



UNIVERSIDAD DE GRANADA

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA CLÍNICA
Y SALUD PÚBLICA**

DEPARTAMENTO DE MEDICINA
FACULTAD DE MEDICINA

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO POBLACIONAL DE HIPOFOSFATASIA EN LA
PROVINCIA DE GRANADA Y CARACTERIZACIÓN
FUNCIONAL Y ESTRUCTURAL DE LAS VARIANTES
GENÉTICAS IDENTIFICADAS**

Juan Miguel Villa Suárez
Granada, 2021

UNIVERSIDAD DE GRANADA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA
FACULTAD DE MEDICINA

**ESTUDIO POBLACIONAL DE HIPOFOSFATASIA EN LA
PROVINCIA DE GRANADA Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL
Y ESTRUCTURAL DE LAS VARIANTES GENÉTICAS
IDENTIFICADAS**

Memoria presentada para aspirar al Grado de Doctor por el
Licenciado en Farmacia D. Juan Miguel Villa Suárez

Doctorando

Fdo. D. Juan Miguel Villa Suárez

Directores de la Tesis:

Fdo. D. Manuel Muñoz Torres
Catedrático de Universidad
Departamento de Medicina
Facultad de Medicina
Universidad de Granada

Fdo. Dña. Beatriz García Fontana
Investigadora posdoctoral
CIBERFES (ISCIII)
Instituto de Investigación Biosanitaria
De Granada (ibs.GRANADA)
Hospital Universitario Clínico San Cecilio

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Juan Miguel Villa Suárez
ISBN: 978-84-1117-210-3
URI: <http://hdl.handle.net/10481/72366>

El trabajo de investigación que se expone en esta Memoria Doctoral ha sido realizado en la Unidad de Gestión Clínica de Laboratorios Análisis Clínicos del Hospital Universitario Clínico San Cecilio de Granada y en el Instituto de Investigación Biosanitaria De Granada (ibs.GRANADA), bajo la dirección del Dr. Manuel E. Muñoz Torres y de la Dra. Beatriz García Fontana.

Este trabajo ha sido financiado por la Instituto de Salud Carlos III (Contrato Rio Hortega con N° de expediente: CM19/00188) y por Alexion.

El doctorando **Juan Miguel Villa Suárez** y los directores de tesis, **Manuel Muñoz Torres** y **Beatriz García Fontana** garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, 26 de octubre de 2021

Doctorando

Fdo. D. Juan Miguel Villa Suárez

Directores de la Tesis:

Fdo. D. Manuel Muñoz Torres
Catedrático de Universidad
Departamento de Medicina
Facultad de Medicina
Universidad de Granada

Fdo. Dña. Beatriz García Fontana
Investigadora posdoctoral
CIBERFES (ISCIII)
Instituto de Investigación Biosanitaria
De Granada (ibs.GRANADA)
Hospital Universitario Clínico San Cecilio

*“El futuro tiene muchos nombres.
Para los débiles es lo inalcanzable.
Para los temerosos, lo desconocido.
Para los valientes es la oportunidad.”*

Víctor Hugo.

A mis abuelos

A mis padres y hermanos

A Cristina, mi inspectora favorita

AGRADECIMIENTOS

Quiero dar mis agradecimientos a todas esas personas que me han acompañado durante todos estos años en este apasionante proyecto de investigación y que me han ayudado a crecer personal y profesionalmente, haciendo posible que, a día de hoy, me disponga a presentar y defender mi Tesis Doctoral con orgullo.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi director de tesis, el Dr. Manuel Muñoz Torres por haberme iniciado en el mundo de la investigación clínica. Su nivel de conocimientos y exigencia han sido esenciales para alcanzar los excelentes resultados de la presente tesis. Gracias por su confianza en mí y espero que podamos seguir colaborando en futuros proyectos. Ha sido todo un honor trabajar a tu lado.

A mi codirectora, la Dra. Beatriz García Fontana, por su dedicación, apoyo y orientación en todo momento. Todo un ejemplo de profesionalidad y compromiso. Has sido el pilar fundamental para el desarrollo de mi tesis, por ello, tienes todo mi respeto y admiración.

A la Dra. Cristina García Fontana, por colaborar estrechamente conmigo en la mayor parte de la tesis y por estar siempre dispuesta a ayudar en todo momento en el proceso de la misma. Todo empezó contigo con aquel proyecto inicial, y ahora que ya lo hemos culminado, me alegra haberte tenido al lado.

Gracias a las dos gemelas por vuestro trabajo y entrega, ha sido todo un privilegio teneros como compañeras y amigas. Sin vosotras todo hubiera sido mucho más complicado. Echaré de menos esas entregas de memorias de proyectos tres minutos antes de finalizar el plazo.

Al Dr. Tomás de Haro Muñoz, por la confianza depositada en mí al haberme ofrecido el proyecto inicial de la tesis. Gracias a ti puedo estar redactando hoy estas líneas. Gracias por el asesoramiento y ayuda brindado en todo momento, eres todo un referente para mí.

A la Dra. María del Señor López Vélez, por sus consejos, por su apoyo incondicional y por haber confiado siempre en mí. Has sido una excelente tutora y amiga durante toda la residencia. Tu trabajo y constancia me han servido de inspiración y espero poder seguir trabajando a tu lado durante muchos años.

Agradecer a todas aquellas otras personas del laboratorio del Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada que han colaborado en la realización de este proyecto. Gracias a Curro, Raquel, Luis y Sheila por enseñarme vuestros conocimientos y ofrecerme de forma desinteresada vuestra gran ayuda en investigación básica en todo momento. En especial a mi amiga Sheila González Salvatierra, quien más me ha tenido aguantar por el laboratorio estos

años y a la que le estaré eternamente agradecido por todo su apoyo y por alegrarme las mañanas con su buen humor.

También me gustaría agradecer a Sara, Anaïs, Julia, JD, David, Ángel y María por todo sus ánimos y buenos momentos que han hecho más llevadero el trabajo de laboratorio.

A mis compañeros del Hospital Universitario Clínico San Cecilio y Hospital Universitario Virgen de la Nieves por su ayuda y confianza en mi durante todos estos años. En especial a Amada, Carmen, María Luz, Jennifer, Claudia, Andrea, Teresa, Mikel, Trini y María del Mar, con quienes compartí mis años de residencia. Al mejor microbiólogo, Adolfo de Salazar, por todo su apoyo durante estos años, por organizar los mejores viajes y por lo buenos momentos tanto fuera como dentro del Hospital. A la mejor compañera de inmuno, la Dra Paola Montes, por su ayuda y consejos. Y por supuesto a todo el personal del laboratorio de análisis clínicos, tanto facultativos, residentes, técnicos de laboratorio, enfermeras, celadores y secretarías.

A todos mis compañeros de piso, Javi, Fran, Franchi y Pedro, por vuestra confianza y consejos y por compartir tantos buenos momentos a lo largo de estos años.

El mayor de los agradecimientos a toda mi familia por su confianza en mi y por ser uno de los pilares de mi vida. A mis padres, porque les debo todo lo que soy y por haber sabido educarme en los mejores valores de humildad, respeto, responsabilidad y esfuerzo. Gracias por darme la oportunidad de ser quien soy. A mis hermanos, por su incondicional apoyo y consejos. Por ser los mejores hermanos que se puedan tener. Gracias a mi cuñado y mis cuñadas, que además de amigos sois mis hermanos. Gracias por formar parte de mi vida. Gracias en especial a mi hermano y cuñada por haberme hecho tito de la simpática y traviesa Blanca y del pequeño Gonzalo que viene en camino. Gracias también a mi suegro Ramón, por su confianza en mi y por hacerme sentir parte de su familia. A mis abuelos que ya no están con nosotros, porque estén donde estén sé que estarán muy orgulloso de mi y siempre los llevaré en mi corazón. A mi abuela Maruja, quien ha sido siempre una segunda madre. Gracias por creer siempre en mi, por la transmitir siempre esa alegría que te caracteriza y por ser un ejemplo de esfuerzo y superación.

Me gustaría terminar agradeciendo a una de las personas más importante de mi vida y a mi compañera de viaje, Cristina Guirado. Gracias por tu confianza en mi, tu apoyo día a día, tu paciencia en aquellos días de agobios, por tu amor incondicional, por estar siempre ahí y por ser como eres. Gracias por ser un ejemplo de trabajo y perseverancia para mi. Estoy convencido que serás la mejor inspectora de España.

CONTENIDO

ABREVIATURAS	1
ÍNDICE DE FIGURAS	3
ÍNDICE DE TABLAS	4
1. INTRODUCCIÓN	5
PUESTA AL DÍA EN HIPOFOSFATASIA	7
1.1. HISTORIA	8
1.2. EPIDEMIOLOGIA: PREVALENCIA DE HPP	9
1.3. ETIOLOGÍA Y MECANISMO DE ALP	9
1.4. FUNCIÓN FISIOLÓGICA DE TNSALP	11
1.4.1. Mineralización ósea y dental	11
1.4.2. Síntesis de neurotransmisores y actividad neuronal	14
1.4.3. Función de TNSALP en Hígado	15
1.4.4. Función de TNSALP en Riñón	16
1.4.5. Papel de TNSALP en la Calcificación vascular	16
1.4.6. TNSALP y la microbiota intestinal	16
1.4.7. TNSALP y Alzheimer	17
1.4.8. TNSALP como ATPasa	17
1.5. ISOENZIMAS DE ALP	18
1.6. GENÉTICA DE ALP	20
1.6.1. Herencia y efecto dominante negativo	21
1.6.2. Regulación del gen ALPL	22
1.7. ESTRUCTURA DE ALP	23
1.7.1. Sitio activo	23
1.7.2. Valle del sitio activo	23
1.7.3. Hélice α del brazo N-terminal	24
1.7.4. Dominio corona interfacial "Crown domain"	24
1.7.5. Dominio de unión al calcio (M4)	24
1.7.6. Interfaz del homodímero	25
1.8. SUSTRATOS DE TNSALP	26
1.8.1. Pirofosfato inorgánico (PPi)	26
1.8.2. Píridoxal-5'-fosfato	26
1.8.3. Fosfoetanolamina (PEA)	26
1.8.4. Osteopontina	27
1.9. DIAGNÓSTICO DE HPP	27
1.10. CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO	33
1.11. MANIFESTACIONES Y FORMAS CLÍNICAS DE LA HIPOFOSFATASIA	34
1.11.1. Hipofosfatasia perinatal letal	36
1.11.2. Hipofosfatasia del lactante	37
1.11.3. Hipofosfatasia infantil	39
1.11.4. Hipofosfatasia del Adulto	40
1.11.5. Odontohipofosfatasia	41
1.11.6. Hipofosfatasia "prenatal benigna"	43
1.12. TRATAMIENTO	45
2. HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN	49
3. OBJETIVOS	52
OBJETIVO A: ESTUDIO RETROSPECTIVO	54
OBJETIVO B: ESTUDIO PROSPECTIVO	54
4. METODOLOGÍA Y POBLACIÓN DE ESTUDIO	56
4.1. ÁMBITO GEOGRÁFICO	58
4.2. POBLACIÓN DE ESTUDIO	58
4.3. PREVALENCIA	58
4.4. CRITERIOS DE INCLUSIÓN	58
4.5. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	59
4.6. DISEÑO DEL ESTUDIO	59
4.6.1. Estudio Retrospectivo	59
4.6.2. Estudio Prospectivo	62

