



# Patología molecular de la hiperoxaluria primaria

A. Santana, A. Torres y E. Salido

Unidad de Investigación. Hospital Universitario de Canarias y Universidad de La Laguna. Fundación Reina Sofía de Investigaciones Nefrológicas.

## INTRODUCCIÓN

La hiperoxaluria primaria (HOP) consiste en la producción excesiva de oxalato por el hígado de pacientes con anomalías genéticas de enzimas del metabolismo del glioxilato (fig. 1) (ver revisiones recientes 1, 2 y 3). Existe la sospecha de que el diagnóstico de HOP se demora o no se realiza adecuadamente en todos los casos, y que esto justifica el que la enfermedad se considere menos frecuente de lo que es en realidad<sup>2</sup>. Estudios epidemiológicos en varios países europeos concluyen incidencias anuales de alrededor de uno en cada cien mil niños<sup>4,5</sup>, mientras que la cifra sugerida como prevalencia media de esta enfermedad es uno por millón de habitantes<sup>1</sup>. En esta revisión no trataremos las hiperoxalurias secundarias, que se deben a una absorción exagerada de oxalato por el intestino, o, más raramente, a excesos de oxalato en la dieta. La mayoría de las familias de HOP presentan un claro patrón «horizontal» de herencia autosómica recesiva, en la que los padres son portadores asintomáticos de mutaciones en alguno de los genes implicados, y aquellos hijos que heredan ambos alelos patológicos acaban desarrollando hiperoxaluria, usualmente en edades tempranas. El tipo más frecuente de HOP, tipo I, se debe a mutaciones en el gen *AGXT* (de alanina-glioxilato aminotransferasa, localizado en el extremo del brazo largo del cromosoma 2 - 2q37-). Menos frecuente es la HOP tipo II, debida a mutaciones en el gen *GRHPR* (de glioxilato reductasa - hidroxipiruvato reductasa, localizado en el cromosoma 9). También se han descrito algunas familias con superproducción endógena de oxalato, de aparente patrón hereditario, pero que no presentan mutaciones en ninguno de estos dos genes, y parecen constituir un tercer tipo.

**Correspondencia:** Dr. Eduardo Salido  
Unidad de Investigación  
Hospital Universitario de Canarias  
Ofra, s/n.  
38320 La Laguna  
E-mail: esalido@hll.es

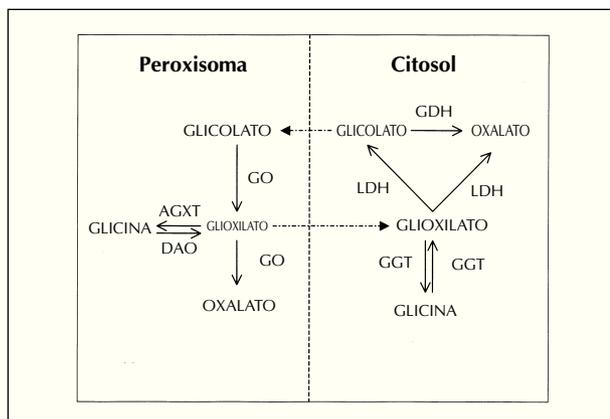


Fig. 1.—Esquema simplificado del metabolismo del glioxilato en el hepatocito humano. Abreviaturas: AGXT: alanina: glioxilato aminotransferasa; DAO: D-aminoácido oxidasa; GDH: glicolato deshidrogenasa; GGT: glutamato: glioxilato aminotransferasa; GO: glicolato oxidasa; LDH: lactato deshidrogenasa.

Con diferencia, AGXT (también conocido como AGT) es el enzima más importante de la detoxificación del glioxilato desde el punto de vista de patología humana (para una revisión extensa ver 1 y <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM>). El déficit de AGXT provoca un acúmulo de glioxilato que se convierte en oxalato, compuesto tóxico sin relevancia biológica en mamíferos y que sólo puede ser eliminado por los riñones. Los efectos lesivos del oxalato en el tubulo renal, y la formación de cristales de oxalato cálcico monohidrato (COM) y dihidrato (COD) tanto en el parenquima renal (nefrocalcinosis) como en el sistema pielocalicial (urolitiasis) dan lugar a la pérdida progresiva de función renal. Cuando el riñón es insuficiente para aclarar oxalato, este se acumula en el organismo (oxalosis), y los depósitos de oxalato cálcico en múltiples tejidos, incluyendo huesos, vasos, corazón, retina, nervios... tienen repercusiones graves. Aunque biológicamente se trata de un defecto hereditario del hepatocito, la célula fundamental en la detoxificación de glioxilato, y por tanto la principal productora de oxalato, las primeras manifestaciones de la enfermedad son ne-

frológicas. La HOP es una enfermedad mortal si no se instauran tratamientos agresivos. La mayoría de los pacientes necesitan hemodiálisis antes de llegar a los 30 años, y una vez en insuficiencia renal crónica, las alternativas terapéuticas actuales son paliativas (trasplante renal, que soluciona el problema temporalmente porque pronto se pierde la función del injerto también por acúmulo de oxalato) o curativas pero con alta morbi-mortalidad (trasplante combinado hepático-renal, y, más controvertido, el trasplante hepático temprano, con función renal normal). Aunque la HOP es una enfermedad poco común hemos encontrado un número relativamente alto de casos en las Islas Canarias (es llamativo que muchos de nuestros pacientes proceden de La Gomera, una isla con unos 17.000 habitantes).

