



## ARTÍCULOS ORIGINALES / Originals

# RAQUITISMO HIPOFOSFATÉMICO FAMILIAR Y ESPORÁDICO: CLÍNICA Y HALLAZGOS MOLECULARES

Guillermo Alonso,<sup>1</sup> Luisa Plantalech,<sup>2</sup> Rodolfo Guelman,<sup>2</sup> Sergio Gonzalez,<sup>3</sup> Hamilton Cassinelli,<sup>4</sup> María Redal,<sup>3</sup> Titania Pasqualini<sup>1\*</sup>

1. Departamento de Pediatría, Sección Endocrinología, 2. Servicio de Medicina Nuclear y Endocrinología; 3. Unidad de Medicina Molecular y Genética (ICBME), Hospital Italiano de Buenos Aires. 4 División Endocrinología, Hospital de Niños R Gutiérrez, CABA.

### Resumen

Las alteraciones de los genes PHEX y FGF23 son las causas más estudiadas de raquitismos hipofosfatémicos (RH). Ambas se heredan en forma ligada al X (RHLX) y autosómica (RHAD) respectivamente. El objetivo de este estudio fue evaluar la presencia de variaciones moleculares de estos genes en pacientes y familiares con RH y establecer relaciones entre las manifestaciones somáticas y el tipo de alteración molecular. Se evaluaron fenotipo y genotipo en 29 casos con manifestación somática: 13 casos propósitos (5 esporádicos), 16 familiares con clínica de RH y 12 familiares asintomáticos mediante el análisis de los genes PHEX y FGF23. Se analizaron las mutaciones del gen PHEX mediante SSCP/HD y secuenciación directa de las regiones con patrón de bandas alterado y del FGF23 por secuenciación directa para detectar mutación R176Q (c.527 G>A), R179Q(c.535 G>A) y R179W (c.535 C>T). El RH fue de predominio familiar (8/13) y se diagnosticó en la infancia y niñez, excepto en 7 casos (2 con alteraciones

clínicas y 5 sujetos con bioquímica de hipofosfatemia descubiertos en la evaluación familiar). El 75% de los casos con RH familiares y el 44% de los esporádicos, presentaba alteraciones del gen PHEX. En una familia con RHAD se detectaron mutaciones del gen FGF23. Los pacientes con alteraciones del PHEX presentaban fenotipo somático más grave. Se halló la mutación del gen FGF23 en el exón 3: sustitución (CGC a CAG): c.535 G>A, R179Q. Se observaron 4 nuevas mutaciones del gen PHEX en 3 familias y un caso esporádico. A: c.552 Inserción G+1 del intron 3-4 en sitio splicing dador. B: Mutación silenciosa c.401 C>A en posición 11 exón 3. C: Mutación, codón stop, c.1241 C>G en posición 105 del exón 9. D: Mutación silenciosa c.2260 T>G en posición 93, exón 20 en una niña (esporádico). Conclusiones: se detectaron mutaciones del PHEX en la mayoría de los casos especialmente en los familiares. Describimos 4 nuevas mutaciones del gen PHEX. Si bien se observaron diferentes tipos de mutaciones, el fenotipo fue similar en las distintas familias. El

\* Dirección electrónica: [titania.pasqualini@hospitalitaliano.org.ar](mailto:titania.pasqualini@hospitalitaliano.org.ar)

RHAD presentó una forma menos grave y de presentación en distintos periodos de la vida.

**Palabras clave:** Raquitismo hipofosfatémico, raquitismo hipofosfatémico ligado al X, raquitismo hipofosfatémico autosómico dominante, gen PHEX, gen FGF 23.

## Summary

### **FAMILIAL AND SPORADIC HYPOPHOSPHATEMIC RICKETS: CLINICAL AND MOLECULAR FINDINGS.**

*Human disorders of phosphate handling and skeletal mineralization can result from inactivating mutations in PHEX, an X linked dominant disorder (XLH). Autosomal-dominant hypophosphatemic rickets (ADHR) is a rare disorder caused by mutation in the FGF23 gene, which, in contrast to XLH, displays incomplete penetrance and variable age of onset. We studied genomic DNA of 13 Argentinean families in order to characterize these genes. We studied 29 patients and their relatives (n=12) with hypophosphatemic rickets and osteomalacia, belonging to 13 families. FGF23 was analyzed by bidirectional complete sequencing of the exons 3. For the evaluation of the PHEX gene all 22 exons and introns/exons boundaries were analyzed by SSCP/HD and bidirectional complete sequencing of regions with abnormal migration patterns was performed. We found five sporadic cases. Six patients had been diagnosed in early childhood. FGF23 missense mutation was identified in 4 affected members of a family (G>A, R179Q, in exon 3). Four novel PHEX gene mutations were detected. Family III: two patients, presented c.552 ins G+1 of intron 3-4 in splice donor. Family IV: three members, had a silence mutation c.401 C>A pos 11 exon 3. Family VII: two patients had a codon stop mutation, c.1241 C>G pos 105 exon 9. A single girl with healthy parents showed silence mutation c.2260 T>G in pos 93 exon 20. Patients with XLRH have more severe skeletal disease. We describe 4 novel mutations in the PHEX gene.*

*In contrast, we detected only one family with ADHR where we could observe different clinical manifestations. PHEX mutations were detected also in sporadic cases.*

**Key words:** hypophosphatemic rickets, X linked hypophosphatemic rickets, autosomal-dominant hypophosphatemic rickets, PHEX gene, FGF23 gene.