4.7.	LIMITACIONES DEL ESTUDIO RETROSPECTIVO Y PROSPECTIVO:	63
4.8.	VARIABLES DE LOS ESTUDIOS:	63
4.8.1.	<i>Variables clínico-demográficas:</i>	63
4.8.2.	<i>Variables analíticas</i>	64
4.9.	ESTUDIO DE CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL Y ESTRUCTURAL DE LAS NUEVAS VARIANTES IDENTIFICADAS	65
4.9.1.	<i>Diseño de vectores de expresión</i>	65
4.9.2.	<i>Transformación de Escherichia coli JM109 (E. coli JM109) con los distintos plásmidos</i>	66
4.9.3.	<i>Cultivo de células renales HEK293T</i>	67
4.9.4.	<i>Transfección transitoria de células HEK293T</i>	68
4.9.5.	<i>Determinación de la actividad enzimática de ALP</i>	68
4.9.6.	<i>Determinación de la expresión transcripcional de ALP</i>	68
4.9.7.	<i>Modelado tridimensional de la proteína TNSALP</i>	69
4.9.8.	<i>Análisis estadístico</i>	70
5.	RESULTADOS	72
5.1.	ESTUDIO RETROSPECTIVO	74
5.1.1.	<i>Filtrado de pacientes en la población adulta</i>	74
5.1.2.	<i>Características bioquímicas y clínicas en adultos</i>	75
5.1.3.	<i>Resultados genéticos en la población adulta</i>	76
5.1.4.	<i>Filtrado de pacientes en la población pediátrica</i>	77
5.1.5.	<i>Resultados bioquímicos, genéticos y clínicos en población pediátrica</i>	78
5.1.6.	<i>Caracterización funcional de las dos nuevas variantes genéticas identificadas</i>	79
5.1.7.	<i>Expresión relativa de mRNA de las dos nuevas variantes genéticas identificadas</i>	79
5.1.8.	<i>Efecto de las nuevas variantes genéticas a nivel estructural mediante modelaje tridimensional de la estructura TNSALP</i>	80
5.2.	ESTUDIO PROSPECTIVO.....	81
5.2.1.	<i>Filtrado de pacientes</i>	81
5.2.2.	<i>Resultados genéticos</i>	82
5.2.3.	<i>Características bioquímicas y clínicas</i>	83
5.2.4.	<i>Caracterización funcional de las tres variantes de significado incierto en modelo celular in vitro</i>	84
5.2.5.	<i>Expresión relativa de mRNA de variantes de significado incierto</i>	85
5.2.6.	<i>Efecto de las mutaciones de significado incierto mediante modelaje tridimensional de la estructura de TNSALP</i>	85
6.	DISCUSIÓN	88
6.1.	ESTUDIO RETROSPECTIVO.....	90
6.2.	ESTUDIO PROSPECTIVO	94
6.2.1.	<i>Variantes descritas previamente</i>	95
6.2.2.	<i>Nuevas variantes genéticas no descritas previamente</i>	98
6.2.3.	<i>Variantes de significado incierto</i>	99
6.2.4.	<i>Pacientes con bioquímica y clínica compatible con HPP, pero con estudio genético negativo</i>	102
6.3.	DISCUSIÓN GENERAL	103
7.	CONCLUSIONES	107
8.	BIBLIOGRAFÍA	111
9.	RESUMEN	130
	ANEXO 1: CUESTIONARIO DE CALIDAD DE VIDA, MODELO EQ-5D	134
	ANEXO 2: FORMULARIO DE INFORMACIÓN Y CONSENTIMIENTO INFORMADO ESCRITO PARA LA PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN:	136
	ANEXO 3: CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL CDB DEL HOSPITAL CLÍNICO DE BARCELONA	138

ABREVIATURAS

ALP	Fosfatasa alcalina
ALPL	Gen de la fosfatasa alcalina no específica de tejidos
ADA	Adenosina desaminasa
ALPI	Gen de la fosfatasa alcalina intestinal
ALPP	Gen de la fosfatasa alcalina placentaria
ALPP2	Gen de la fosfatasa alcalina de las células germinales
ANK	Transportador de pirofosfato
ATP	trifosfato de adenosina
BALP	Fosfatasa alcalina ósea humana
bFGF	factor de crecimiento básico de fibroblastos
BMP2	Proteína morfogénica ósea 2
CDB	Centro de Diagnóstico Biomédico
CMLV	Células del músculo liso vascular
CPPD	Dihidrato de pirofosfato de calcio
CRMO	Osteomielitis multifocal crónica recurrente
DMO	Densidad mineral ósea
DNE	Efecto dominante negativo
DXA	Absorciometría dual de rayos X
ECAP	Fosfatasa alcalina de <i>E. coli</i>
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ENPP1	Ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa
ENTPD/CD39	Ectonucleótido trifosfato difosfohidrolasa
G-CSF	factor estimulante de colonias de granulocitos
GABA	Ácido gammaaminobutírico
GAD	Glutamato descarboxilasa
GCALP	Fosfatasa alcalina células germinales
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
HA	Hidroxiapatita
HPP	Hipofosfatasa
IALP	Fosfatasa alcalina intestinal
IFCC	International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine
KO	Knockout
LPS	Lipopolisacárido
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno
NPP1	Nucleótido pirofosfato fosfodiesterasa 1
NT5E/CD73	Ecto-50-nucleotidasa
OPN	Osteopontina
PALP	Fosfatasa alcalina placentaria

PAP	Fosfatasa ácida prostática
PC	Fosfocolina
PCR	Proteína C reactiva
PEA	Fosfoetanolamina
Pi	Fosfato inorgánico
PKA	Proteína quinasa dependiente de AMPc
PL	Piridoxal
PLP	Piridoxal-5'-fosfato
pNP	p-nitrofenol
pNPP	P-nitrofenil fosfato
PPi	Pirofosfato inorgánico
PTH	Parathormona
mRNA	RNA mensajero
SNC	Sistema Nervioso Central
TGFb	Factor de crecimiento beta
TLR4	Receptor 4 tipo Toll
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TNSALP	Fosfatasa alcalina no especifica de tejido
TSAP	Fosfatasa alcalina especifica de tejido
UGCL	Unidad de Gestión Clínica de Laboratorios
VM	Vesículas de matriz

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura modelada en 3D de PLAP de los oligosacáridos unidos a N y el anclaje GPI.....	10
Figura 2. Propagación de mineralización esquelética.....	12
Figura 3. Mineralización esquelética mediada por VM.....	14
Figura 4. Enzimas involucradas en el catabolismo de ATP para formar adenosina, y regulación de la relación ATP/adenosina en la señalización purinérgica.....	18
Figura 5. Estructura y zonas sensibles de mutación de la TNSALP.....	25
Figura 6. Actividad ferroxidasa sobre la actividad de ALP y metabolismo de PPi en hemocromatosis. ..	29
Figura 7. Algoritmo diagnóstico de HPP.....	32
Figura 8. Hipofosfatasa perinatal letal.	37
Figura 9. Hipofosfatasa del lactante.	38
Figura 10. Hipofosfatasa infantil.	40
Figura 11. Hipofosfatasa del adulto.	41
Figura 12. Odontohipofosfatasa.....	42
Figura 13. Representación de la estructura y mecanismo de asfotasa alfa.....	47
Figura 14. Algoritmo diagnóstico de HPP llevado a cabo en la UGCL.....	61
Figura 15. Estructura del plásmido pcDNA 3.1.....	66
Figura 16. Diagrama de flujo del reclutamiento de pacientes potencialmente afectados por HPP de la población adulta.	74
Figura 17. Niveles séricos de ALP y PLP en presencia o ausencia de mutaciones en el gen ALPL.....	76
Figura 18. Niveles séricos de ALP y PLP en pacientes con presencia o ausencia de fracturas.....	77
Figura 19. Diagrama de flujo del reclutamiento de pacientes potencialmente afectados por con HPP de la población pediátrica.....	78
Figura 20. Determinación de actividad ALP en células HEK293T transfectadas y no transfectadas. ...	79
Figura 21. Expresión transcripcional normalizada de ALPL WT y de los nuevos mutantes usando RPL13 como housekeeping.....	80
Figura 22. Modelado 3D de TNSALP WT y las correspondientes variantes identificadas en el estudio retrospectivo.	81
Figura 23. Determinación de actividad ALP en células HEK293T transfectadas y no transfectadas. ...	84
Figura 24. Expresión transcripcional normalizada de ALPL WT y de los nuevos mutantes usando RPL13 como housekeeping.....	85
Figura 25. Representación tridimensional de la proteína TNSALP en forma de cintas.....	86
Figura 26. Representación tridimensional de la proteína TNSALP en función de su hidrofobicidad.....	87

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Resumen de la nomenclatura de genes para las distintas isoenzimas de ALP humana, incluyendo nombres comunes, distribución en tejidos, funciones principales, la localización cromosómica y los números de acceso.....</i>	21
<i>Tabla 2. Situaciones clínicas asociadas a la disminución de la actividad de fosfatasa alcalina.</i>	29
<i>Tabla 3. Presentación clínica de HPP, diagnóstico diferencial y herencia</i>	44
<i>Tabla 4. Valores de referencia de ALP estratificados por edad y sexo usados durante estudio retrospectivo.</i>	60
<i>Tabla 5. Valores de referencia de ALP estratificados por edad y sexo basados en el estudio CALIPER para población pediátrica y en los estándares de la IFCC para población adulta.</i>	62
<i>Tabla 6. Características clínicas, niveles de ALP, niveles de PLP y estudio genético en población adulta. Estudio Retrospectivo.....</i>	75
<i>Tabla 7. Características clínicas, niveles de ALP, niveles de PLP y estudio genético en la población pediátrica. Estudio Retrospectivo.....</i>	78
<i>Tabla 8. Características clínicas, niveles de ALP, niveles de PLP y estudio genético en población adulta. Estudio Prospectivo.....</i>	83
<i>Tabla 9. Características clínicas, niveles de ALP, niveles de PLP y estudio genético en población pediátrica. Estudio Prospectivo.....</i>	84

1. INTRODUCCIÓN

PUESTA AL DÍA EN HIPOFOSFATASIA

La hipofosfatasia (HPP) es una enfermedad genética rara causada por una mutación de pérdida de función en el gen que codifica la fosfatasa alcalina no específica de tejido (TNSALP) (1–3).

La HPP se considera un error innato del metabolismo presentado una expresión muy variable, pero que suele estar implicado en un defecto en la mineralización del hueso y los dientes (4). Los síntomas de la HPP varían ampliamente desde las formas más graves del trastorno que aparecen típicamente antes del nacimiento y en la infancia y que a menudo conducen a la muerte, hasta las formas más leves con afectación en la mineralización dental en adultos.