### GENÉTICA MOLECULAR DE LA HOP TIPO I

El cDNA de AGXT fue clonado independientemente por dos grupos<sup>6,7</sup>, a partir de mRNA de hígado, usando sondas del gen homólogo en rata<sup>8</sup>. El gen consta de 11 exones, saltados a lo largo de unos 10 Kb de DNA de la porción más distal del brazo largo del cromosoma 2<sup>9</sup>. Durante esta década en que se ha conocido la estructura y secuencia del gen, se han ido identificando las mutaciones responsables de la enfermedad en distintos grupos de población. En total, se han caracterizado unas treinta mutaciones diferentes en el gen AGXT en pacientes con HOP (<http://www.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/hgmd0.html> la tabla I incluye las principales), distribuidos a lo largo de la región codificante. Al no existir un modelo animal de la enfermedad, y tratarse de un gen que se expresa solo en el hígado, poco accesible al establecimiento de líneas celulares para estudios *in vitro*, gran parte del conocimiento sobre la biología de la proteína AGXT se ha derivado de estudios de correlación genotipo-fenotipo de pacientes. Otra fuente importante de conocimiento sobre esta proteína ha sido la biología comparada, ya que se trata de un enzima presente en el hígado de todos los mamíferos estudiados, y con propiedades estructurales y funcionales bastante conservadas a lo largo de la evolución de las especies. AGXT es una proteína homodimérica, en que cada monómero tiene unos 43 Kda<sup>10</sup>. La proteína es sintetizada principalmente en polirribosomas libres en el citoplasma, y se localiza definitivamente en los peroxisomas, en las mitocondrias o en ambos, dependiendo de las especies. Esta variabilidad en la localización subcelular de AGXT en diferentes mamíferos es uno de los aspectos más investigados de la biología de esta proteína, en gran parte motivado por el hecho que la mutación más

**Tabla I.** Mutaciones en el gen AGXT

1a. Distribución de mutaciones:	
• Sustitución nucleótido	25
• Deleciones pequeñas	2
• Inserciones pequeñas	3
• Inserción/delección	1

1b. Mutaciones de sustitución de nucleótido más representativas:

Tipo mutación	Codón	Aminoácido
Sentido erróneo	<b>244</b>	<b>Ile-Thr</b>
Sentido erróneo	<b>170</b>	<b>Gly-Arg</b>
Sentido erróneo	41	Gly-Arg
Sentido erróneo	187	Ser-Phe
Sin sentido	44	Gln-STOP
Sin sentido	66	Tyr-STOP
Sin sentido	246	Trp-STOP
Sin sentido	333	Arg-STOP

En negrita las mutaciones más frecuentes: **Gly170Arg: 33%**; **Ile244Thr: 9%**.

frecuente en humanos afecta precisamente esta propiedad. En felinos y otros carnívoros estudiados, AGXT se localiza exclusivamente en las mitocondrias; en ratones y otros roedores AGXT está presente tanto en mitocondria como en peroxisomas, mientras que en humanos y en conejos AGXT sólo se encuentra en peroxisoma<sup>11</sup>. No existe una correlación perfecta entre tipo de dieta y localización subcelular, pero sí que hay un patrón predominante que se corresponde aproximadamente con dos posibles «subespecializaciones» de AGXT: —como proteína mitocondrial implicada en neoglucogénesis—, como proteína peroxisómica responsable de la detoxificación de glioxilato. Esta especificidad de localización de AGXT según especie es estricta, y se conocen bastantes aspectos determinantes de la misma. El extremo amino-terminal de la variante mitocondrial (AGXTm) tiene una secuencia de aminoácidos que favorece la estructura secundaria de  $\alpha$ -hélice anfifílica, en la que los residuos hidrofóbicos e hidrofílicos se agrupan en cada una de las dos mitades del cilindro formado por la hélice (fig. 2). Las señales de localización peroxisómica mejor conocidas se localizan en el extremo carboxílico, donde la cola formada por los aminoácidos SKL o similar son importantes para la interacción entre AGXT y los receptores de la membrana del peroxisoma, que es precisa para que AGXT entre en esta organela. El ratón, que presenta ambas formas de la proteína, es un buen modelo para investigar los determinantes de esta localización subcelular. En este caso, hemos podido demostrar<sup>12</sup> que el aspecto determinante de la variante producida es donde se inicie la transcripción del gen. La forma mitocondrial es codificada por

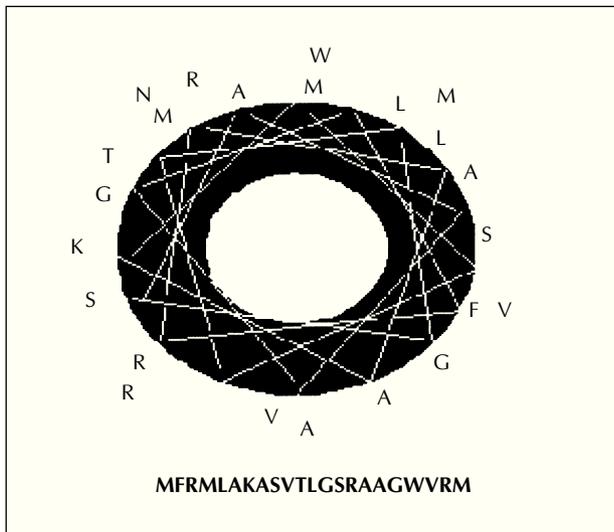


Fig. 2.—Representación esquemática de la estructura  $\alpha$ -hélice anfifílica. Los aminoácidos hidrofóbicos (A: alanina; L: leucina; W: triptófano; V: valina; F: fenilalanina) se agrupan en una de las mitades del cilindro y los hidrofílicos (R: arginina; K: lisina) en la otra.