## Introducción

El raquitismo hipofosfatémico (RH) es la causa más frecuente de estas enfermedades transmitidas por herencia. Han sido descritos cuatro tipos de RH por alteraciones genéticas: RH ligado al X (RHLX) se hereda en forma dominante, es resultado de alteraciones del gen PHEX;<sup>1-8</sup> el RH autosómico dominante (RHAD) es inducido por mutaciones del gen FGF23 en el exón 3; el RH autosómico recesivo se debe a mutaciones del gen DMP1 o del gen que codifica a la proteína ectonucleótido pirofosfatasa/diesterasa (ENPP1) y el RH asociado a hiper calciuria se presenta por compromiso del gen SLC3A3.<sup>7-13</sup> Otras formas poco comunes de RH se adscriben al exceso de FGF23 en la displasia fibrosa (Mc Cunnery-Albright), al síndrome nevo epidérmico, al RH asociado a hiperparatiroidismo inducido por exceso de klotho.<sup>7,8,14</sup>

La forma más frecuente es el RHLX con una incidencia de 1/20 000 recién nacidos. El RHAD presenta fenotipo similar al RHLX cuando se presenta en la infancia y variable de menor gravedad en la expresión fenotípica más tardía. Tanto el gen PHEX como el gen FGF 23 son los más estudiados y tiene importancia en el diagnóstico clínico.<sup>6-8,14</sup>

La expresión clásica de la enfermedad es el retardo de crecimiento y la presencia de *genu varum* o *genu valgo* en los niños al inicio de la deambulación. Sin embargo esta sintomatología puede ser muy variable y en algunos casos el diagnóstico es muy tardío. En la investigación familiar se han hallado portadores sanos de la enfermedad. El tratamiento sustitutivo con sales de fósforo mejora el fenotipo, evitando las deformaciones esqueléticas y el retardo de creci-



miento que aparecen en los casos de expresión clínica más severa. Por ello, la detección precoz es muy importante. Se ha observado que el RH ligado al X presenta el fenotipo más grave. En los adultos la enfermedad se manifiesta con dolores óseos, fracturas en los sitios de carga y/o mialgias constituyendo un cuadro de osteomalacia por pérdida de fosfatos (OMH).<sup>6-8,14</sup>

Nuestro objetivo fue evaluar y relacionar el genotipo y el fenotipo de una población de pacientes que consultó por raquitismo u osteomalacia asociado a hipofosfatemia e hiperfosfatemia.

### Población y métodos

Se evaluaron 13 pacientes propósitos (1 adulto) que concurrieron a la consulta. En todos se constató manifestaciones somáticas compatibles con raquitismo y en el caso de la mujer adulta, osteomalacia (Tabla 1A).

Mediante el interrogatorio y examen se detectaron 16 familiares con historia y fenotipo compatible con RH u OMH (1 abuela con fracturas e hipofosfatemia de diagnóstico en edad adulta). En 5/13 de los propósitos no se constataron familiares afectados (examen físico y laboratorio normales) por ello, se consideraron casos esporádicos.<sup>15,16</sup> Se observaron familias con varios individuos afectados [2 Flias: 4 casos, 4 Flias: 3 casos, 2 Flias: 2 casos].

Los individuos sintomáticos incluían niños y adultos que presentaban hipofosfatemia e hiperfosfatemia asociado o no a las siguientes características somáticas:

En los niños: *genu varum* o *valgo*, ensanchamiento de muñecas y distal de huesos largos, rosario raquíptico, talla baja o cualquier otra manifestación esquelética de raquitismo.

En los adultos: talla baja, mialgias, dolores óseos, fracturas.

Todos los propósitos presentaban: hipofosfatemia, hiperfosfatemia, reabsorción tubular de fosfatos disminuida, calcemia y calciuria normales, elevación de la fosfatasa alcalina (Tabla 1B).

**Criterios de exclusión:** se excluyeron pacientes con raquitismo carencial, aquellos tra-

tados con terapia anticonvulsivante, síndromes de mala absorción intestinal como celiaquía o cirugías gástricas e intestinales, enfermedades renales tubulares (síndrome de Fanconi hereditario o adquirido), enfermedad hepática, alcoholismo, deficiencias nutricionales, consumo crónico de antiácidos.

Una vez obtenido el diagnóstico de raquitismo u osteomalacia perdedora de fosfatos en el propósito, o bioquímica característica sin manifestación somática, se procedió a estudiar a sus familiares de primer grado, con la finalidad de detectar si el RH o OMH era de origen familiar.

El fenotipo fue clasificado siguiendo las consideraciones de Holm I y col.<sup>15</sup> y Morey y col.<sup>17</sup> como:

- *Leve:* bioquímica y escasa manifestación somática.
- *Moderado:* talla normal o baja, *genu varum* sin cirugía correctora, abscesos dentarios, osteomalacia en la adultez.
- *Grave:* talla muy baja, *genu varum*, osteotomía correctora.

### Estudio de las alteraciones génicas

Se estudiaron los genes FGF23 y PHEX de 41 personas: propósitos (n=13) y familiares con fenotipo (n=16) y sin manifestaciones (n=12) de RH y OMH, para determinar la etiología molecular de los raquitismos y osteomalacias. Se analizaron los genes PHEX y FGF23 en padres, hermanos o hijos.

Se realizó la extracción de ADN, a partir de 3 ml de sangre periférica, mediante un kit comercial (QIAmp DNA kit, QIAGEN).

Se estudió el gen del raquitismo hipofosfatémico autosómico dominante (RHAD) para detectar las tres mutaciones hasta ahora halladas que causan el fenotipo de RHAD por un mecanismo de ganancia de función. Se amplificó el exón 3 con *primers* de secuencia específica, posteriormente se realizó secuenciación automática bidireccional, en búsqueda de las mutaciones R176Q (c.527 G>A), R179Q (c.536 G>A) y 179W (c.535 C>T) o mutaciones nuevas aun no descriptas.<sup>10,11,18,19</sup>

**Tabla 1 A.** Sexo, edad en el momento del diagnóstico clínico y del estudio genético, y características somáticas en el momento del diagnóstico. Cirugías correctoras de *genu varum* o fractura de cadera de los propósitos (casos clínicos iniciales).