En general, la gravedad de la enfermedad está inversamente relacionada con la edad en el momento del diagnóstico (a excepción de la HPP benigna), siendo la HPP perinatal letal e infantil las formas más graves. Las formas graves se caracterizan por debilidad muscular e hipomineralización del esqueleto. Los bebés afectados nacen con extremidades cortas, un tórax de forma anormal y huesos del cráneo blandos, así como convulsiones epilépticas causadas por un metabolismo anormal del piridoxal-5'-fosfato (PLP) (5). Las formas más leves pueden incluir la pérdida temprana de los dientes temporales, el ablandamiento de los huesos y las fracturas recurrentes en los huesos del pie y del muslo relacionadas con el dolor crónico. Los adultos afectados pueden perder dientes de forma prematura y tienen un mayor riesgo de dolor e inflamación de las articulaciones (6).

Tanto los signos clínicos, como los hallazgos de laboratorio (niveles bajos persistentes de fosfatasa alcalina (ALP) y niveles altos de PLP, los hallazgos radiográficos y los estudios genéticos son necesarios para diagnosticar y clasificar la gravedad de la HPP (7). Sin embargo, debido al solapamiento de los síntomas clínicos de la HPP con la sintomatología común de otras enfermedades más prevalentes como la osteoporosis u osteomalacia entre otras, probablemente exista una gran proporción de la población afectada que esté infradiagnosticada o mal diagnosticada con otros trastornos (8).

1.1. Historia

La ALP fue descubierta por primera vez en 1923 por Robert Robison quien descubrió una fosfatasa abundante en el esqueleto, cuya función posiblemente fuera la de generar fosfato inorgánico (Pi) fundamental para la mineralización ósea (9). Posteriormente se descubrió que el pirofosfato inorgánico (PPi) era un sustrato natural de la enzima que actúa como inhibidor de la mineralización (10,11).

La primera referencia de HPP en la literatura médica inglesa fue atribuida por algunos al Dr. Bruce Chown de la Universidad de Manitoba, Winnipeg. En 1936, Chown describió a dos hermanas de ascendencia galesa que presentaron hipercalcemia y que murieron a los 3 y 6 meses, respectivamente. Sin embargo, Chown no pudo definir la naturaleza bioquímica del supuesto error innato del metabolismo al que llamó "raquitismo renal" (12–14). El término hipofosfatasa fue descrito por primera vez en 1948 por John C. Rathbun tras observar anomalías en el desarrollo de un bebé de 9 semanas con raquitismo y convulsiones que provocaron su muerte. Tras realizar la autopsia, este paciente presentó una actividad de fosfatasa alcalina baja tanto en suero, como en huesos y otros tejidos (1,2).

En 1953, Sobel describió la pérdida prematura de la dentición decidua como una característica esencial en los niños afectados de HPP (15). Posteriormente se definieron las distintas isoenzimas de ALP presente en los distintos tejidos, vinculándose la enzima a la mineralización ósea y estableciéndose la HPP como un error innato del metabolismo (9).

Más tarde, se caracterizó la HPP como una patología hereditaria (2). En la mayoría de los casos, las HPP de herencia recesiva suelen ser graves y mortales en la infancia (16). Sin embargo, en 1960 se describieron a 2 hermanas de 40 años con HPP grave que presentaron problemas esqueléticos desde la infancia (17).

Estudios de autopsia en pacientes con HPP observaron que la deficiencia de actividad de ALP se encontraba localizada fundamentalmente en hueso, hígado y riñón, mientras que la actividad de ALP en el intestino y la placenta (en trofoblastos fetales) era normal (18,19).

Esta observación corroboró una reducción selectiva de la actividad de todas las isoformas de TNSALP en HPP (20).

En 1988, la caracterización de TNSALP permitió el descubrimiento en ese mismo año de la primera mutación TNSALP, encontrada en un bebé consanguíneo con HPP (2,21). En la actualidad han sido descritas más de 400 mutaciones de TNSALP (<https://alplmutationdatabase.jku.at>).

1.2. Epidemiología: prevalencia de HPP

La HPP es una enfermedad genética muy rara. Esto unido a la gran similitud de sus síntomas con los de otras patologías óseas más comunes, dificulta la estimación de la prevalencia real de la enfermedad.

En Canadá, la prevalencia de las formas más graves de HPP al nacer se estimó en 1: 100.000 en la población general según los registros pediátricos del Hospital for Sick Children de Toronto (2,13,16). En este país, la prevalencia más alta de HPP se ha descrito en la comunidad menonita de Manitoba, donde aproximadamente 1 de cada 25 personas porta una mutación en el gen *ALPL* (22,23) y 1 de cada 2500 recién nacidos tiene HPP grave (2) asociado a un efecto fundador (24).

En los EE. UU., la HPP parece ser significativamente menos prevalente en población con ascendencia africana (2,16), estimándose una prevalencia de formas graves de 1: 100.000 en América del Norte (13). En Japón, la prevalencia de HPP se estimó en 1:900,000 debido a la mutación homocigota c.1559delT que representa el 41% de los alelos HPP (16).

En 2011, se estimó una prevalencia de HPP en Europa de 1:300.000 para las formas graves utilizando la base del número de casos procedentes de Francia durante 10 años, mientras que para las formas moderadas la estimación fue de 1:6.370 basado en pacientes afectados de HPP en 20 países europeos, siendo esta cifra 47 veces más alta que la frecuencia de pacientes afectados con HPP grave (13,16). La frecuencia estimada de portadores de la mutación en *ALPL* en Europa es de alrededor de 1/300, pero se estima que solo el 4% de los portadores heterocigotos expresan HPP leve (25).

1.3. Etiología y mecanismo de ALP

Las fosfatasas alcalinas (Ortofosfórico monoéster fosfohidrolasa, EC 3.1.3.1) forman una gran familia de enzimas díméricas comunes a todos los organismos (2,26).

Son glucoproteínas que se unen a la membrana plasmática a través de una molécula de anclaje de glucosilfosfatidilinositol (GPI) (Figura 1) (3,27). Esta molécula permite el movimiento de la enzima al mejorar la fluidez de la membrana (11). La liberación de la enzima puede ocurrir a través de la acción de dos fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol que se encuentran en las membranas plasmáticas, GPI-PLC y GPI-PLD, para luego pasar a la circulación sanguínea de forma libre y homodimérica (11,27,28). Ambas enzimas de escisión están presentes en humanos; pero GPI-PLC se encuentra en niveles más bajos en suero en comparación con GPI-PLD, que es abundante en la circulación (28).

Aunque las ALPs son enzimas diméricas, algunos informes han demostrado la existencia de formas tetraméricas de la enzima e incluso han sugerido que el estado tetramérico es el estado normal in vivo (27).

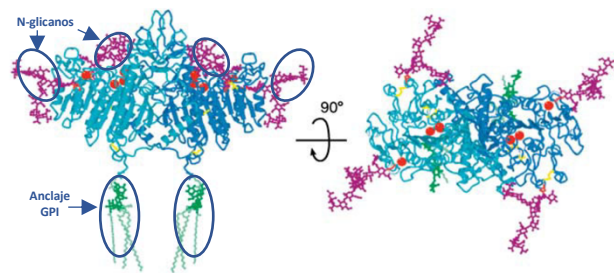


Figura 1. Estructura modelada en 3D de PLAP de los oligosacáridos unidos a N y el anclaje GPI.

El glicano complejo ligado a N se modeló añadiéndolo en N122 y en N249. En azul claro, los péptidos; en rojo, los iones metálicos cristalográficos; en amarillo, los enlaces disulfuro; en púrpura, los N-glicanos; en verde, la estructura del anclaje GPI (27,29).

La ALP es fisiológicamente activa en su forma dimérica y escinde los sustratos extracelulares PLP y PPI, siendo estos sustratos naturales de TNSALP basados en estudios de pacientes con HPP y fibroblastos y ratones *ALPL* knockout (KO) (3,11).

Las ALPs de mamíferos son metaloenzimas cuyo centro activo contiene dos iones Zn^{2+} y un ion Mg^{2+} esenciales para la actividad de la enzima. Además, estos iones metálicos contribuyen sustancialmente a la conformación del monómero ALP, así como a la regulación indirecta de las interacciones subunidad-subunidad (30,31). Hay estudios que demuestran que las ALPs de mamíferos son enzimas alostéricas en las que ambos monómeros actúan independientemente cuando están presentes los iones metálicos en ambas subunidades. Se pueden formar además heterodímeros como consecuencia de las interacciones de las subunidades, formándose enzimas que son estructuralmente menos asimétricas de lo esperado y que tienen propiedades catalíticas divergentes de los homodímeros originales. Por lo tanto, las ALPs de mamíferos son enzimas alostéricas no cooperativas, pero la conformación de la segunda subunidad de la ALP controla la estabilidad y las propiedades catalíticas de cada monómero (31). Para la actividad catalítica de la enzima se requiere la homodimerización de los monómeros TNSALP (2). Estudios de transfección han demostrado que ciertas mutaciones en *ALPL* disminuyen la expresión del gen, comprometen la estabilidad del ARNm, conducen a la inactivación de la enzima al alterar sus diversos dominios o dan como resultado el secuestro intracelular de la proteína naciente (2,32).

Las ALPs son enzimas conocidas como fosfomonoesterasas que actúan catalizando la hidrólisis de monoésteres fosfato con la liberación de fosfato inorgánico (Pi) y un alcohol, azúcar, fenol, etc. a valores de pH básicos (pH 8-11) siguiendo la siguiente reacción general (27,30):



El mecanismo catalítico tras observar la estructura de la fosfatasa alcalina de *E. coli* (ECAP) se cree que es similar en eucariotas, ya que, aunque presentan una baja similitud en sus secuencias (entre un 25-30%), se conservan los residuos involucrados en el sitio activo de la enzima y los ligandos que coordinan los dos átomos de zinc y el ion magnesio (26).

1.4. Función fisiológica de TNSALP

Exceptuando el papel que desempeña TNSALP en la mineralización esquelética normal, aún se conoce poco sobre la función fisiológica que desempeña en la mayoría de los tejidos (30).

1.4.1. Mineralización ósea y dental

En el esqueleto, TNSALP se localiza en la superficie de los osteoblastos anclada a la membrana celular basolateral, donde la enzima está particularmente enriquecida (29). TNSALP también está anclada a la membrana de las vesículas de matriz (VM) liberadas por osteoblastos y condrocitos de la placa de crecimiento (33). TNSALP puede liberarse a la circulación sanguínea, donde se encuentra como un homodímero (34), por la acción de dos fosfolipasas circulantes, GPI-fosfolipasa C y GPI-fosfolipasa D (más abundante en la circulación sanguínea) (28).

El papel de TNSALP en la matriz ósea consiste en la generación del Pi necesario para la cristalización de hidroxapatita. La mineralización comienza en los condrocitos hipertróficos, los osteoblastos y los odontoblastos mediante la generación de las VM derivadas de la membrana plasmática de estos. Las VM son vesículas con membrana invertida de 50–200 nm de diámetro y son ricas en anexinas A2, A5 y A6, y en Ca²⁺-ATPasa, TNSALP, nucleótido pirofosfato fosfodiesterasa 1 (NPP1) (un cotransportador de sodio-fosfato [Na/Pi]), anteriormente conocido como PC-1, Pit1 y PHOSPHO1 (35).