transcritos largos, en los que el inicio de transcripción ocurre unos pocos nucleótidos por debajo de la secuencia AATAAA (TATA-box, de anclaje de la RNAPolimerasa), y permite que la traducción proteica empiece en el primer codón ATG en contexto compatible con inicio de traducción (gaaATGTTTC). El resultado es una proteína cuyos 22 aminoácidos primeros forman una  $\alpha$ -hélice anfifílica que favorece la migración a través de la membrana mitocondrial incluso sin necesidad de que la proteína este completamente plegada. Por el contrario, cuando la transcripción comienza unos 50 nucleótidos más distalmente, la variante de mRNA producida presenta accATGGGC como primer sitio de comienzo de traducción proteica, resultando en una proteína sin  $\alpha$ -hélice anfifílica en el extremo aminoterminal, que se pliega y dimeriza antes de ser importada al peroxisoma merced a la interacción entre el extremo carboxílico (NKL) y receptores de membrana peroxisómica (Pex5p). Es interesante que la proporción relativa de estos dos transcritos del gen *Agxt* murino están regulados hormonalmente, y la administración de glucagón induce un predominio de la variante mitocondrial, mientras que en la situación basal la variante peroxisómica es mayoritaria. Estos resultados son congruentes con el papel eminentemente neoglucogénico desempeñado por la forma mitocondrial.

La relevancia de estos estudios sobre la localización subcelular deriva del hecho que un tercio de

los pacientes con HOP presentan la mutación G170R (Gly170Arg, producto de un cambio G > A en el exón 4), responsable de una localización predominante de la AGXT en mitocondria en vez del peroxisoma<sup>13</sup>. En el hepatocito humano AGXT no cumple funciones significativas en la mitocondria, mientras que el glioxilato se acumula en el peroxisoma, donde es sintetizado a partir de glicina y glicolato. Este fenómeno representa una diana terapéutica de primer orden: un mejor entendimiento de las claves que determinan la localización subcelular de la proteína podría conducir a un tratamiento farmacológico útil en un tercio de los pacientes de HOP tipo I. Los conocimientos actuales sobre la estructura tridimensional de la proteína son muy limitados<sup>14</sup>, pero permiten hipotetizar que el cambio de Gly (amino ácido pequeño, sin grupo lateral) por Arg (más voluminoso, cargado positivamente) en posición 170 trastorna la formación de homodímeros, y dificulta la incorporación en el peroxisoma, permitiendo que el extremo aminoterminal sea interpretado como señal de localización mitocondrial. Curiosamente, este extremo aminoterminal ha de presentar el polimorfismo frecuente P11L (Pro11Leu) para que el cambio G170R tenga la repercusión patológica observada<sup>13</sup>. Esta evidencia subraya la importancia del plegamiento proteico adecuado en la localización subcelular de AGXT. Nosotros estamos muy interesados en la manipulación del contexto celular que favorezca plegamientos compatibles con la localización fisiológica en humano, y tenemos evidencia preliminar sugestiva de que esta aproximación puede llegar a ser una nueva herramienta terapéutica.

La segunda mutación más frecuente descrita, I244T (Ile244Thr, producto de un cambio T > C en el exón 7), se ha detectado en un 9% de los alelos patológicos estudiados en el mundo, casi siempre en heterocigosis compuesta con otra mutación (con frecuencia G170R). En nuestros pacientes de las Islas Canarias, más del 90% de los alelos patológicos presentan esta mutación, probablemente como consecuencia de un efecto fundador ya que los haplotipos de las familias estudiadas comparten alelos de otros marcadores intragénicos (Pro11Leu, duplicación de 74 bp en intrón 1, C386T sinónimo, Ile340Met) y regionales (D2S125 y D2S140). Esta mutación parece tener un origen bastante antiguo, en el norte de África, ya que también se han descrito casos de homocigóticos en pacientes de Túnez<sup>15</sup> y los habitantes originales de Canarias procedían del noroeste africano<sup>16</sup>. Debido a su importancia relativa en nuestro colectivo de pacientes, hemos investigado las consecuencias celulares y moleculares de I244T en gran detalle<sup>17</sup>. Mediante mu-

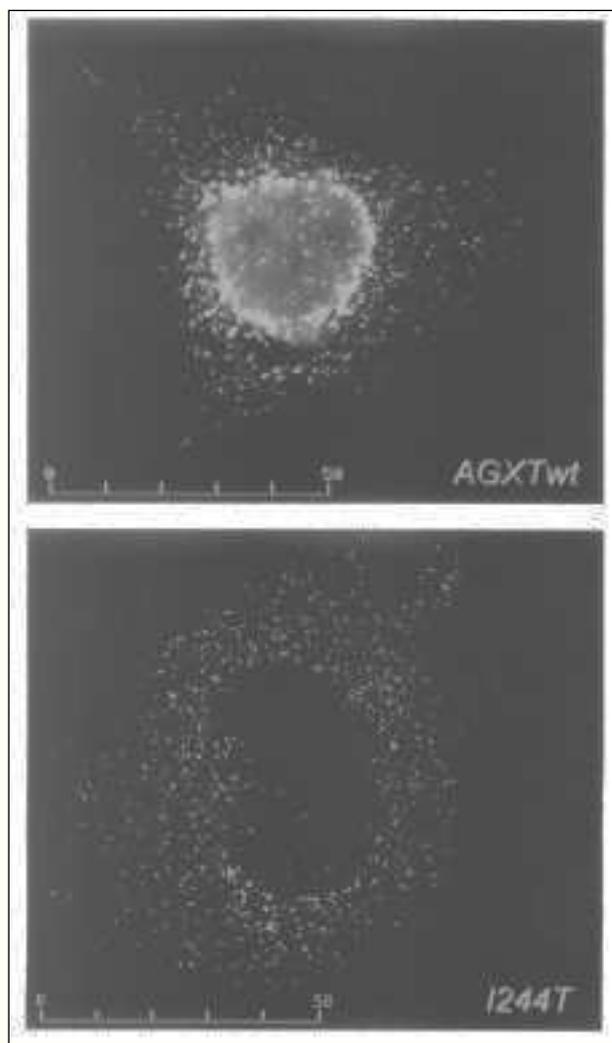
**Tabla II.** Actividad enzimática de AGXT en células COS-7