Familia	Sexo	Edad (diagnóstico años)	Edad (estudio genético años)	Talla (cm)	Z-score	Genu varum	Cirugías correctoras	Otros
I	F	1,7	8,9	77,5	-1,51	Si		Leve ensanchamiento metafisario
II	M	2	19,6	77,3	-2,65	Si		Talla baja
III	M	2,0	11,6	108,9	-3,99	Si		Macrocefalia Miembros cortos Problemas dentales
IV	M	0,8	6,4	67,8	-1,48	-		Leve ensanchamiento metafisario. Fontanela amplia Macrocefalia
V	F	3,3	7,8	95,8	0	Si		
VI	F	2,1	20	139 *	-4,07	Si	Si	
VII	F	1,4	22	149*	-2,07	Si	Si	Osteoartritis de rodillas
VIII	F	5,0	43	146*	-2,53	Si	Si	
IX	F	1,5	23	146*	-2,30	Si		Talla baja Craneostenosis En la infancia
X	F	1	7,5	113,2*	-1,89	Si		Ensanchamiento epifisario
XI	F	2,1	3,6	85,4	-0,49	Si		Ensanchamiento metafisario
XII	F	1,7	8,5	77,5	-1,51	Si		Ensanchamiento metafisario
XIII	F	28	33	160	0	No	Si	Fx de ambas caderas Fx ambas ramas ileopubianas

\* Talla y Z score evaluados en el momento del estudio genético.

Se procedió a estudiar el gen PHEX vinculado con el RHLX. Para la búsqueda inicial de variantes, se desarrolló la técnica de polimorfismo conformacional de hebra simple y de heteroduplex (SSCP-HD); posteriormente se realizó la secuenciación directa de las regiones con patrón de bandas alterado<sup>20-22</sup> mediante PCRs con

primers de secuencia específica para los exones e intrones adyacentes del gen PHEX.

Este análisis detecta más de 3/4 de las mutaciones en los pacientes con XLH familiares y 1/3 en los casos con mutaciones esporádicas.<sup>15,23,24</sup>

Todas las secuencias fueron analizadas mediante el programa Sequencher 5.0 y se clasi-



**Tabla 1 B.** Estudios complementarios de los propósitos: bioquímica del metabolismo fosfocálcico y radiología, estudios iniciales luego de la primera consulta.

Familia	Calcemia (mg%)	Fosfatemia (mg%)	Rtp %	FAL ui/ml (VN superior)	Ca/cru	PTH pg/ml	250HD ng/ml	1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> pg/ml	Radiología
I	9,9	3,0	82%	1750	0,24	45	16	32	GV+ EM
II	10	2,7	76%	784 (420)	0,21	-	-	-	GV + EE
III	9,0	3,1	90%	640 (382)	0,05	-	40	-	GV y Cráneo
IV	10,4	2,7	78%	1876	0,08	-	-	-	EM y Cráneo
V	9,3	2,6	76%	1085	0,08	38.8	21,9	-	GV
VI	8,7	2,0	60%	211 (190)	0,16	-	-	-	GV +EM
VII	9,4	2,4	82%	110 (240)	0,09	28	28	-	GV + EE
VIII	8,7	2,1	78%	107 (240)	0,18	45	28	-	GV
IX	10	1,2	59%	604	0,13	55	34	-	Cráneo
X	10,5	2,9	76%	1623	0,04	33,6	35,9	-	EE
XI	10	2,7	77%	1720	0,05	20	42	-	EM
XII	9,7	2,1	63%	511 (382)	0,1	-	-	-	EM
XIII	8,2	2,0	64%	542 (380)	0,03	298 (100)	26	<4	Fx de ambas caderas y ramas ileopubianas

GV: genu varum; EM: ensanchamiento metafisario; EE: ensanchamiento epifisario; Cráneo: macrocefalia o craneoestenosis; RTP: reabsorción tubular de fosfatos; FAL : Fosfatasa alcalina.

ficaron las variantes detectadas según la información disponible en las bases de datos del gen PHEX ([www.PHEXdb.mcgill.ca](http://www.PHEXdb.mcgill.ca)).<sup>25</sup>

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de protocolos de Investigación del Departamento de Docencia e Investigación del Hospital Italiano de Buenos Aires.

Los pacientes adultos y los padres de los niños firmaron el consentimiento informado y aceptaron la presentación de los resultados del

estudio genético con fines académicos manteniendo oculta la identidad. Este protocolo siguió los lineamientos de la Declaración de Helsinki.

## Resultados

Se estudiaron 29 pacientes con manifestaciones fenotípicas, 24 pertenecientes a 8 familias (Tablas 2); 5 casos se consideraron esporádicos (Tabla 3). Por lo tanto la manifestación de RH fue de predominio familiar.

El diagnóstico se realizó en la infancia y niñez en el 75,9% de los casos y siete pacientes en la adultez (2 con manifestaciones clínicas y 5 con bioquímica alterada), de los cuales 1 es un caso esporádico. La relación mujer/varón fue 3,4:1.

#### **Familiares:**

El 75% de los RH familiares presentaban alteraciones del gen PHEX (6 de 8 familias). (Tabla 4).

Se detectó en una familia RHAD (niña, madre, abuela, tío) (Familia I de Tabla 1) con mutaciones del gen FGF23. El propósito fue una niña que consultó al 1 año y 8 meses por presentar talla en percentilo 3 (longitud corporal 77,5 cm), *genu varum* (Figura 1) y leve ensanchamiento de muñecas. Entre los antecedentes familiares la abuela materna presentaba talla de 1,56 m, fracturas múltiples, hipofosfatemia en tratamiento con sales de fósforo. El tío materno había presentado raquitismo tratado en la infancia

con talla adulta normal de 1,67m y bioquímica normal en el momento de esta investigación. A posteriori en la madre se detectó hipofosfatemia asintomática.

En una familia (II), constituida por madre y dos hijos varones con fenotipo de RH no se encontró ninguna mutación en los dos genes estudiados (Tabla 2).

#### **Esporádicos:**

Los familiares relacionados fueron evaluados en todos los casos según posibilidades, se consideraron esporádicos por ausencia de fenotipos (hipofosfatemia, alteraciones somáticas) y genotipos en familiares vinculados al propósito.