El primer paso del proceso de mineralización ocurre dentro de las VM, donde se forman cristales de hidroxapatita (Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂) (36). Para ello, la fosfolipasa C hidroliza los fosfolípidos de membrana, liberando el fosfato esencial para la formación de fosfocolina (PC) y fosfoetanolamina (PEA) (37). La PHOSPHO1 es una fosfatasa citosólica abundante en las VM que actúa hidrolizando estos fosfocompuestos para producir Pi (38).

El cotransportador de Pit1, que también es abundante en las VM, es otra fuente importante de Pi. En las VM también existen canales de anexinas de Ca^{2+} (A2, A5 y A6) que actúan incorporando el Ca^{2+} a las vesículas. El Ca^{2+} junto con el Pi generarán los cristales de hidroxiapatita dentro de la VM. Una vez formados los cristales de hidroxiapatita (HA), estos se dirigirán hacia la membrana de la VM para luego salir al espacio extracelular donde se produce su expansión. Para completar la mineralización de la matriz extracelular, se requiere la participación de TNSALP y la presencia de colágeno fibrilar, como el tipo I (en hueso y dentina) y el tipo II (en cartílago de la placa de crecimiento) (36,39). Las fibrillas de colágeno son necesarias para proporcionar un soporte para la expansión de cristales de HA (29). La TNSALP se encuentra anclada a la membrana de las vesículas de matriz (VM) liberadas por osteoblastos y condrocitos de la placa de crecimiento (40). En la inmediación extracelular, TNSALP promoverá la hidrólisis del pirofosfato inorgánico (PPi) creando constituyentes para la mineralización ósea, denominados cristales de hidroxiapatita (HA) los cuales se asociarán a fibrillas de colágeno de las placas de crecimiento óseo (41).

De acuerdo a los resultados observados en VM deficientes en TNSALP tanto en humanos como en ratones, estas contienen cristales de apatita, pero retrasándose la propagación de cristales extravesiculares, demorando por tanto el crecimiento óseo (11,42). Esto podría deberse a una falta de actividad pirofosfatasa de TNSALP o a la falta de generación de Pi (Figura 2) (27).

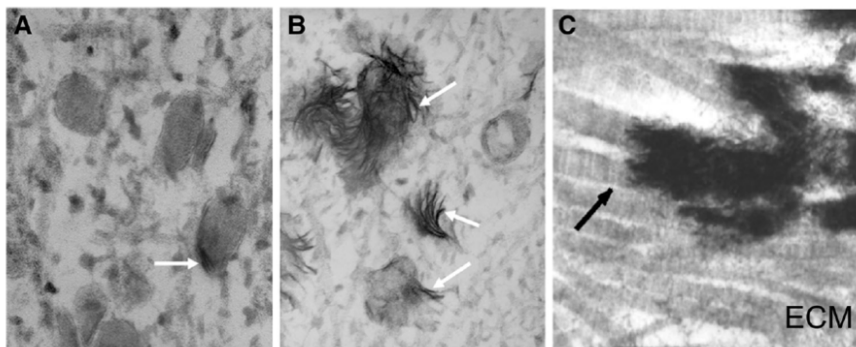


Figura 2. Propagación de mineralización esquelética.

Imágenes de microscopía electrónica de barrido de VM que muestran; A) minerales confinados al interior de las vesículas, B) minerales que se rompen a través de las membranas de VM y C) minerales que se propagan al andamio de colágeno (11).

Por otro lado, TNSALP puede actuar hidrolizando PPi (potente inhibidor de la mineralización ósea) en la membrana de las VM, generando Pi y promoviendo la formación de HA y el crecimiento óseo (27,35). El PPi se puede formar en la matriz extracelular a partir de ATP por la enzima NPP1, situada en la membrana plasmática de las VM. El PPi proviene del metabolismo celular basal del citoplasma, también puede ser transportado al interior de VM mediante el transportador ANK (35). La propagación extravesicular de minerales en la matriz de colágeno está controlada principalmente por la actividad pirofosfatasa de TNSALP que restringe la concentración de PPi y establece una relación Pi/PPi propicia para la calcificación controlada (11).

La importancia de la relación Pi/PPi ha sido demostrada por ratones knockout (KO) de los genes que codifican TNSALP, NPP1 o ANK. Los ratones TNSALP KO (Akp2^{-/-}) muestran hipomineralización. Los ratones NPP1 KO (Enpp1^{-/-}) muestran calcificación del cartilago articular y de la aorta (43).

La mutación del gen ENPP1 humano causa calcificación arterial infantil idiopática (44). Los ratones ANK KO (ank^{-/-}) presentan hipercalcificación de vértebras y articulaciones, lo que conduce a anquilosis progresiva (45). Animales doble KO de TNSALP (Akp2^{-/-}) y NPP1 (Enpp1^{-/-}) o ANK (ank/ank) muestran un esqueleto aparentemente normal, lo que indica que TNSALP, NPP1 y ANK regulan la mineralización en conjunto (46).

Además, la osteopontina (OPN), otro potente inhibidor de mineralización que se une al mineral de HA tan pronto como se expone al líquido extracelular, también controla el grado de mineralización de la matriz extracelular (11).

En pacientes con HPP, la baja actividad de TNSALP causa una actividad mineralizante defectuosa con hipomineralización de huesos y dientes debido a que los cristales de HA extracelular se reducen y la mineralización se ve afectada (35). Sin embargo, en estos pacientes la mineralización sí que ocurre dentro de las VM formadas, debido a la presencia de otras fosfohidrolasas como ATPasa, PHOSPHO1 o 5'-AMPasa en el interior de estas VMs que pueden iniciar la mineralización a pesar de una deficiencia de actividad catalítica de TNSALP (41).

Los pacientes con HPP muestran un aumento de tejido osteoide con abundante matriz ósea extracelular desmineralizada sin cristales de HA, que conduce al raquitismo y la osteomalacia (47). Se demostró a través del análisis de ratones con HPP, que los odontoblastos mineralizan la dentina a través de la producción de VM y de la regulación de la relación Pi/PPi (48) mediante la TNSALP corrigiendo el cemento acelular (49), confirmando que la relación Pi/PPi también está involucrada en la regulación de la mineralización de la matriz del esmalte (29).

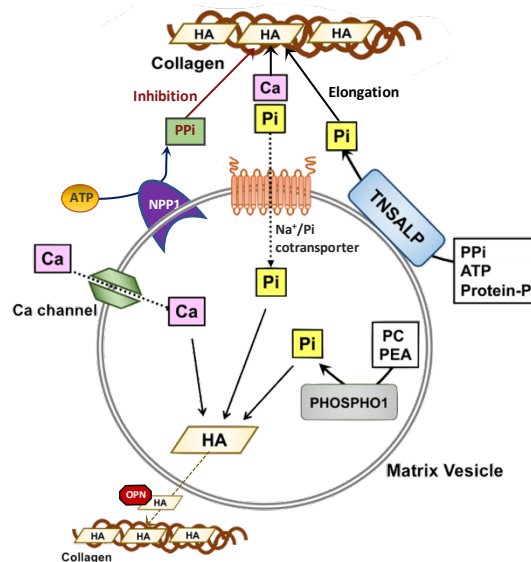


Figura 3. Mineralización esquelética mediada por VM.

Las VM son pequeñas vesículas derivadas de la membrana plasmática de osteoblastos y condrocitos. La fosfatasa alcalina inespecífica de tejidos (TNSALP) en la membrana externa de las VM hidroliza el PPi (inhibidor de la mineralización), la adenosina trifosfato (ATP) y el fosfato unido a proteínas para producir Pi. Otra fosfatasa, PHOSPHO1 produce Pi a partir de PC y PE dentro de las VM. El Pi fuera de VM es transportado al interior de las VM en parte por los co-transportadores de Na⁺/Pi tipo III PiT-1 y PiT-2. El Ca²⁺ proporcionado por los canales de anexina Ca²⁺ y los iones Pi captados por las VM se cristalizan para formar HA. Posteriormente, la HA se transporta fuera de las VM donde se alarga en las fibrillas de colágeno para mineralizar la matriz extracelular usando el Pi y el Ca²⁺ extracelular. El PPi extracelular también es proporcionado por ANKH, un transportador de PPi de la membrana plasmática. La mineralización está regulada por el equilibrio de estas tres moléculas, NPP1, ANK (H) y TNSALP.

Abreviatura: Pi: fosfato inorgánico; PEA: fosfoetanolamina; PPi: pirofosfato; PC: fosfocolina; HA: hidroxiapatita; TNSALP: fosfatasa alcalina no específica de tejido; Cotransportador de Na⁺/Pi: transportador de fosfato de sodio; osteopontina (OPN); NPP1: nucleótido pirofosfato fosfodiesterasa 1. (50).

1.4.2. *Síntesis de neurotransmisores y actividad neuronal*

La TNSALP presenta un papel muy importante en la síntesis de neurotransmisores y la actividad neuronal regulando el metabolismo de la vitamina B6 (29). Particularmente actúa sobre el PLP, un derivado de la vitamina B6 que parece ser un sustrato fisiológico para TNSALP en suero y/o en leucocitos (51).

Tras la ingestión de vitamina B6 fosforilada, esta es desfosforilada por la fosfatasa alcalina intestinal (IALP), y la cantidad resultante de esta, así como la piridoxina, piridoxal (PL) y piridoxamina-5'-fosfato (PMP) ingeridos, son absorbidos rápidamente a nivel intestinal por un proceso de difusión mediado por transportador (52). Luego se absorben en la circulación portal hepática donde se convierten en PLP y secreta en el plasma unido en

gran medida a la albúmina. Antes de entrar en las células neuronales, el PLP libre en el plasma debe desfosforilarse a PL, el cual puede atravesar membranas, para luego fosforilarse a PLP y PMP dentro de las neuronas para actuar intracelularmente como cofactores (2,53,54). TNSALP está involucrado en la biosíntesis del ácido gammaaminobutírico (GABA) en el Sistema Nervioso Central (SNC) a partir de PLP y glutamato, mediante la enzima glutamato descarboxilasa (GAD). El GABA actúa como el principal neurotransmisor inhibitor cerebral (55). Estudios realizados en ratones TNSALP KO (Akp2^{-/-}) muestran que la ausencia de actividad de TNSALP conduce a una deficiencia intracelular de los precursores de vitamina B6 y a una disminución de la capacidad para mantener la homeostasis celular de la vitamina B6, alterando la actividad normal de la glutamato descarboxilasa y la síntesis de neurotransmisores como la serotonina o el GABA en el cerebro (53,55). Todo ello, junto con el acúmulo de PLP (52), parece ser el origen de las crisis epilépticas incluso la muerte por apnea en pacientes con HPP (29,52,56), debido a la hiperactividad del SNC ocasionada por la reducción del GABA en las células neuronales (57,58). Aunque casi todos los pacientes con convulsiones responden a la piridoxina, las convulsiones también pueden estar asociadas con la presión intracraneal elevada debido a craneosinostosis, hipercalcemia e hipoxia (3,35). Además de su papel en la síntesis de neurotransmisores, TNSALP puede estar involucrada en la diferenciación de células neuronales durante el desarrollo embrionario (29).