	Actividad ( $\mu\text{mol Pir/h/mg proteína total}$ )
COS-	ND
AGXT	262 $\pm$ 34
AGXT*L	187 $\pm$ 22*
AGXT*I	225 $\pm$ 102
AGXT*M	496 $\pm$ 105*
AGXT*LT	ND*
AGXT*LTM	22 $\pm$ 7*

COS-: células sin transfectar control; AHXT: AGXT *wild type*; AGXT\*L: AGXT con cambio P11L; AGXT\*I: AGXT con cambio I244T; AGXT\*M: AGXT con cambio I340 M; AGXT\*LT: AGXT con cambio P11L + I244T; AGXT\*LTM: AGXT con cambio P11L + I244T + I340M;  $\mu\text{mol}$ : micromol; Pir: piruvato; h: hora; ND: no detectable; \*:  $p < 0,05$  vs A.

tagénesis dirigida, hemos recreado los distintos cambios de aminoácidos (P11L, I244T, I340M) en proteínas expresadas en células de mamífero (COS7), insecto (Sf9) y bacteria (*E. coli*). El primer dato llamativo de estos estudios ha sido que el cambio I244T *per se* no tiene repercusiones importantes sobre la actividad enzimática del producto génico (tabla II). Células COS7 transfectadas con cDNA de AGXT con diferentes cambios y combinaciones de los mismos muestran actividad enzimática AGXT similar a la obtenida con la secuencia normal, a menos que P11L e I244T estén ambos presentes en el mismo cDNA. En otras palabras, el cambio I244T solo se puede considerar una mutación patológica cuando se observe en el mismo haplotipo que P11L. Esto es lo que se observa normalmente, ya que esta mutación se ha descrito siempre en el alelo *minor* del gen AGXT, definido por los cambios Pro11Leu, ins/del intrón 1, C234T y Ile340Met. No obstante, la predicción lógica sería que existan individuos sanos en la población con I244T y sin P11L. Pero a una distancia genómica entre estos dos puntos de alrededor de 8 kb, las probabilidades de recombinación son de alrededor de una de cada 12.500 meiosis, lo que hace muy difícil demostrar esta predicción en humanos. Por otro lado, este hecho también resta importancia al riesgo de error diagnóstico asociado a asignar el cambio I244T como patológico incluso sin haber tipado P11L en el mismo cromosoma. No obstante, dado que el origen de I244T es bastante antiguo y no conocemos como de frecuentes son las recombinaciones en esta región distal del cromosoma 2, es recomendable tipar no solo I244T sino también P11L antes de asignar valor patológico a esta mutación.

A diferencia de G170R, que también se presenta en el alelo *minor*, I244T no resulta en un error de



**Fig. 3.**—Localización subcelular de la proteína AGXT. La inmunofluorescencia indirecta muestra la localización peroxisómica normal tanto de la variante salvaje (AGXT wt) como de la mutada (I244T).

localización subcelular de la proteína, sino que se localiza en el peroxisoma, igual que la variante normal (fig. 3). El dato experimental clave de la mutación I244T (junto con P11L, en el alelo *minor*, abreviado AGXT\*LTM) es que el producto génico no es soluble en los extractos celulares utilizados para determinar actividad enzimática, a pesar de estar presente en los peroxisomas celulares, de donde se puede extraer utilizando soluciones desnaturizantes (fig. 4). Otro dato importante es que P11L e I244T afectan la conformación proteica sinérgicamente, como se puede demostrar con estudios de tripsinización limitante, y resultan en una proteína AGXT\*LTM que interacciona establemente con cha-

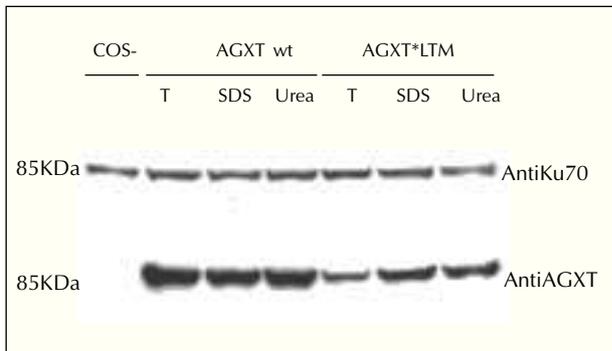


Fig. 4.—Western Blot mostrando la extracción diferencial de AGXT y AGXT\*LTM en diversos detergentes. Se muestran las bandas correspondientes a la hibridación con el anticuerpo antiAGXT (inferior) y al anticuerpo antiKu70 como control de carga (superior). Abreviaturas: SDS: dodecilsulfato sódico 1%; T: tritón X-100 0,05%; Urea: urea 6M+ SDS 0,5%.

perones moleculares como Hsc70 y Hsp90<sup>17</sup>. Hemos encontrado que esta proteína mal plegada no es degradada rápidamente en la célula sino que forma agregados proteicos progresivos. Las familias de HOP tipo I estudiadas en Canarias sufren pues una «enfermedad conformacional» que podría beneficiarse de nuevas alternativas terapéuticas. Como es característico de muchos problemas conformacionales proteicos, AGXT\*LTM sufre menos agregación, permitiendo la recuperación de actividad enzimática en extractos solubles, si las células transfectadas se incuban a temperaturas bajas (30° C en células de mamífero y 27° C en células de insecto). Es más, el tratamiento de estas células con varios compuestos de la familia conocida como «chaperones farmacológicos» (betaína, TMAO, glicerol) tiene un efecto beneficioso notable sobre la solubilidad y actividad enzimática de AGXT\*LTM.