Se observaron mutaciones del gen PHEX en 2/5 casos esporádicos (44%) uno de los cuales se presentó en forma tardía (28 años): se trataba de una mujer que había manifestado su enfermedad luego del segundo embarazo. Los es-



**Figura 1. A.** Caso índice: una niña con raquitismo hipofosfatémico autosómico dominante vinculado a alteración del gen FGF23. Obsérvese el *genu varum*. **B.** Radiografía de la paciente, nótese el ensanchamiento de las metafisis e incurvación de fémures y tibias.



tudios bioquímicos mostraron hipofosfatemia, calcemia normal baja, niveles plasmáticos no detectados de calcitriol e hiperparatiroidismo (Tabla 1 A-B).

### Fenotipo

Los pacientes con alteraciones del PHEX presentaban fenotipo somático más grave (talla baja, *genu varum*), sin embargo se observó expresiones variadas en algunos familiares (Hipofosfatemia sin alteraciones esqueléticas). Las manifestaciones leves se diagnosticaron en forma más tardía o como parte de la investigación familiar (Tabla 2; Tabla 3).

Se consideró que el 68,4 % (13 de 19) de los RHLX eran graves, 10,5% (2 de 19) moderados y 21% (4 de 19) leves (Tabla 1 y 2). Las manifestaciones somáticas del RHAD se presentaron en forma incompleta, con fenotipo menos grave y a variable edad de comienzo (Tabla 2). No se observaron diferencias de sexo en relación a la gravedad del fenotipo.

### Genotipo

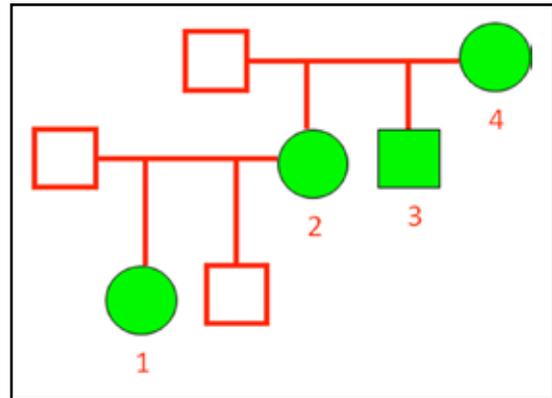
Se halló una mutación sin sentido del FGF23 en 4 miembros afectados de la Familia I: c.536 G>A, R179Q, en el exón 3 (Figura 2).

Se detectaron 8 mutaciones del gen PHEX, 6 de origen familiar y 2 casos esporádicos. Algunas de estas variaciones estaban previamente descritas en la literatura (Tabla 3).

Se observaron 4 nuevas mutaciones del gen PHEX: Familia III: (madre e hijo) c. 552 inserción G+1 del intrón 3-4 en sitio *splicing* dador. Familia IV: (hijo, madre y tía) presentaron una mutación silenciosa c.401 C>A en posición 11 exón 3. Familia VII: (hija y madre) mutación con efecto codón stop, c.1241 C>G en posición 105 del exón 9. Una niña (Familia XI) mostró una mutación silenciosa c.2260 T>G en posición 93, exón 20 (esporádico) (Tabla 4).

### Discusión

En los últimos años se han realizado grandes avances en el entendimiento de las bases moleculares y bioquímicas de los desórdenes hipo-



**Figura 2.** Árbol genealógico de una familia con raquitismo hipofosfatémico autosómico dominante. Alteración del gen FGF23: sin sentido en 4 miembros. Exon 3: c.536 G>A, R179Q. Cuadrados: varones, círculos: mujeres. Figuras rellenas: casos afectados.

fosfatémicos heredados y adquiridos. La identificación de trastornos genéticos en los raquitismos hipofosfatémicos hereditarios como RHLX, el RHAD y el RH autosómico recesivo (RHAR) han permitido un mejor entendimiento de los factores causales de pérdida de fosfatos.<sup>6,7,8,26,27</sup>

El RHLX es la forma más común de los raquitismos hereditarios. Se produce por mutaciones que inactivan el gen PHEX que codifica una proteína de 749 aminoácidos, miembro de la familia M13 de las metaloproteasa de membrana, localizado en el cromosoma Xp22. Se describieron hasta la fecha 329 mutaciones.<sup>25</sup> El gen PHEX regula de manera aún poco conocida la síntesis y/o actividad del FGF23.<sup>3,6,7</sup>

El RHAD es una forma rara de presentación. Esta forma de RH está vinculada con mutaciones del gen FGF23, localizado en el cromosoma 12 (12p13.3). Su proteína FGF23 se segmenta entre Arg(179) y Ser(180), y este proceso elimina su actividad biológica. La mutación más frecuente, es una mutación *missense* en el sitio de clivaje del FGF23 que envuelve a los aminoácidos 176 y 179 (RXXR motif) dando lugar a una mutación activante de función del FGF23 al codificar una proteína resistente a la fragmentación.<sup>10,13,28-30</sup>

**Tabla 2.** Fenotipo y tipo de herencia de 13 familias portadoras de casos de raquitismo hipofosfatémico.

Familia	Paciente	Sexo	Edad diag	Herencia	Fenotipo
I	1	F	1.7 años *	AD	M
I	2	F	Adulto	AD	L
I	3	M	Niñez	AD	L
I	4	F	Adulto	AD	M
II	1	M	2.0 años *	LX o AD?	G
II	2	M	1.1 años	LX o AD?	G
II	3	F	Niñez	LX o AD?	G
III	1	M	2.0 años*	LX	G
III	2	F	Niñez	LX	G
IV	1	M	0.8 años*	LX	G
IV	2	F	Niñez	LX	G
IV	3	F	Niñez	LX	G
V	1	F	3.3 años*	LX	M
V	2	F	48 años	LX	L
V	3	F	19 años	LX	L
V	4	M	22 años	LX	L
VI	1	F	2 años*	LX	G
VI	2	F	1 año*	LX	G
VI	3	F	Niñez	LX	G
VII	1	F	1,4 años*	LX	G
VII	2	F	50 años	LX	L
VIII	1	F	5 años*	LX	G
VIII	2	F	1 año	LX	G
VIII	3	F	Niñez	LX	G

El asterisco señala el propósito. F: femenino, M: masculino, AD: autosómico dominante; LX: ligado al cromosoma X; L: leve; M: moderado; G: grave.