1.4.3. Función de TNSALP en Hígado

Una proporción significativa de TNSALP presente en la circulación sanguínea es originada en el hígado. TNSALP se expresa en hepatocitos humanos, tanto en el polo sinusoidal como en el biliar del hepatocito. Los ácidos biliares aumentan la actividad de TNSALP (59) y su secreción a la bilis (60). Los niveles séricos de ALP total son de gran relevancia clínica como marcadores de colestasis, ya que pueden verse aumentados debido al reflujo retrógrado de la ALP biliar, a una síntesis hepática elevada como respuesta fisiológica del hígado ante la obstrucción del conducto biliar, así como por la inducción de la isoenzima IALP (29,60,61). Una función importante de TNSALP en el hígado es eliminar por desfosforilación endotoxinas como los lipopolisacáridos (LPS). EL lípido A del LPS es la parte tóxica de la molécula, siendo el resto mejor conservado entre los serotipos de LPS de una variedad de bacterias gram negativas. La toxicidad viene determinada en gran medida por dos grupos fosfato acoplados a dos glucosaminas en la parte del lípido A (62). La desfosforilación de un solo grupo fosfato da como resultado un resto monofosforil lípido A no tóxico (63).

1.4.4. Función de TNSALP en Riñón

En el riñón humano, TNSALP se expresa a lo largo del túbulo proximal en los segmentos S1, S2 y S3 (64). La función de TNSALP en el riñón parece estar relacionada con el metabolismo de PPi y la detoxificación de LPS, aunque se necesitan más estudios para confirmar su función específica en riñón (29,65). Las personas con HPP son propensas a formar cálculos de calcio (nefrocalcinosis) y se ha visto que presentan una excreción urinaria reducida de PPi (66), y en un grupo de 107 pacientes con cálculos de calcio recurrentes, el cociente PPi/creatinina se redujo en comparación con los sujetos de control (67).

1.4.5. Papel de TNSALP en la Calcificación vascular

Las células del músculo liso vascular (CMLV) expresan varios marcadores de condrocitos y/o osteoblastos como TNSALP, sialoproteína ósea, osteocalcina y el factor de transcripción RUNX2 que están involucrados en el proceso de la calcificación aterosclerótica (29,68).

La diabetes tipo 2 está asociada con la calcificación vascular de la capa media que parece ser un indicador de la gravedad y duración de la diabetes tipo 2 relacionada con el grado glucemia (69). La calcificación asociada con la diabetes tipo 2, al igual que en la aterosclerosis, se acompaña de la expresión de marcadores de condrocitos y/o osteoblastos como el colágeno tipo II, TNSALP y osteocalcina por parte de las CMLV (70).

Varios estudios han demostrado que niveles elevados de proteína C reactiva (PCR) y citocinas inflamatorias se asocian con un aumento de la calcificación de la arteria coronaria (71,72). Las citoquinas inflamatorias, concretamente la TNF- α secretada por los macrófagos en las lesiones ateroscleróticas, estimula la expresión de TNSALP por parte de CMLV (29), por lo que parece que la inflamación puede ser un factor importante en el desarrollo de calcificación vascular (73).

1.4.6. TNSALP y la microbiota intestinal

La TNSALP está relacionada con la actividad de la IALP, que se puede ver afectada en función de vías moleculares no establecidas, pudiendo dar lugar a una alteración en la microbiota y en la permeabilidad intestinal dando lugar a procesos de inflamación intestinal (29). Los estudios recientes sobre la implicación de la IALP en la protección de la mucosa intestinal y la regulación de la microbiota intestinal mediante la desintoxicación de endotoxinas bacterianas, especialmente LPS y ATP proinflamatorio (74–76) han dado lugar a la exploración de otras funciones biológicas para TNSALP.

La microbiota intestinal juega un papel importante en el mantenimiento de la salud humana y su disbiosis provoca un desequilibrio patológico en la misma. Esta alteración de la microbiota intestinal está implicada en la patogénesis de diversas enfermedades, como la

enfermedad inflamatoria intestinal (77).. Se ha demostrado que la IALP ayuda a mantener la homeostasis intestinal actuando como defensa de la mucosa (78,79), así como un regulador clave de la inflamación, infección y microbiota intestinal principalmente a través de la desfosforilación de LPS (78). La disminución de la expresión de IALP se ha relacionado con un sobrecrecimiento bacteriano y posterior inflamación (79). IALP actúa inactivando LPS mediante la desfosforilación del lípido A, evitando así que su unión al receptor tipo toll 4 (TLR4) inicie una cascada de eventos que conducen a inflamación intestinal y sistémica (80). Además ejerce su efecto desfosforilante en moléculas proinflamatorias como la flagelina y trifosfato de adenosina (ATP) liberados por las células durante eventos estresantes (78). Se ha visto que los mecanismos de protección intestinal en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal están deteriorados debido a una menor síntesis y actividad de la IALP endógena, sin embargo el mecanismo de esta deficiencia enzimática sigue sin estar claro (78). La estrecha relación entre TNSALP y IALP, hace sospechar que los síntomas gastrointestinales observados en pacientes afectados por HPP no sean algo casual, sino que sean consecuencia de la disminución de la actividad de ALP derivada de esta enfermedad.

1.4.7. TNSALP y Alzheimer

En el hipocampo y en el suero de pacientes con enfermedad de Alzheimer se ha observado un aumento en la expresión y actividad de TNSALP, junto con un aumento en los niveles de proteína tau en comparación con los pacientes control sanos (63,81,82). Se podría afirmar que existe una correlación inversa entre la actividad de TNSALP con las funciones cognitivas (82), lo que sugiere que TNSALP puede estar involucrado en el proceso degenerativo. Además, se ha observado que la expresión y actividad de TNSALP están reguladas por la proteína tau extracelular desfosforilada en células neuronales humanas (81), lo que sugiere un círculo vicioso durante el cual TNSALP es estimulado por la proteína desfosforilada. Por lo tanto, la asociación entre la expresión de TNSALP y la enfermedad de Alzheimer merece una investigación más amplia y cuidadosa (29).

1.4.8. TNSALP como ATPasa

TNSALP también parece actuar como una ATPasa, siendo capaz de hidrolizar ATP a valores de pH básicos (pH 7.5-9.4) (83). En recién nacidos existe una alta actividad circulante de TNSALP, por lo que los niveles plasmáticos de adenosina antiinflamatoria se ven aumentados debido a la desfosforilación del ATP proinflamatorio (84). Además, TNSALP es una enzima que está involucrada en el metabolismo de las purinas, contribuyendo a la producción de adenosina no nociceptiva para las neuronas de los ganglios de la raíz dorsal somatosensorial y la médula espinal dorsal (85).

La deficiencia de TNSALP causa una alteración de la señalización purinérgica en ratones *ALPL* KO que podría aumentar la ratio ATP/adenosina. Dichos cambios pueden explicar las convulsiones, la hiperalgia y la alodinia observadas en ratones *ALPL* KO, y tal vez en pacientes con HPP grave (Figura 4) (11).

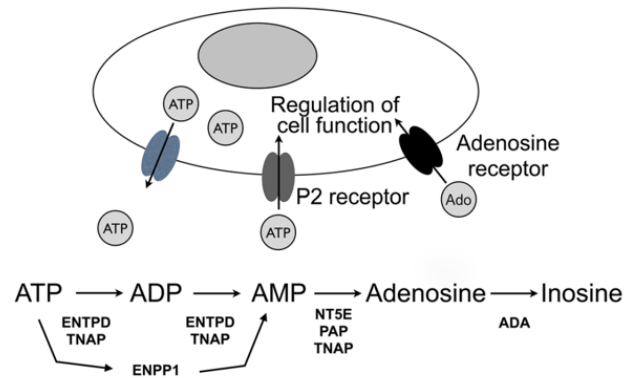


Figura 4. Enzimas involucradas en el catabolismo de ATP para formar adenosina, y regulación de la relación ATP/adenosina en la señalización purinérgica.

ENPP1: ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa, ENTPD/CD39: ectonucleótido trifosfato difosfohidrolasa, NT5E/CD73: ecto-50-nucleotidasa, PAP: fosfatasa ácida prostática, ADA: adenosina desaminasa, TNAP: fosfatasa alcalina no específica de tejido (11).

1.5. Isoenzimas de ALP

Las ALPs humanas se pueden clasificar en al menos cuatro isoenzimas, principalmente de acuerdo con la especificidad del tejido en el que expresan (30). Tres de las cuatro isoenzimas ALP son específicas de tejido: una es placentaria (PALP), la segunda de células germinales (GCALP) y la tercera intestinal (IALP), presentando una homología en sus secuencias aminoacídicas entre 90-98% (26) diferenciándose en su extremo carboxilo terminal (30).

La cuarta, TNSALP o fosfatasa alcalina “L/B/K” es idéntica a las otras tres en un 50%, y se puede encontrar de forma abundante en huesos, hígado y riñones (11,26), pero también en el sistema nervioso central, fibroblastos, endotelio, en la placenta durante el primer trimestre del embarazo y otros tipos de células (11).

TNSALP se expresa en gran variedad de tejidos de ahí su denominación de no específica de tejido. Sin embargo, se ha visto que su expresión es específica en distintos tejidos en función de la etapa durante el desarrollo embrionario, siendo predominante en el esqueleto en desarrollo en todas las especies de vertebrados (27).

En adultos sanos, las cantidades séricas de TNSALP procedente de hueso e hígado son equiparables. En bebés y niños sanos, y especialmente en adolescentes, la circulación se encuentra enriquecida en TNSALP de síntesis ósea (2).

La glicosilación es la forma más común de modificación postraduccional de proteínas y las cadenas de carbohidratos de las glicoproteínas influyen en las propiedades funcionales de las glicoproteínas (86). Existen dos tipos principales de glucanos, ligados a N y ligados a O. Los glucanos unidos a N están unidos a residuos de asparagina en un motivo Asn-X-Ser / Thr, y los glucanos unidos a O están unidos a serina o treonina (87).

La secuencia de DNAC de *ALPL* sugiere la presencia de cinco sitios de N-glicosilación, N123, N213, N254, N286 y N413 (11,29), donde se anclan las cadenas de azúcar necesarias para la actividad catalítica (11). TNSALP y PALP presentan una homología en las secuencias aminoacídicas del 74% (35), pudiéndose observar que aunque existen dos señales de N-glicosilación en sitios homólogos en TNSALP y PALP, la enzima TNSALP contiene tres señales de glicosilación adicionales que están ausentes en la PALP (30).

La glicosilación diferencial del gen *ALPL* da lugar a una familia de isoenzimas producidas por las células óseas, hepáticas y renales con diferentes propiedades biofísicas y cinéticas que difieren entre sí solo por modificaciones postraduccionales (2,11,30,88) que afectan a las actividades catalíticas de estas isoformas (29). Debido a que las isoenzimas ALP hepática, ALP renal y ALP ósea (BALP) son codificadas por el mismo locus genético, se les podría denominar como isoformas de la misma isoenzima TNSALP (88).