Hace décadas que se propuso por primera vez la administración de dosis farmacológicas de piridoxina a pacientes de HOP tipo I<sup>18</sup>, basándose en que el enzima AGXT utiliza piridoxal fosfato como cofactor. El efecto beneficioso de la administración prolongada de piridoxina, como parte de un tratamiento no quirúrgico de la enfermedad, está bien documentado<sup>19</sup>, pero se muestra eficaz en aproximadamente un tercio de los pacientes tratados, y se desconoce el mecanismo de acción. Es muy relevante la ausencia de estudios que evalúen el efecto de este tratamiento en función del genotipo de los pacientes, lo que hace aún más difícil especular sobre posibles mecanismos de acción y, especialmente, complica mucho la implantación de este tratamiento ya que la piridoxina a dosis elevadas es iatrogénica. Un objetivo importante en nuestras in-

vestigaciones es elucidar los mecanismos moleculares de acción de este tratamiento empírico. Recientemente hemos podido demostrar que concentraciones en torno a 80 μM de piridoxal fosfato en el medio de cultivo inducen una mejoría notable en la fracción de la proteína AGXT\*LTM que es recuperable en extractos solubles, así como en la actividad enzimática de estos extractos de células COS7 transfectadas (fig. 5). Esta concentración, que es del mismo orden de magnitud que la utilizada en el tratamiento de pacientes de HOP tipo I, nos hace pensar que el mecanismo de acción de la piridoxina está relacionado con favorecer el plegamiento correcto de algunas formas mutadas de AGXT, tales como AGXT\*LTM. Investigaciones de la estructura proteica son necesarias para determinar la validez de esta hipótesis.

#### DIAGNÓSTICO DE LA HOP TIPO I

Niveles elevados de oxalato en orina en pacientes con urolitiasis recurrente y/o nefrocalcinosis son la base del diagnóstico clínico. La hiperoxaluria es muy variable, pero usualmente por encima de 2 mmol/24 h; 1,73 m<sup>2</sup>, para valores normales de referencia por debajo de 0,5<sup>20</sup>. Es importante recordar que la recolección de orina de 24 h para medición de oxalato ha de realizarse en recipientes con ClH, para mantener el pH por debajo de 2 y evitar así la conversión de ascórbico a oxálico y la precipitación de oxalato cálcico. Otra fuente de error es la propia insuficiencia renal secundaria a la nefrocalcinosis, que limita la excreción renal de oxalato y hace necesaria la medición de oxalato en plasma. La oxalemia aumenta progresivamente con la pérdida de función renal hasta valores próximos a 0,1 mM. Los niveles de glicolato están elevados (frecuentemente por encima de 2 mmol/24h; 1,73 m<sup>2</sup> también) en

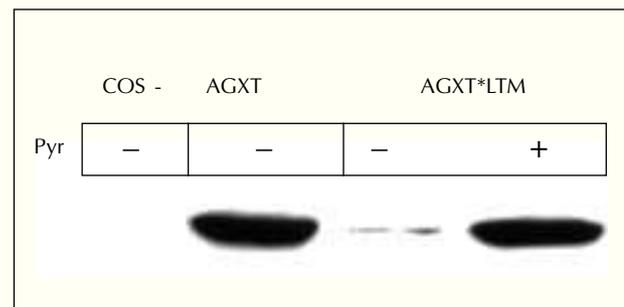


Fig. 5.—Western Blot mostrando la recuperación de fracción soluble de AGXT\*LTM. Células transfectadas con el gen AGXT\*LTM son expuestas a vitamina B6 a concentración de 80 μM. Abreviaturas: Pyr: piridoxal-6-fosfato.

orina de dos tercios de los pacientes<sup>20</sup>, en cuyo caso sirven para distinguir la HOP tipo I de la tipo II, en la que suele haber una elevación de ácido glicérico en orina. La composición de los cálculos eliminados por los pacientes de HOP tipo I es predominantemente COM, y el estudio microscópico de los cristales es muy característico (whewelita tipo 1c -21-).

En familias de tamaño suficiente, en las que se pueda obtener sangre de ambos padres y de al menos un hijo con la enfermedad (mejor dos hermanos afectos) y otros dos hijos adultos sanos, se puede realizar el diagnóstico genético indirecto, mediante análisis de ligamiento. Para ello se utilizan marcadores intragenicos (los mismos descritos previamente para caracterizar el alelo *minor* son útiles) y regionales, como D2S140 y D2S125. Sin embargo, es infrecuente que las familias sean adecuadas para establecer claramente el ligamiento de la enfermedad al gen *AGXT*, en la porción distal de 2q.