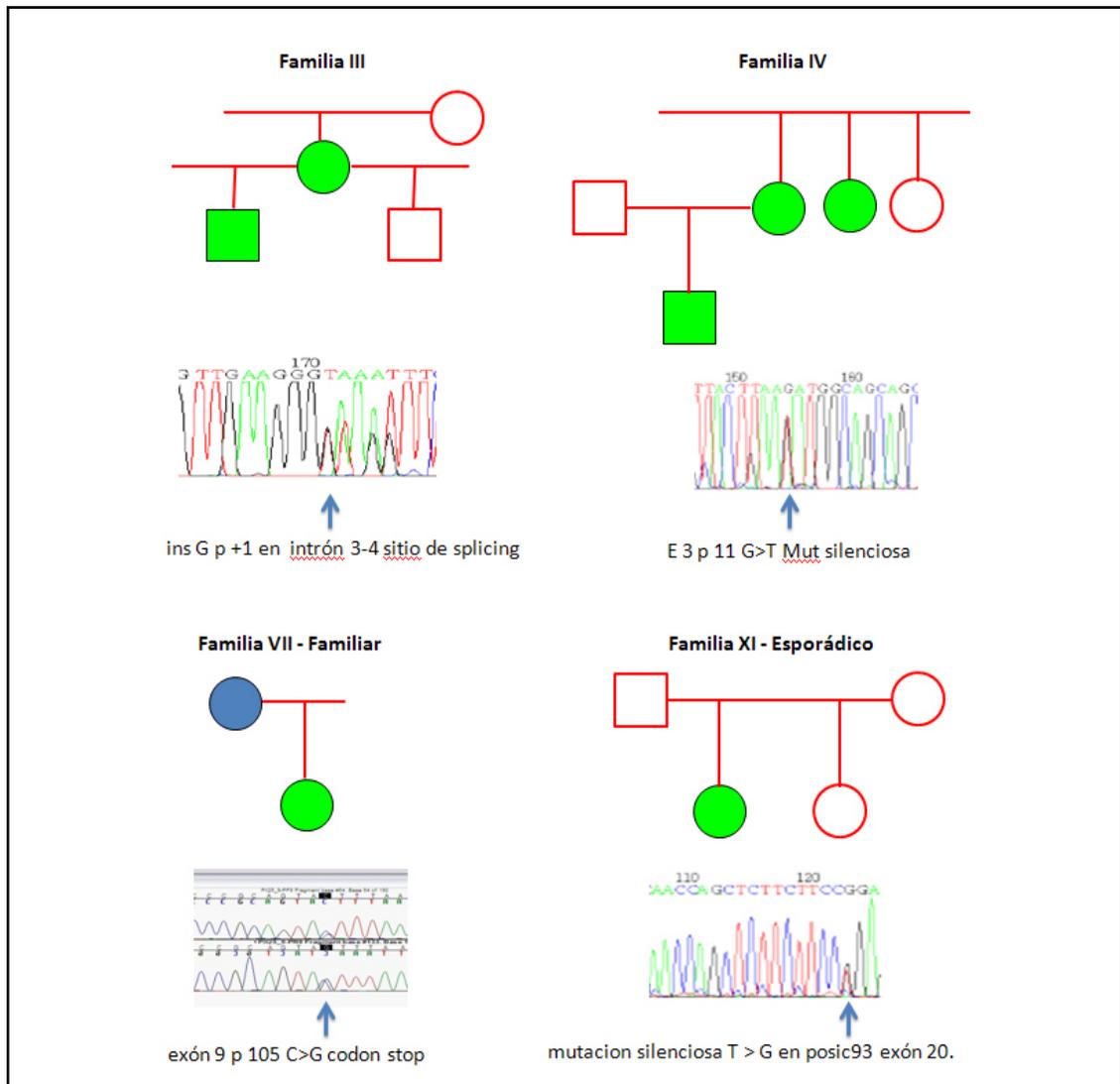


En nuestra observación hemos comprobado una alta frecuencia de RH familiar cuya base molecular se adscribe a mutaciones del gen PHEX, que también fue hallada en 2 de 5 casos esporádicos. Se ha detectado una mutación activante del gen FGF23 en una familia que presentaba RH con herencia autosómica dominante. No se hallaron mutaciones de los genes PHEX o FGF23 en 1 familia y 3 casos esporádicos.

Este estudio coincide con otras series más

extensas<sup>16,17,31-33</sup> en las cuales se han evaluado casos familiares y esporádicos siendo la alteración del gen PHEX el genotipo más frecuente.

El raquitismo autosómico dominante y el recesivo son raras formas de presentación.<sup>16,32,34</sup> Gaucher y col.,<sup>16</sup> Ruppe y col.,<sup>32</sup> Kinoshita y col.<sup>34</sup> detectaron en sus estudios, 1 familia con RH autosómico dominante por alteración del gen FGF23 en 118 *pedigrees*, 27 familias y 27 pacientes respectivamente. Estos estudios de-



**Figura 3.** Alteraciones del gen PHEX no reportadas en la literatura. Se describen en 4 tipos de alteraciones, 3 en casos familiares y uno correspondiente a un caso esporádico.

