatment with orthophosphate and pyridoxine in patients with primary hyperoxaluria. *N Engl J Med* 1994; 331: 1553-1558.
17. **Clayton P T.** B(6)-responsive disorders: A model of vitamin dependency. *J Inher Metab Dis* 2006; 29:317-326.
18. **Rajesh R, Girija AS.** Pyridoxine-dependent Seizures: A Review. *Indian Pediatr* 2003; 40:633-638.
19. **Lorenzo V, Torres A.** Diagnóstico y tratamiento de la hiperoxaluria primaria. *Nefrología* 1996; 16:119-127.
20. **Rinat CH, Wanders R, Drukker A, Halle D, Frishberg Y.** Primary hyperoxaluria type IA model for multiple mutations in a monogenic disease within a distinct ethnic group. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10:2352-2358.
21. **Mahul P, Molliex S, Auboyer C, Levigne F, Jospe R, Dumont A, Gilloz A.** Neurotoxic role of glycocholate and derivatives in transurethral resection of the prostate. *Ann Fr Anesth Reanim* 1993; 12:512-514.
22. **Perler C, Frey J, Auboyer C, Richard A, Autagnier G, Heritier P, Gilloz A.** Accumulation of glycolic Acid and glyoxylic acid in serum in cases of transient hyperglycinemia after transurethral surgery. *Clin Chem* 1988; 34:1471-1473.
23. **Williams EL, Kemper MJ, Rumsby G.** A de novo mutation in the AGXT gene causing primary hyperoxaluria type 1. *Am J Kidney Dis* 2006; 48:481-483.