El gen *AGXT* se expresa solo en el hígado, por lo que el análisis de mRNA o proteína, se ve limitada por la necesidad de realizar biopsias hepáticas, algo que no siempre es factible o aceptado por los pacientes (con frecuencia el consentimiento informado ha de proceder de los padres de un menor). No ha habido estudios que evalúen la posibilidad de amplificar mRNA obtenido de sangre periférica, en el caso que exista algo de transcripción «ilegítima» de *AGXT* en leucocitos. La biopsia hepática proporciona una abundancia de información, que posibilita el diagnóstico correcto de la enfermedad en la práctica totalidad de los casos. Un aspecto importante es el aprovechamiento máximo del material obtenido. Aunque se considera que al menos 2 mg de tejido son necesarios para el diagnóstico de actividad enzimática e inmunoreactividad<sup>1</sup>, cuando la biopsia es procesada en un laboratorio especializado, incluso las biopsias pediátricas más limitadas pueden proporcionar información no solo sobre los niveles de actividad enzimática sino también sobre la existencia de proteína inmunoreactiva (western blot), localización subcelular (inmunofluorescencia) e incluso mutaciones presentes (analizadas a partir del mRNA, por RT-PCR y secuenciación). El gran problema logístico deriva de la propia rareza de la enfermedad. Existen muy pocos laboratorios suficientemente motivados para el estudio de la HOP y, como en el caso de muchas otras «enfermedades huérfanas», los recursos dedicados al estudio detallado de unos pocos pacientes no son rentables con criterios de coste-eficacia convencionales. Consecuentemente, si la biopsia ha de ser remitida a un centro alejado, con frecuencia hay que limitar la embargadura del estudio, dejando fuera el análisis de localización subcelular y el de mRNA.

En las series de pacientes publicadas (revisado en 1), en alrededor de la mitad de los casos no se puede detectar actividad enzimática, pero en la otra mitad, que incluye los pacientes con la mutación más frecuente (G170R), la actividad residual detectada es muy variable (2-48%).

La mayoría de las mutaciones descritas en pacientes de HOP tipo I se han estudiado en DNA de sangre periférica. Para ello, se amplifican los 11 exones del gen, usando primers específicos para los extremos de los intrones flanqueantes, siguiendo protocolos parecidos a los descritos previamente<sup>22</sup>. A continuación se suele buscar patrones de migración anormal entre las bandas de DNA amplificadas de cada exón, mediante la técnica conocida como SSCP, para priorizar la secuenciación de aquellos exones sospechosos (fig. 6). Con suficiente experiencia, la técnica de SSCP es muy eficaz para detectar variantes en la secuencia de los exones. Una alternativa recientemente propuesta es el análisis de temperaturas de fusión de los productos amplificados mediante aparatos de PCR acoplados a detectores cuantitativos de fluorescencia<sup>23</sup>. En la medida que la secuenciación directa de productos de PCR se hace más robusta y asequible, muchos laboratorios pasan directamente a secuenciar todos los exones del gen, sin rastreo previo por SSCP.

Existen limitaciones al diagnóstico basado solo en la secuenciación de los exones del gen *AGXT*. Un número considerable de los alelos patológicos no se han podido detectar por este método en los casos publicados, debido probablemente a mutaciones en zonas no codificantes, como el promotor del gen.

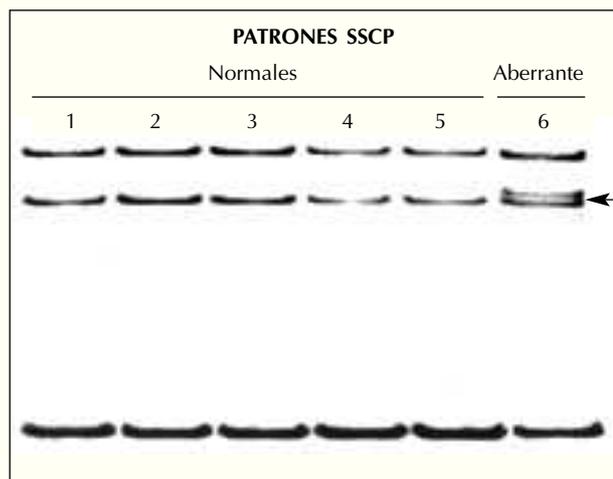


Fig. 6.—Perfil de SSCP en el rastreo de posibles mutaciones en el exón 4 del gen *AGXT*. Se indica con una flecha patrón electroforético aberrante sugiriendo la presencia de una posible mutación.

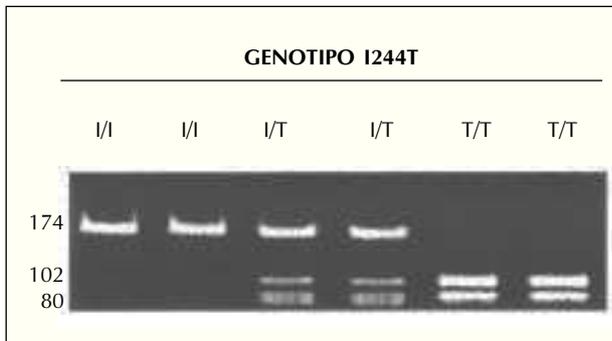


Fig. 7.—Prueba de PCR-RFLP que permite el diagnóstico de la mutación I244T. Se muestran los tres posibles genotipos: II (homocigoto normal); IT (heterocigoto para la mutación); TT (homocigoto para la mutación).

Cuando no existen otras pruebas diagnósticas (actividad enzimática o inmunorreactividad AGXT), la ausencia de mutaciones en *AGXT* es difícil de interpretar, lo que resta valor al diagnóstico molecular de la HOP tipo I. Una vez identificadas las mutaciones presentes en una familia de HOP, con frecuencia se pueden diseñar pruebas de PCR-RFLP para diagnosticar la presencia de las mismas en múltiples muestras de DNA de una manera robusta y eficaz (fig. 7).

#### CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO. PRONÓSTICO DE LA HOP TIPO I

La presentación clínica de la HOP se ha descrito en un rango muy amplio de edades, desde 1 mes hasta pasados los 60 años<sup>4,5</sup>. La severidad de la enfermedad también es muy variable, con una variante maligna (infantil) en la que la progresión a insuficiencia renal ocurre en un período de meses después del nacimiento<sup>24</sup>, mientras que también se han descrito casos de familiares asintomáticos a pesar de poseer las mismas mutaciones que los pacientes en estudio<sup>5,25</sup>. La gran variabilidad clínica de la HOP, no se correlaciona bien con las mutaciones del gen *AGXT* o con el grado de actividad enzimática residual<sup>25,26</sup>. Entre los pacientes homocigóticos para Ile144Thr estudiados por nosotros también hemos podido constatar una gran variabilidad en la presentación clínica, con casos de insuficiencia renal en edades tempranas y otros que mantienen la función renal en edades adultas, a pesar de los episodios recurrentes de urolitiasis. Esta falta de correlación genotipo-fenotipo probablemente es indicativa del efecto de genes modificadores y/o factores ambientales en el desarrollo de la enfermedad. Es obvio que las con-

secuencias patológicas del déficit de *AGXT* dependen en gran medida de factores promotores e inhibidores de la cristalización de oxalato cálcico y la respuesta lesiva de la nefrona a niveles altos de oxalato. Hasta que no conozcamos en detalle la identidad y relevancia de estos factores adicionales, no es realista intentar basar una predicción pronóstica en el análisis molecular de las mutaciones del gen *AGXT*. Debido a lo infrecuente de la enfermedad, el estudio de genes modificadores y factores ambientales concretos es difícil de realizar en humanos, y se hace necesario trabajar con sistemas modelo. Hemos conseguido desarrollar un ratón KO para *Agxt*, que presenta hiperoxaluria, y será una herramienta clave en este tipo de investigación.

#### HOP TIPO II

Esta variante de HOP es muy infrecuente, aunque también se sospecha que puede haber pasado desapercibida en muchos casos<sup>2</sup>. Se han descrito unas pocas decenas de casos en la literatura, y en general se trata de una enfermedad menos grave, de presentación más tardía (rara en edad pediátrica) en la que es infrecuente encontrar nefrocalcinosis y no suele acabar en oxalosis generalizada<sup>27,28</sup>. El diagnóstico clínico se apoya en la existencia de niveles altos de oxalato y ácido glicérico en orina, aunque ocasionalmente este último metabolito puede ser normal.

La HOP tipo II es una enfermedad autosómica recesiva debida a mutaciones en el gen *GRHPR*, localizado cerca del centrómero del cromosoma 9<sup>28,29</sup>. Este gen contiene 9 exones, distribuidos a lo largo de unos 9 kb de DNA, en los que se han descrito una variedad de mutaciones<sup>30,31</sup>, que supuestamente conducen a la pérdida de función de este enzima citosólico, aunque las consecuencias moleculares de estas mutaciones no ha sido investigada en profundidad.