**Tabla 3.** Fenotipo y genotipo hallado en 5 familias evaluadas por caso índice. Se asume como casos esporádicos.

Familia	Paciente	Sexo	Edad diagnóstico	Herencia	Fenotipo	Genotipo
IX	1	F	1,5 años	?	G	-
X	1	M	1.0 años	?	G	-
XI	1	F	2.0 años	?	M	PHEX
XII	1	F	1,7 años	?	M	-
XIII	1	F	28 años <sup>#</sup>	?	G	PHEX

<sup>#</sup> Caso de presentación post parto, presentaba manifestaciones somáticas de osteomalacia y bioquímica caracterizada por hipofosfatemia, hiperfosfaturia, calcemia normal baja, hiperparatiroidismo, calcitriol no detectable, fosfatasa alcalina elevada.

muestran que la causa más frecuente de RH es secundaria a mutaciones del gen PHEX tanto en formas familiares como esporádicas.

El predominio de sexo femenino es característico de nuestra serie y también se comprueba en otros estudios.<sup>15,17,24,33,35</sup>

En nuestro trabajo comprobamos alteraciones del gen PHEX en el 75% de los casos familiares (6 de 8 familias) y en el 44% de los casos esporádicos (2 de 5 casos). Esta prevalencia coincide con estudios previos<sup>36-38</sup> en los cuales se utilizó un método similar de estudio molecular que el utilizado en nuestra investigación: SSCP/HD y secuenciación directa de las regiones con patrón de bandas alterado. En estos trabajos se detectaron variaciones del gen PHEX en el 55%,<sup>36</sup> 74%,<sup>37</sup> 45,5%,<sup>38</sup> respectivamente de todos los casos (familiares y esporádicos). Las mutaciones halladas se localizaron en exones frecuentes descritos en el consorcio PHEX y la literatura.<sup>16,25,36,38</sup>

En estudios recientes se han detectado alteraciones genéticas del gen PHEX en el 100% de casos esporádicos,<sup>17</sup> 100% de familiares y esporádicos<sup>34</sup> 91% de casos familiares y 73% (esporádicos)<sup>16</sup> utilizando nuevas técnicas como MLPA: *multiple ligation probe amplification* (en inglés) que detecta con alta sensibilidad deleciones e inserciones genómicas, PCR en tiem-

po real [*High resolution melting curve technique* (HRM)] y estudio del ARNm.<sup>17,16,33,34</sup>

Los pacientes con RHLX presentaron un fenotipo grave en su mayoría, sin embargo se observaron casos leves en familiares asintomáticos (madre, tía y primos) evaluados para establecer el genotipo familiar (familias V y VII).

Como describen otros estudios,<sup>16,24</sup> no se relacionaron fenotipos según alteraciones del genotipo. Muchos autores sostienen que las formas con importantes deleciones generan proteínas truncadas asociándose a fenotipos más graves. Holm y col.<sup>24</sup> no verificó diferencias significativas en aquellos genotipos que codifican proteínas truncadas versus los otros. Por el contrario Morey y col.<sup>17</sup> verificaron un fenotipo más grave en aquellos genotipos que codificaban proteínas truncadas; la diferencia se adscribe a que detectaron un mayor número de mutaciones en esta serie por el uso técnicas más complejas.

La familia V de nuestra casuística, presenta una mutación en el exón 2 cercano al extremo 5'UTR, fue la única que expresó en sus miembros un fenotipo moderado a leve. La mutación *missense*, no determina cambios estructurales graves en la proteína y además se especula que el sitio alterado codifica zonas no tan importantes como las descritas a partir del exón 13 hasta el extremo 3'UTR que



**Tabla 4.** Alteraciones moleculares del gen PHEX halladas en formas familiares y esporádicas de presentación.

Familia	Exón	ADNc	Efecto de la Mutación	Herencia
III	I 3-4	c. 552 +1insG*	Splicing alterado	F
IV	E 3	c. 401 C >A*	Mutación silenciosa	F
V	E 2	c.378 T>C	Mutación missense (p.Cis60Arg)	F
VI	E 21	c. 2341delC	Frame shift	F
VII	E 9	c.1241 C>G*	Codon stop	F
VIII	E 8 E 8 + E 13	c.1053 - 1G>A c.1136 +41 A>G c.1482+22del T	Splicing alterado Splicing alterado?	F
XI	E 20	c.2260 T>G*	Mutación silenciosa	E
XIII	E 8	c. 1136 +41A>G	Splicing alterado?	E

F: familiar, E: esporádico \* *mutación no descrita previamente*

codifican residuos cistina y el sitio de unión del zinc de la proteína.<sup>16,17,24,36</sup>

La paciente de la familia XIII expresó su enfermedad en forma tardía, en situaciones de alto requerimiento de fósforo luego del embarazo. Este caso esporádico presentó además hiperparatiroidismo secundario previo al tratamiento. Los casos de aparición de la enfermedad en periodos tardíos de la vida han sido descriptos en el consorcio PHEX db.mcgill.ca y en diferentes series.<sup>16,17,34,35,39</sup> La presencia de hiperparatiroidismo es un tema de controversia, sin embargo en la serie de Morey y col.<sup>17</sup> algunos pacientes presentaron hiperparatiroidismo antes del inicio del tratamiento con sales de fósforo y también se describe esta posibilidad en otra revisión.<sup>7</sup>

No se observaron alteraciones del gen PHEX ni FGF23 en una familia con herencia dominante y en tres casos esporádicos. La madre y los dos

hijos varones afectados presentaban un fenotipo grave (familia II). La falta de detección puede adscribirse al método de estudio del gen ya comentado arriba. Por otra parte se ha descrito indemnidad de ADN en pacientes con fenotipo característico de RHLX y detección de variaciones estructurales en el ARNm que codifica la metaloproteasa (*splicing alterado*).<sup>17,34</sup> Esta familia tiene un tipo de herencia autosómica dominante o ligada al X y es poco probable que se trate de alteraciones de genes vinculados a los RHAR.<sup>7,8</sup>

En relación a los 3 casos esporádicos en los que no se hallaron mutaciones, se especula que otros genes no evaluados podrían ser causales del RH como DMP1 o ENPP1, previamente descrito en los casos de RHAR.<sup>7,8</sup>