Se ha confirmado que tanto BALP como la ALP hepática están N-glicosiladas (89). Las diferencias entre el hueso y el hígado también pueden deberse a diferencias en la O-glicosilación. BALP parece estar O-glicosilada, mientras que la ALP hepática no (88).

La isoenzima ósea BALP puede diferenciarse en el tejido óseo a su vez en tres isoformas (B1, B2 y B / I) (88) y se ha descubierto una cuarta isoforma (B1x) en pacientes con enfermedad renal crónica (90) y en tejido óseo (91). De las cuatro isoformas, B/I, B1 y B2 son las que se encuentran comúnmente en la circulación (92), la isoforma B/I (hueso / intestino) no es una isoforma ósea "pura" ya que se asocia con la ALP intestinal circulante, compuesta en un 70% de BALP y 30% de ALP intestinal. Se ha observado que la isoforma B2 presenta valores significativamente más altos de k_{cat}/K_M (mayor especificidad por el sustrato) en comparación con las otras isoformas BALP para todos los sustratos pNPP, PPi, PLP y PEA. Las isoformas BALP presentan diferentes propiedades catalíticas debido a diferencias estructurales debido a la N-glicosilación postraduccional (88).

1.6. Genética de ALP

En los humanos, las ALPs (EC 3.1.3.1) están codificadas por cuatro genes tradicionalmente nombrados según los tejidos donde se expresan predominantemente (27,29,30) (Tabla 1). El gen *ALPL* (*ALPL*; NM_000478) codificante de TNSALP se encuentra en el brazo corto distal del cromosoma 1 (1p36 – p34), en la banda 1p36.12 (26,27), y más específicamente en la posición chr1: 21581175–21650208 (27). Consta de 12 exones, 11 de los cuales (exones 2–12) codifican cada monómero. Cada uno de los monómeros contienen un sitio activo generado por secuencias de nucleótidos conservadas evolutivamente (11). Los exones 2–12 están contenidos dentro de 25 kb de DNA y el exón adicional (exón 1) está en el extremo 5' de la región no codificante (5'UTR). La distancia entre los exones 1 y 2 es de al menos de 25 kb adicionales de DNA (30,93), estando distribuido el gen completo en aproximadamente 70 kb (3,30,94). Parece ser que el gen *ALPL* es al menos cinco veces más grande que los genes codificantes del resto de fosfatasas alcalinas específicas de tejido. Esto parece ser debido a la mayor longitud de tamaño de sus intrones (27,30) y en concreto al primer intrón que separa el exón 1 (que contiene solo secuencias no traducidas (5'UTR)) del exón 2 (que contiene parte del 5'UTR y el codón de inicio para la traducción) (27). Los intrones en los genes codificantes de las isoenzimas de ALP intestinal, placentaria y germinal son bastante más pequeños (74–425 pb) (30).

La HPP se produce por una mutación con pérdida de función en el gen *ALPL*. Se ha observado que este gen está sujeto a una alta heterogeneidad alélica (3) y se han descrito más de 400 mutaciones distintas (<http://ALPLmutationdatabase.hypophosphatasie.com>), en su gran mayoría mutaciones sin sentido (entorno al 74%) (95). Debido a esta gran variedad de mutaciones, la HPP presenta una expresividad clínica muy variable (3,26). Dicha expresión varía desde la muerte fetal por hipomineralización ósea hasta las fracturas múltiples que ocurren en edad adulta (26).

Las isoenzimas, PLAP, GCALP e IALP, están codificados por los genes *ALPP*, *ALPP2* y *ALPI* respectivamente, y muestran una expresión tisular mucho más restringida, de ahí el término general de fosfatasas específicas de tejido (27). Los genes codificantes de estas isoenzimas se encuentran agrupados en el cromosoma 2q37.1 (26). Cada isoenzima está codificada por diferentes loci genéticos (Tabla 1) (27,29,30).

Tabla 1. Resumen de la nomenclatura de genes para las distintas isoenzimas de ALP humana, incluyendo nombres comunes, distribución en tejidos, funciones principales, la localización cromosómica y los números de acceso.

Gen	Nombre de la proteína	Nombre común	Distribución en tejidos	Funciones principales	Localización cromosómica	Nº de acceso
<i>ALPL</i>	TNSALP	Fosfatasa alcalina no específica de tejido, fosfatasa alcalina tipo ósea-hepática-renal	SNC en desarrollo Esqueleto Hígado Riñón	Mineralización ósea y dental	Chr1: 21581174–21650208	NM_000478
<i>ALPP</i>	PLALP	Fosfatasa alcalina placentaria	Sincitiotrofoblasto, diversos tumores	Transporte y metabolismo placentario	Chr2: 233068964–233073097	NM_001632
<i>ALPP2</i>	GCALP	Fosfatasa alcalina de las células germinales	Testículos, trofoblastos malignos, cáncer testicular	Desconocido	Chr2: 233146369–233150245	NM_001631
<i>ALPI</i>	IALP	Fosfatasa alcalina intestinal	Intestino, influido por la alimentación grasa y el grupo ABO	Absorción y barrera intestinal, desintoxicación	Chr2: 233097057–233100922	NM_031313

1.6.1. Herencia y efecto dominante negativo

La expresión de la HPP puede transmitirse de forma autosómica dominante o recesiva. Los fenotipos clínicos más graves (perinatal letal/lactante) se transmiten como un rasgo autosómico recesivo, mientras que las formas más leves pueden ser causadas por una transmisión autosómica recesiva o dominante (95). La detección de una única mutación heterocigótica en un paciente con HPP de fenotipo leve con herencia autosómica dominante puede explicarse por mutaciones intrónicas o mutaciones en la secuencia reguladora o porque la mutación heterocigótica tenga un efecto dominante negativo (DNE) (96,97). Por lo tanto, un DNE de una mutación puede indicar una verdadera heterocigosidad, mientras que su ausencia puede sugerir una heterocigosidad compuesta debido a la existencia de otra mutación no detectada. El concepto general de una mutación DNE es que su polipéptido mutante reducirá la actividad de la proteína de tipo salvaje coexpresada. Un estudio genético describe las mutaciones DNE como antimorfos, lo que significa que el gen mutante antagonista tiene un efecto opuesto al gen del que se deriva (98). Un DNE modifica las propiedades estructurales y funcionales de homodímero de TNSALP comprometiendo las propiedades cinéticas de todo el dímero y conduciendo a la insuficiencia de TNSALP que se hereda de generación en generación (11). El DNE de las mutaciones puede probarse mediante cotransfección de ADNc mutados y Wild Type (WT) y medición posterior de la actividad ALP (96). Los casos de herencia autosómica dominante de HPP pueden explicarse por la disminución de la actividad del monómero de tipo salvaje en el complejo enzimático heterodimérico o por el secuestro y/o degradación del monómero de tipo salvaje en el

aparato de Golgi (2,96). El grupo de Mornet estimó que el 13.4% de los alelos de cromosomas con mutaciones asociadas a HPP tienen un DNE en la población europea (16).

1.6.2. Regulación del gen *ALPL*

La expresión del gen de TNSALP está regulada predominantemente por dos exones, Ia e Ib, sintetizados por a partir de dos RNA mensajeros (mRNA) ensamblados, diferentes solo por su región no traducida 5' (27,99,100). El promotor aguas arriba (Ia) es utilizado preferentemente por los osteoblastos (mRNA de tipo óseo) y el promotor aguas abajo (Ib) por el riñón y el hígado (mRNA de tipo hígado) (101).

Hay estudios que evidencian que algunos agentes pueden elevar los niveles de enzima TNSALP aumentando la expresión de los factores de transcripción específicos de los osteoblastos mediante la estabilización del mRNA de TNSALP (29).

Una combinación de 1,25-(OH)2D3 y TGF parece disminuir la represión del gen *ALPL* elevando los niveles de TNSALP (102), mientras que el factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF) reduce el nivel de TNSALP en células de osteosarcoma de rata ROS 17/2.8 (103).

Se ha visto que las células de osteosarcoma tratadas con 1,25-(OH)2D3 aumentan la tasa de transcripción del gen *ALPL* hasta 5 veces, mientras que la dexametasona aumenta los niveles de TNSALP hasta 7 veces en células ROS 17/2.8 de rata. Además del 1,25-(OH)2D3, el ácido ascórbico también es necesario para lograr la actividad máxima de TNSALP en las células ROS 17/2.8 de rata y MG-63 de osteosarcoma humano (27).

Las células ROS 17/2.8 poseen también receptores nucleares de hormonas tiroideas T3 y se descubrió que estas hormonas también estimulan la actividad TNSALP (27,104).

La expresión de gen de TNSALP se encuentra regulada además por la actividad de la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) a nivel de mRNA y proteínas (105), mientras que la proteína p38 regula la expresión de TNSALP durante la diferenciación de células osteoblásticas. También se ha desmostado que Smd3 induce la actividad de TNSALP y la mineralización en las células osteoblásticas MC3T3-E1, mientras que el factor de crecimiento beta (TGFb) regulan negativamente actividad TNSALP inducida por Smad3 y la mineralización en células osteoblásticas de ratón (27).

1.7. Estructura de ALP

Las coordenadas cristalográficas de la ECAP han sido utilizadas para predecir la estructura cristalina de las ALP en mamíferos. En 2001, el modelo estructural tridimensional del TNSALP humano fue propuesto por Mornet (26). Este modelo está basado en su homología con la isoenzima placentaria (PALP) (1EW2) (11,27,106), determinada a una resolución de 1.8 Å. La secuencia aminoacídica de la molécula TNSALP humana es 57% idéntica y 74% homóloga con la molécula de PLAP humana (35).

La estructura general de ALP de mamíferos es un homodímero, donde los dos monómeros se relacionan entre sí mediante un eje cristalográfico doble. La interfaz del homodímero muestra un fuerte carácter hidrofóbico con menos del 30% de sus residuos formados por aminoácidos que se encuentran involucrados en interacciones de enlace de hidrógeno (11). Muchas interacciones de enlaces de hidrógeno han sido reemplazadas por enlaces de Van der Waals menos específicos, que permiten con mayor probabilidad la reorganización de los dos monómeros (106). Cada monómero contiene 484 residuos, cuatro átomos metálicos, un ion fosfato y 603 moléculas de agua (27).

En la superficie de TNSALP destacan seis regiones claramente identificables cruciales para la función enzimática y la mineralización ósea, que se describen a continuación.

1.7.1. Sitio activo

Presenta cuatro sitios de unión a metales: dos para zinc, uno para magnesio y uno para iones de Ca^{2+} (30). Los entornos de iones Zn^{2+} y Mg^{2+} son esenciales para mantener actividad catalítica de las enzimas. Sin embargo, el trabajo de Bortolato et al. (1999) sobre la IALP bovina demostró que estos espacios metálicos también pueden ser responsables del mantenimiento de la estructura cuaternaria de las ALPs de mamíferos (27,107). La evolución ha conservado solo un 8% las características generales de la enzima con respecto a *E. coli*, conservándose solo los residuos estrictamente necesarios para realizar la catálisis en el sitio activo (106), es decir, la serina catalítica, los tres sitios de iones metálicos M1 ocupado por Zn^{2+} , también llamado Zn1; M2 ocupado por Zn^{2+} ; también llamado Zn2 y M3 ocupado por Mg^{2+}) además de sus ligandos (27), siendo la mayoría de los residuos circundantes que les confieren especificidad de sustrato diferentes (26). Una de las características que diferencian la ALP de mamíferos de la de *E. coli* es la adquisición durante la evolución de un cuarto sitio de ion metálico denominando sitio de unión de calcio (M4) (30).