La expresión del gen *GRHPR* no está limitada al hepatocito, sino que también se expresa a niveles más bajos en células renales, linfocitos y fibroblastos<sup>32</sup>. Existe un ensayo de actividad enzimática aplicable a biopsias hepáticas<sup>32</sup>, que ha sido importante en la confirmación bioquímica del diagnóstico de HOP tipo II. La presencia de mRNA de *GRHPR* en células fácilmente accesibles como son los linfocitos hace posible el diagnóstico molecular basado en la amplificación y secuenciación del cDNA, que contiene una región codificante de menos de 1 kb. No obstante, aun en publicaciones recientes<sup>31</sup> no se llega a detectar la mutación responsable en más de la mitad de las familias analizadas, lo que resta utilidad práctica al diagnóstico molecular actual de esta enfermedad.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Danpure CJ: Primary hyperoxaluria. En: Metabolic and molecular bases of inherited disease. Scriver CR y cols.: (ed). New York: McGraw-Hill. p. 3323-3367, 2001.
2. Leumann E, Hoppe B: The primary hyperoxalurias. *J Am Soc Nephrol* 12: 1986-1993, 2001.
3. Holmes R, Assimos DG: Glyoxylate synthesis, and its modulation and influence on oxalate synthesis. *J Urology* 160: 1617-1624, 1998.
4. Cochat P, Deloraine A, Rotily M, Olive F, Liponski I, Deries N: Epidemiology of primary hyperoxaluria type I. *Nephrol Dial Transplant* 10 (S8): 3-7, 1995.
5. Kopp N, Leumann E: Changing pattern of primary hyperoxaluria in Switzerland. *Nephrol Dial Transplant* 10: 2224-2227, 1995.
6. Nishiyama K, Berstein G, Oda T, Ichiyama A: Cloning and nucleotide sequence of cDNA encoding human liver serine-pyruvate aminotransferase. *Eur J Biochem* 194, 9-18, 1990.
7. Takada Y, Kaneko N, Esumi H, Purdue PE, Danpure CJ: Human peroxisomal L-alanine:glyoxylate aminotransferase. Evolutionary loss of a mitochondrial targeting signal by point mutation of the initiation codon. *Biochem J* 268: 517-520, 1990.
8. Oda T, Funai T, Ichiyama A: Generation from a single gene of two mRNAs that encode the mitochondrial and peroxisomal serine: pyruvate aminotransferase of rat liver. *J Biol Chem* 266: 7513-7519, 1991.
9. Purdue PE, Lumb MJ, Fox M, Griffio G, Hamon-Benais C, Povey S, Danpure CJ: Characterization and chromosomal mapping of a genomic clone encoding human alanine: glyoxylate aminotransferase. *Genomics* 10: 34-42, 1991.
10. Takada Y, Noguchi T: Aromatic-amino acid-glyoxylate aminotransferase from rat liver. *Methods Enzymol* 142: 273-279, 1987.
11. Takada Y, Noguchi T: Subcellular distribution, and physical and immunological properties of hepatic alanine: glyoxylate aminotransferase isoenzyme in different mammalian species. *Comp Biochem Physiol* 72B: 597-604, 1982.
12. Li XM, Salido EC, Shapiro LJ: The mouse alanine: glyoxylate aminotransferase gene (Agxt1): cloning, expression, and mapping to chromosome 1. *Somat Cell Mol Genet* 25: 67-77, 1999.
13. Purdue PE, Allsop J, Isaya G, Rosenberg LE, Danpure CJ: Mis-targeting of peroxisomal L-alanine: glyoxylate aminotransferase to mitochondrial in primary hyperoxaluria patients depends upon activation of a cryptic mitochondrial targeting sequence by a point mutation. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 10900-10904, 1991.
14. Zhang X, Roe SM, Pearl LH, Danpure CJ: Crystallization and preliminary crystallographic analysis of human alanine: glyoxylate aminotransferase and its polymorphic variants. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 57: 1936-1937, 2001.
15. Basmaison O, Bozon D, Rolland MO, Koch-Nogueira PC, Dumontel C, Divry P, Cochat P: Primary hyperoxaluria type I: Clinical, enzymatic and genetic study. *Pediatr Nephrol* 14: C36, 2000.
16. Flores C, Larruga JM, González AM, Hernández M, Pinto FM, Cabrera VM: The origin of the Canary Island aborigines and their contribution to the modern population: a molecular genetics perspective. *Current Anthropol* 42: 749-755, 2001.
17. Santana A, Salido E, Torres A, Shapiro LJ: Primary Hyperoxaluria type I (PH1) in the Canary Islands: a conformational disease due to Ile244Thr mutation in the Pro11Leu-containing alanine-glyoxylate amino transferase (AGXT). *Proc Natl Acad Sci USA* (submitted).
18. Gibbs DA, Watts RWE: The action of pyridoxine in primary hyperoxaluria. *Clin Sci* 38: 277-286, 1970.
19. Milliner 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* 331: 1553-1558, 1994.
20. Cochat P: Primary hyperoxaluria. *Kidney Int* 55: 2533-2547, 1999.
21. Daudon M, Estepa L, Lacour B, Jungers P: Unusual morphology of calcium oxalate calculi in primary hyperoxaluria. *J Nephrol* 11 (S1): 51-55, 1998.
22. Von Schnakenburg C, Rumsby G: Identification of new mutations in primary hyperoxaluria type 1 (PH1). *J Nephrol* 11 (Supl. 1): 15-17, 1998.
23. Pirulli D, Boniotto M, Puzzer D, Spano A, Amoroso A, Crovella S: Flexibility of melting temperature assay for rapid detection of insertions, deletions and single-point mutations of the AGXT gene responsible for type I primary hyperoxaluria. *Clin Chem* 46: 1842-1844, 2000.
24. Cochat P, Koch-Nogueira PC, Mahmoud MA, Jamieson NV, Scheinman JI, Rolland MO: Primary hyperoxaluria in infants: medical, ethical and economic issues. *J Pediatr* 135: 746-750, 1999.
25. Hoppe B, Danpure CJ, Rumsby G, Fryer P, Jennings PR, Blau N, Schubiger G, Neuhaus T, Leumann E: A vertical (pseudodominant) 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* 29: 36-44, 1997.
26. Danpure CJ, Jennings PR, Fryer P, Purdue PE, Allsop J: Primary hyperoxaluria type I: Genotypic and phenotypic heterogeneity. *J Inher Metab Dis* 17: 487-499, 1994.
27. Kemper MJ, Conrad S, Muller-Wiefel DE: Primary hyperoxaluria type 2. *Eur J Pediatr* 156: 509-512, 1997.
28. Cramer SD, Ferree PM, Lin K, Milliner DS, Holmes RP: The gene encoding hydroxypyruvate reductase (GRHPR) is mutated in patients with primary hyperoxaluria type II. *Hum Molec Genet* 8: 2063-2069, 1999.
29. Rumsby G, Cregeen DP: Identification and expression of a cDNA for human hydroxypyruvate/glyoxylate reductase. *Biochim Biophys Acta* 1446: 383-388, 1999.
30. Webster KE, Ferree PM, Holmes RP, Cramer SD: Identification of missense, nonsense, and deletion mutations in the GRHPR gene in patients with primary hyperoxaluria type II (PH2). *Hum Genet* 107: 176-185, 2000.
31. Johnson SA, Rumsby G, Cregeen D, Hulton SA: Primary hyperoxaluria type 2 in children. *Pediatr Nephrol* 17: 597-601, 2002.
32. Gafi CF, Rumsby G: Kinetic analysis and tissue distribution of human D-glycerate dehydrogenase / glyoxylate reductase and its relevance to the diagnosis of primary hyperoxaluria type 2. *Ann Clin Biochem* 35: 104-109, 1998.