Cuatro mutaciones nuevas se hallaron en el gen PHEX en esta serie: tres en familias, y un

caso, considerado esporádico. Una de ellas fue una mutación intrónica atribuida al nucleótido más cercano al exón contiguo que determinó un *splicing* alterado. La mutación observada en el exón 9 determina un codón stop. Las restantes fueron mutaciones silentes no descritas en la literatura. Existen dudas sobre la relación entre el reemplazo de un único nucleótido y la ocurrencia de enfermedad, especialmente en la familia XI donde un solo miembro está afectado. Las nuevas mutaciones halladas se localizan en la zona del intrón 1-3 y exones 3, 9 y 20, sitios del ADN que codifican los residuos de cistina de alta presencia en diferentes especies de mamíferos.<sup>16,24,38</sup>

Es de interés destacar que en las últimas publicaciones se registran nuevas mutaciones del gen<sup>16,17,32,34,35,40-42</sup> y el notable incremento del registro de nuevas mutaciones en el consorcio PHEX db.mcgill.ca, desde el inicio de este estudio, 2008. La base de datos fue consultada en distintos momentos de este trabajo, constándose un incremento cercano a 100 nuevas mutaciones.

En una misma familia (VIII), hemos hallado varias mutaciones en el exón 8 (dos tipos de mutaciones) y en el exón 13 en diferentes individuos, configurando un fenotipo grave en todos los miembros estudiados. Esta observación de diferentes mutaciones en distintos exones de miembros de una misma familia fue descrita también en otras series investigadas; algunas de ellas corresponden a polimorfismos.<sup>16</sup>

Se ha descubierto en esta serie de RH, una familia con mutaciones del gen FGF23; sus miembros presentaron una expresión fenotípica moderada o leve y distintos momentos de aparición de la enfermedad. El fenotipo fue en el caso índice moderado, madre leve, abuela moderada y de aparición tardía, tío de manifestación en la niñez y mejoría clínico-bioquímico en la adultez. Nuestra familia coincide con las descripciones clásicas de RHAD los cuales se agrupan en dos

formas clínicas: un grupo que presenta pérdida renal aislada de fósforo, dolor óseo, debilidad muscular y a veces fracturas pero sin deformidades de las extremidades inferiores especialmente observada en adolescentes y adultos. El otro grupo se presenta en la primera infancia con pérdida de fósforo, raquitismo, trastorno del crecimiento y deformidades de las piernas. Mientras que en la mayor parte de los pacientes la hipofosfatemia persiste en la edad adulta, algunos pierden el trastorno de reabsorción de fosfato luego de la pubertad, como parece haber ocurrido en el tío del caso índice de la familia (datos no mostrados).<sup>7,8</sup>

### Conclusiones

Se detectaron mutaciones del PHEX en la mayoría de los casos especialmente en los familiares. Describimos 4 nuevas mutaciones del gen PHEX no consignadas (PHEX db.mcgill.ca). Si bien se observaron diferentes tipos de mutaciones, el fenotipo fue similar en las distintas familias. El RHAD presentó un fenotipo menos grave y de variable manifestación entre los miembros de la familia.

Se aconseja la evaluación genética en las manifestaciones clínicas esporádicas y tardías; son frecuentes las mutaciones del PHEX y su detección descarta otras enfermedades como tumores inductores de osteomalacia que son de lenta expresión clínica.

El estudio molecular de los genes PHEX y FGF23 es una herramienta útil para establecer diagnóstico, tratamiento temprano, pronóstico y consejo genético para los pacientes y su descendencia.

### Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

(Recibido: junio 2014.  
Aceptado: julio 2014)



## Referencias

1. Winters RW, Graham JB, Williams TF, et al. A genetic study of familial hypophosphatemia and vitamin D-resistant rickets with review of the literature. *Medicine* 1958; 37:97-142.
2. Bianchine JW, Stambler AA, Harrison HE. Familial hypophosphatemic rickets showing autosomal dominant inheritance. *Birth Defects Or Artic Ser* 1971; 7:287-94.
3. HYP Consortium: A gene (PEX) with homologies to endopeptidases is mutated in patients with X-linked hypophosphatemic rickets. *Nat Genet* 1995; 11:130-6.
4. Holm IA, Nelson AE, Robinsin BG, et al. Mutational analysis and genotype-phenotype correlation of the PHEX gene in X-linked hypophosphatemic rickets. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:3889-99.
5. Christie PT, Harding B, Nesbit MA, Whyte MP, Thakker RV. X-linked hypophosphatemia attributable to pseudoexons of the PHEX gene. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:3840-4.
6. Carpenter TO, Imel EA, Holm IA, Jan de Beur SM, Insogna KL. A clinician's guide to X-linked hypophosphatemia. *J Bone Miner Res* 2011; 26:1381-8.
7. Carpenter TO. The expanding family of hypophosphatemic syndromes. *J Bone Miner Metab* 2012; 30:1-9.
8. Ruppe M, Jan de Beur, S Disorders of Phosphate Homeostasis Chap 74. In *The Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*, 8th Edition, 2013. Editor Rosen CJ.
9. Scriver CR, MacDonald W, Reade T, Glorieux FH, Nogrady B. Hypophosphatemic nonrachitic bone disease: An entity distinct from X-linked hypophosphatemia in the renal defect, bone involvement, and inheritance. *Am J Med Genet* 1977; 1:101-17.
10. ADHR Consortium: Autosomal dominant hypophosphatemic rickets is associated with mutations in FGF23. *Nat Genet* 2000; 26:345-8.
11. White KE, Carn G, Lorenz-Depiereux B, Benetpages A, Strom TM, Econs MJ. Autosomal-dominant hypophosphatemic rickets (ADHR) mutations stabilize FGF 23. *Kidney Int* 2001; 60:2079-86.
12. Bai XY, Miao D, Goltzman D, Karaplis AC. The autosomal dominant hypophosphatemic rickets R176Q mutation in fibroblast growth factor 23 resists proteolytic cleavage and enhances biological potency. *J Biol Chem* 2003; 278:9843-9.
13. Shimada T, Muto T, Urakawa I, et al. Mutant FGF-23 responsible for autosomal dominant hypophosphatemic rickets is resistant to proteolytic cleavage and causes hypophosphatemia in vivo. *Endocrinology* 2002; 143:3179-82.
14. Bastene M, Jüppner H. Inherited hypophosphatemic disorders in children and the evolving mechanisms of phosphate regulation. *Rev Endocr Metab Disord* 2008; 9:171-180
15. Holm IA, Huang X, Kunkel LM. Mutational analysis of the PEX gene in patients with X-linked hypophosphatemic rickets. *Am J Hum Genet* 1997; 60:790-7.
16. Gaucher C, Walrant-Debray O, Nguyen TM, Esterle L, Garabédian M, Jehan F. PHEX analysis in 118 pedigrees reveals new genetic clues in hypophosphatemic rickets. *Hum Genet* 2009; 125:401-11.
17. Morey M, Castro-Feijóo L, Barreiro J, et al. Genetic diagnosis of X-linked dominant Hypophosphatemic Rickets in a cohort study: tubular reabsorption of phosphate and 1,25(OH)<sub>2</sub>D serum levels are associated with PHEX mutation type. *BMC Med Genet* 2011; 12:116.
18. Gribaa M, Younes M, Bouyacoub Y, et al. An autosomal dominant hypophosphatemic rickets phenotype in a Tunisian family caused by a new FGF23 missense mutation. *J Bone Miner Metab* 2010; 28:111-5.
19. Econs MJ, McEnery PT. Autosomal dominant hypophosphatemic rickets/osteomalacia: clinical characterization of a novel renal phosphate-wasting disorder. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:674-81.
20. Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE, Sandstrom DW, Stone EM. The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis

- for the detection of single base substitutions. *Genomics* 1993; 16:325-32.
21. Hayashi K. PCR-SSCP: a method for detection of mutations. *Genet Anal Tech App* 1992; 9:73-9.
  22. Kozłowski P, Krzyżosiak WJ. Economical protocol for combined single-strand conformation polymorphism and heteroduplex analysis on a standard capillary electrophoresis apparatus. *Methods Mol Biol* 2010; 653:181-92.
  23. Dixon PH, Christie PT, Wooding C, et al. Mutational analysis of PHEX gene in X-linked hypophosphatemia. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:3615-23.
  24. Holm IA, Nelson AE, Robinson BG, et al. Mutational analysis and genotype-phenotype correlation of the PHEX gene in X-linked hypophosphatemic rickets. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:3889-99.
  25. Consorcio PHEX db.mc gill.ca [ingreso 6 de julio 2014]
  26. Pettifor JM, Thandrayen K. Hypophosphatemic rickets: unraveling the role of FGF23. *Calcif Tissue Int* 2012; 91:297-306.
  27. Prié D, Friedlander G. Genetic disorders of renal phosphate transport. *N Engl J Med* 2010; 362:2399-409
  28. Econs MJ, McEnery PT, Lennon F, Speer MC. Autosomal dominant hypophosphatemic rickets is linked to chromosome 12p13. *J Clin Invest* 1997; 100:2653-7.
  29. Econs MJ, McEnery PT. Autosomal dominant hypophosphatemic rickets/osteomalacia: clinical characterization of a novel renal phosphate-wasting disorder. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:674-81.
  30. Imel EA, Hui SL, Econs MJ. FGF23 concentrations vary with disease status in autosomal dominant hypophosphatemic rickets. *J Bone Miner Res* 2007; 22:520-6.
  31. Dixon PH, Christie PT, Wooding C, et al. Mutational analysis of PHEX gene in X-linked hypophosphatemia. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:3615-23.
  32. Ruppe MD, Brosnan PG, Au KS, Tran PX, Dominguez BW, Northrup H. Mutational analysis of PHEX, FGF23 and DMP1 in a cohort of patients with hypophosphatemic rickets. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2011; 74:312-8.
  33. Beck-Nielsen SS, Brixen K, Gram J, Brusgaard K. Mutational analysis of PHEX, FGF23, DMP1, SLC34A3 and CLCN5 in patients with hypophosphatemic rickets. *J Hum Genet* 2012; 57:453-8.
  34. Kinoshita Y, Saito T, Shimizu Y, et al. Mutational analysis of patients with FGF23-related hypophosphatemic rickets. *Eur J Endocrinol* 2012; 167:165-72.
  35. Durmaz E, Zou M, Al-Rijjal RA, et al. Novel and de novo PHEX mutations in patients with hypophosphatemic rickets. *Bone* 2013; 52:286-91.
  36. Rowe PS, Oudet CL, Francis F, et al. Distribution of mutations in the PEX gene in families with X-linked hypophosphatemic rickets (HYP). *Hum Mol Genet* 1997; 6:539-49.
  37. Francis F, Strom TM, Hennig S, et al. Genomic organization of the human PEX gene mutated in X-linked dominant hypophosphatemic rickets. *Genome Res* 1997; 7:573-85.
  38. Dixon PH, Christie PT, Wooding C, et al. Mutational analysis of PHEX gene in X-linked hypophosphatemia. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:3615-23.
  39. Igaki JM, Yamada M, Yamazaki Y, et al. High iFGF23 level despite hypophosphatemia is one of the clinical indicators to make diagnosis of XLH. *Endocr J* 2011; 58:647-55.
  40. Jap TS, Chiu CY, Niu DM, Levine MA. Three novel mutations in the PHEX gene in Chinese subjects with hypophosphatemic rickets extends genotypic variability. *Calcif Tissue Int* 2011; 88:370-7.
  41. Cheon CK, Lee HS, Kim SY, Kwak MJ, Kim GH, Yoo HW. A novel de novo mutation within PHEX gene in a young girl with hypophosphatemic rickets and review of literature. *Ann Pediatr Endocrinol Metab* 2014; 19:36-41.
  42. Yue H, Yu JB, He JW, et al. Identification of two novel mutations in the PHEX gene in Chinese patients with hypophosphatemic rickets/osteomalacia. *PLoS One* 2014; 9:e97830.