1.7.2. Valle del sitio activo

Esta región está localizada a ambos lados del sitio activo, en el valle del sitio activo. La ubicación de Arg^{119} y Arg^{433} , ambas exclusivas de TNSALP, en la región del valle del sitio

activo, sugiere que estos dos residuos altamente básicos y polares pueden estar involucrados en la regulación de la estabilización y/o dirección del sustrato (27).

1.7.3. Hélice α del brazo N-terminal

La hélice α del brazo N-terminal. Se ha demostrado que su integridad estructural es un requisito esencial para la transición intramolecular en el sitio activo durante la catálisis enzimática tanto en PLAP como en TNSALP (27).

1.7.4. Dominio corona interfacial “Crown domain”

Se trata de un bucle flexible que se forma mediante la inserción de un segmento de 65 residuos de cada monómero formado por dos pequeñas láminas β extendidas, cada una compuesta de tres hebras paralelas y rodeadas por seis bucles grandes y flexibles que contienen una hélice α corta (27).

Esta región es responsable de la interacción de las ALPs con las proteínas de la matriz extracelular mediante la unión del colágeno (26,30). Se ha demostrado que este bucle, no presente en la enzima de *E. coli*, desempeña un papel crucial en la función de la enzima tanto en la definición de la conformación y como en la estabilidad de la molécula al estar involucrado en la interacción de subunidad-subunidad. Los 65 residuos del dominio corona están bien conservados presentando una homología del 72% con PLAP, a excepción de la región 405–435, donde solo 11 residuos son idénticos y 5 homólogos (26). Se ha observado que este bucle es responsable de la inhibición la enzima de manera poco competitiva a través de la unión de varios aminoácidos y péptidos pequeños, ya que el bucle se encuentra ubicado en la punta del dominio corona siendo altamente accesible (30,106).

1.7.5. Dominio de unión al calcio (M4)

El “dominio de unión al calcio (M4)” está compuesto por 76 residuos (residuos 211–289) y plegado en dos cadenas β flanqueadas por dos hélices α . Incluye un sitio de glicosilación en Asn²⁴⁹, estabilizado por una interacción de apilamiento con Trp²⁴⁸, y un ion metálico adicional (26,30,106). El átomo de calcio está coordinado por los carboxilatos de Glu²¹⁸, Glu²⁷⁴ y Asp²⁸⁹, por el carboxilo de Phe²⁷³ y por una molécula de agua (26,30). La unión del calcio es crucial para el correcto plegamiento y el ensamblaje de la molécula TNSALP (30). Aunque la importancia estructural y funcional de este sitio no está del todo clara (27), se sabe que esta región no influye en la actividad catalítica de TNSALP (11).

Sin embargo, se ha observado una relación entre mutaciones en cualquiera de los tres ligandos Glu²¹⁸, Glu²⁷⁴ o Asp²⁸⁹ con las formas graves de HPP, probablemente porque se anule la unión del calcio (26).

1.7.6. *Interfaz del homodímero*

La interfaz del homodímero permite la dimerización de los monómeros que resulta esencial para la correcta actividad de TNSALP. Esta región junto con estructuras como la lámina β extendida, Hélice α del brazo N-terminal (muy similar al de ECAP) o el dominio corona están involucradas tanto en la estabilización de la estructura dimérica como en la determinación de las propiedades alostéricas (27).

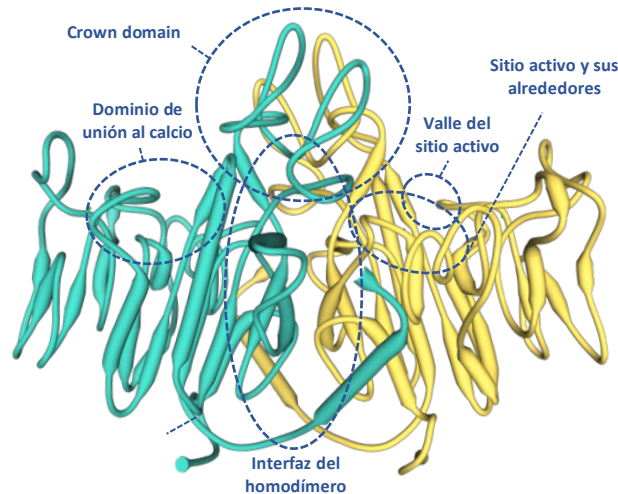


Figura 5. Estructura y zonas sensibles de mutación de la TNSALP.

Estructura 3D de TNSALP humana basada en PLAP mediante un modelo de simulación usando el programa SWISS MODEL incluyendo la secuencia de aminoácidos de UniProtKB (P05186-PPBT_HUMAN). En verde agua y amarillo se muestra cada monómero.

El 78% de las mutaciones de TNSALP están comprendidas en estas regiones, la mayoría de ellas asociadas a formas severas de HPP, lo que indica que son regiones claramente cruciales para la función enzimática y la mineralización ósea.

Se ha observado que las mutaciones ubicadas en el sitio activo y sus alrededores, en la interfaz del homodímero, en el dominio corona o en el dominio de unión al calcio dan lugar a fenotipos más graves de HPP, mientras que las mutaciones en el valle del sitio activo dan como resultado un fenotipo menos grave (35). Las mutaciones en otras regiones de la molécula se asocian preferentemente con fenotipos moderados (25,108,109).

La mayoría de las mutaciones que demostraron tener un DNE medible experimentalmente se localizaron en tres dominios: la región de unión del homodímero, el sitio activo y el dominio corona (96). Por lo tanto, una mutación ubicada fuera de estos dominios probablemente no presentará un DNE (25).

1.8. Sustratos de TNSALP

TNSALP presenta una amplia especificidad de sustratos pudiendo hidrolizar o transfosforilar una gran variedad de compuestos fosfatados in vitro como ATP, ADP, AMP, PPi, glucosa-1-fosfato, glucosa-6-fosfato, fructosa-6-fosfato y β -glicerofosfato (29). Sin embargo, solo algunos de estos compuestos han sido confirmados como sustratos naturales de la enzima, como son el PPi y PLP (11,27), al observar un aumento de los niveles plasmáticos en los pacientes con HPP (30). No obstante, estudios recientes sugieren que ATP (85,110), LPS (111) y OPN (112) son también sustratos naturales de TNSALP (11).

1.8.1. Pirofosfato inorgánico (PPi)

Uno de los sustratos naturales con mayor implicación en el metabolismo óseo es el PPi. TNSALP es una pirofosfatasa que genera Pi a partir de la hidrólisis de PPi permitiendo el crecimiento extravesicular de los cristales de HA (11). La relación de concentración de Pi/PPi en la matriz extracelular es crucial en el segundo paso de la mineralización, ya que PPi es un inhibidor de la formación de HA, al prevenir la formación inicial de cristales y también el crecimiento de cristales al recubrir físicamente los cristales nacientes de HA (27,113,114). La formación de apatita en los condrocitos de la placa de crecimiento es óptima cuando la relación molar Pi/PPi es superior a 140, y se inhibe totalmente cuando la relación disminuye por debajo de 70 (114).

1.8.2. Piridoxal-5'-fosfato

Otro sustrato natural de TNSALP descubierto mediante el estudio de pacientes con HPP es el PLP, la principal forma circulante y activa de vitamina B6. El PLP puede actuar como una coenzima en la catabolización de varios aminoácidos y como cofactor en las descarboxilaciones necesarias para la generación de neurotransmisores, como dopamina, serotonina, histamina, taurina y ácido gamma-aminobutírico (GABA) (11). TNSALP actúa eliminando el Pi de PLP para formar PL, capaz de atravesar la barrera hematoencefálica fosforilándose de nuevo en el SNC para participar en la síntesis de neurotransmisores (115). En lactantes gravemente afectados por HPP y en HPP infantil, la deficiencia de TNSALP da lugar a niveles bajos de PL en la circulación, por lo que, la incorporación de PL al SNC es insuficiente provocando convulsiones dependientes de la vitamina B6 (57,115).

1.8.3. Fosfoetanolamina (PEA)

PEA es un componente del enlace de GPI de la TNSALP a la superficie celular, por lo que PEA podría ser un producto de degradación de esta unión a la superficie celular (11,51). PLP es un cofactor para la enzima O-fosfoetanolamina fosfoliasa que transforma la PEA en

acetaldehído, Pi y NH₃ en el interior de la célula (116). La disminución en la actividad de TNSALP provoca la acumulación de PLP extracelular y con ello el aumento de PEA (11). Aunque los niveles elevados de PEA en sangre u orina, típicamente apoyan un diagnóstico de HPP, esto no es patognomónico de la enfermedad. La fosfoetanolaminuria es un signo clínico en varias enfermedades metabólicas óseas y de otros trastornos. La excreción de PEA en orina está condicionada por diferentes variables como la edad del paciente, el ritmo circadiano, la dieta, entre otras y se ha reportado que es normal en varios individuos levemente afectados con HPP, por lo que esta molécula no es un buen marcador de HPP.

1.8.4. Osteopontina

La OPN es una glucoproteína con 36 sitios de fosforilación de serina/treonina (117) cuya función es la de anclar los osteoclastos a HA mediante sus secuencias de poliaspartato, además de favorecer la unión de la integrina CD44 y avb3 a través de su secuencia RGD (arginina-glicina-aspartato), mediando así la señalización y la migración celular (118). La OPN fosforilada, es un potente inhibidor de la mineralización ósea así como de la mineralización en las células del músculo liso vascular (119). Se ha observado que el efecto inhibidor de OPN sobre la deposición mineral disminuye si se elimina el 84% de este fosfato unido covalentemente (120).

La expresión de OPN por osteoblastos es controlada mediante los niveles extracelulares elevados de PPi (11,118). Niveles plasmáticos elevados de OPN fosforilada se acompañan del aumento de los niveles de PPi extracelular en ratones *ALPL* KO (121), mientras que la ausencia de la función TNSALP conduce a la acumulación de OPN fosforilada y con ello una mineralización ósea defectuosa en ratones *ALPL* KO (11,112). Esto sugiere que OPN es otro sustrato de TNSALP, y la fosforilación de OPN es una vía bioquímica adicional en la fisiopatología de la HPP (11).

1.9. Diagnóstico de HPP

El diagnóstico de HPP en la práctica clínica es un reto, tanto por su baja prevalencia como por el solapamiento con los fenotipos de otras patologías más prevalentes (8). Síntomas como artralgia, mialgia y dolor óseo son comunes en HPP, siendo estos muy similares a los que aparecen en el raquitismo, osteogénesis imperfecta, enfermedad de Paget, osteosarcoma, artritis reumatoide o fibromialgia (122). A menudo, los pacientes afectados por HPP se encuentran infradiagnosticados o presentan un diagnóstico erróneo con años de evolución (123), por lo que se hace necesaria una alta sospecha y un profundo conocimiento de la enfermedad para su correcto diagnóstico (124).

Otro factor limitante para el diagnóstico de HPP es el escaso valor asignado a una disminución de la actividad de ALP sérica, en contraste con la valoración que se realiza en cuanto al aumento de la actividad de ALP en la práctica clínica (8,124).

Los signos y/o síntomas clínicos son el primer escalón para la sospecha diagnóstica de HPP. Sin embargo, existen formas clínicas durante el periodo infanto-juvenil que se pueden presentar con una baja o nula expresión clínica. En estos casos, unos niveles persistentemente bajos de actividad de ALP sérica podrían indicar la existencia de HPP paucisintomática, presentando una mayor expresividad clínica en la edad adulta (8).

Los pacientes que presentan signos y/o síntomas a nivel musculo-esquelético y/o dentales deben de ser considerados como sospecha de diagnóstico clínico de HPP. Los síntomas respiratorios y neurológicos que aparecen las formas graves perinatales y del lactante supondrán un apoyo a la sospecha diagnóstica (8).

El siguiente escalón tras la sospecha clínica para el diagnóstico de HPP debería de ser la determinación de ALP en suero. Los datos de sujetos normales muestran que la ALP ósea contribuye aproximadamente a la mitad de la actividad total de ALP en adultos (30).

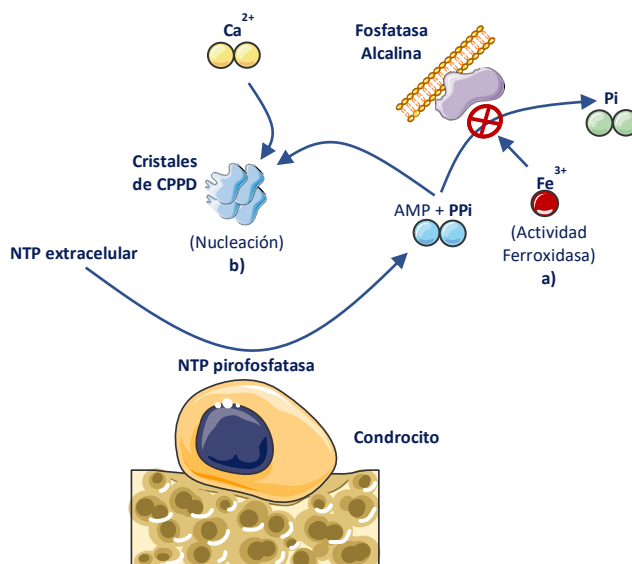
Los valores de referencia deben de ajustarse en función de la edad, el sexo y el ensayo utilizado. Para ello se deberían utilizar los valores de referencia aportados por el estudio CALIPER para la población pediátrica (125), y los valores de referencias recomendados por la International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) para la población adulta (126). El proyecto CALIPER es un estudio colaborativo entre centros pediátricos de Canadá que presenta valores de referencia estratificados por edad y sexo para 40 marcadores bioquímicos (química sérica, enzima, lípidos y analitos proteicos) en una población sana y multiétnica de niños y adolescentes sanos ($n = 2188$, de recién nacidos a 18 años de edad). Este estudio aborda brechas críticas en el establecimiento de valores de referencia en población pediátrica relacionadas con el desarrollo y crecimiento del niño, que pueden influir profundamente en las concentraciones de muchos analitos medidos rutinariamente en el laboratorio de diagnóstico clínico, determinando la influencia de covariables claves, como la edad, el sexo y la etnia (125,127).

La actividad ALP inferior a los valores de referencia de forma persistente puede estar asociada a HPP, sin embargo, existen otras situaciones clínicas en las que también se ve disminuida la actividad de esta enzima (Tabla 2) (128). El conocimiento de estos criterios de exclusión será de gran relevancia a la hora de un diagnóstico correcto de la enfermedad (8).

Tabla 2. Situaciones clínicas asociadas a la disminución de la actividad de fosfatasa alcalina.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN DE HPP	
Cirugía bypass coronario	Síndrome de leche y alcalinos
Enfermedad celíaca	Osteogénesis imperfecta, tipo II
Displasia cleidocraneal	Anemia grave o perniciosa
Síndrome de Cushing	Envenenamiento por metales pesados radioactivos
Hipotiroidismo	Deficiencia de vitamina C
Transfusión masiva de sangre o plasma	Intoxicación por vitamina D
Ciertos fármacos: clofibrato, tamoxifeno, glucocorticoides, quimioterápicos, bifosfonatos	Deficiencia Zn^{2+} o Mg^{2+}
Enfermedad de Wilson	Mieloma Múltiple
Inanición	Obtención de sangre incorrecta (oxalato, EDTA)

Además de las causas más conocidas de hipofosfatemia secundaria, existen otras situaciones menos comunes que también se asocian a niveles disminuidos de ALP, que también deben ser consideradas para hacer un diagnóstico certero. Estudios recientes han demostrado que el hierro y la ferritina son potentes inhibidores de la osteogénesis, al inhibir significativamente la actividad de la ALP. La actividad ferroxidasa de la ferritina se considera el elemento central de esta inhibición (129) (Figura 6). En consecuencia, es importante considerar la hemocromatosis como una causa secundaria de hipofosfatemia, diferente de la HPP.

**Figura 6.** Actividad ferroxidasa sobre la actividad de ALP y metabolismo de PPi en hemocromatosis.

- Inhibición de la fosfatasa alcalina por el hierro, dando como resultado valores altos de PPi.
- El incremento de la concentración de PPi aumenta la actividad de nucleación del hierro en la formación de cristales de CPPD (130).

Por otra parte, se han descrito algunos casos de pacientes afectados por displasia cleidocraneal que puede simular la HPP (131). La displasia cleidocraneal es una displasia esquelética causada por mutaciones en el gen *RUNX2* codificante del factor de transcripción de osteoblastos específico de hueso/cartílago. Aunque existen manifestaciones clínicas que difieren entre ambas patologías, estos pacientes podrían presentar algunas de las características radiográficas y bioquímicas compatibles con HPP. La displasia cleidocraneal se caracteriza por macrocefalia con suturas persistentemente abiertas, clavículas ausentes o hipoplásicas, anomalías dentales y osificación tardía de los huesos púbicos además de niveles séricos de ALP persistentemente disminuidos. Los estudios con ratones knockout para *RUNX2* han demostrado una ausencia completa de ALP, lo que sugiere que *RUNX2* podría participar en la regulación de la actividad de TNSALP (132). Sin embargo, hasta la fecha, no se sabe si se trata de una relación directa o indirecta ya que no existen estudios para identificar los mecanismos moleculares por los que interactúan *RUNX2* y TNSALP.

Existen casos en los que los hallazgos clínicos, radiológicos y bioquímicos (concentraciones de PLP elevadas) son típicos de pacientes con HPP infantil, con la excepción de que la actividad de la ALP sérica es normal o incluso aumentada (27,133). Este fenotipo extremadamente raro se denomina “pseudohipofosfatasa” y solo se ha documentado de manera convincente en dos bebés (27).

Una posible explicación de estos niveles normales de ALP es la corrección transitoria de la hipofosfatemia como resultado de fracturas o enfermedades intercurrentes, o ligeras elevaciones en los niveles de sustratos de la enzima que causan una sobreexpresión de TNSALP (134,135).

La medición de la densidad mineral ósea mediante absorciometría dual de rayos X (DXA) permite observar una reducción del contenido mineral óseo en pacientes con HPP. Por ello, el estudio DXA apoyará el diagnóstico, pero sin ser imprescindible para el mismo (8), ya que las imágenes radiológicas pueden ser compatibles con osteopenia, condrocalcinosis y/o fracturas patológicas, sin ser estos hallazgos patognomónicos de la HPP (136). Además, hay pacientes afectados por HPP con un alto riesgo de fracturas por fragilidad a pesar de presentar un aumento de la densidad ósea lumbar determinada por DXA (137). En este contexto, sería de gran utilidad contar con estudios que evalúen la arquitectura ósea en pacientes con HPP para valorar la contribución del hueso trabecular y cortical al riesgo de fracturas en esta población.

La baja actividad de ALP conlleva a la acumulación de sus sustratos naturales, fundamentalmente PLP y PPI, cuya elevación es la responsables de las manifestaciones de la enfermedad (8,11). Todos estos sustratos pueden ser determinados para evaluar la actividad

de ALP. Sin embargo, debido a la baja accesibilidad para determinar PPI, el mejor candidato para el estudio de funcionalidad ALP es el PLP. En niños afectados por HPP, el aumento de los niveles plasmáticos de PLP se correlaciona con la gravedad de la enfermedad, siendo este el marcador de mayor sensibilidad diagnóstica (2). El valor predictivo positivo y negativo del PLP para el diagnóstico de HPP en la infancia es muy alto, aunque la ausencia de elevación del PLP plasmático, o de los demás sustratos de la ALP, no pueden excluir el diagnóstico de HPP (8).

Los valores de calcio y fosfato sérico y calcio urinario también pueden verse elevados en algunas ocasiones, siendo más frecuente en las formas tempranas de la enfermedad. En general, los niveles de parathormona (PTH) y vitamina D se encuentran dentro de los valores de normalidad (136).

En pacientes con manifestaciones clínicas compatible con HPP y actividad de ALP sérica disminuida de forma persistente (en ausencia de otras causas), con o sin sustratos elevados, es necesario descartar otras patologías más frecuentes cuyo fenotipo puede solaparse con la HPP (Ver Tabla 3, “Presentación clínica de HPP, diagnóstico diferencial y herencia”) (3,4,138).

El hallazgo de mutaciones patogénicas en el gen *ALPL* permite establecer el diagnóstico definitivo de HPP. Sin embargo, el no encontrar una mutación en el gen *ALPL* no permite excluir el diagnóstico de HPP, ya que por una parte, la regulación de los niveles extracelulares de PPI, responsable de algunos síntomas de HPP, es compleja e involucra varios genes además del gen *ALPL* (139). Por otra parte, el estudio genético de *ALPL* se limita a la secuenciación de regiones codificantes del gen (exones), sin tener en cuenta las regiones promotoras o regiones intrónicas del gen *ALPL* que no son detectadas por secuenciación de Sanger, lo que podría explicar la ausencia de mutaciones en este gen en pacientes con clínica y bioquímica compatibles con HPP (140). En este sentido, la secuenciación completa del gen *ALPL*, incluidas las regiones no codificantes en casos poco claros, podría ser de gran utilidad para saber si los pacientes están afectados por HPP.

Sin embargo, otros autores postulan que, ante una clara sospecha clínica de HPP (fenotipo + radiología + hallazgos analíticos), no es imprescindible el estudio genético para el diagnóstico de HPP, aunque la información genética es crucial para documentar el patrón hereditario y el riesgo de recurrencia, así como para el diagnóstico prenatal (95,141).

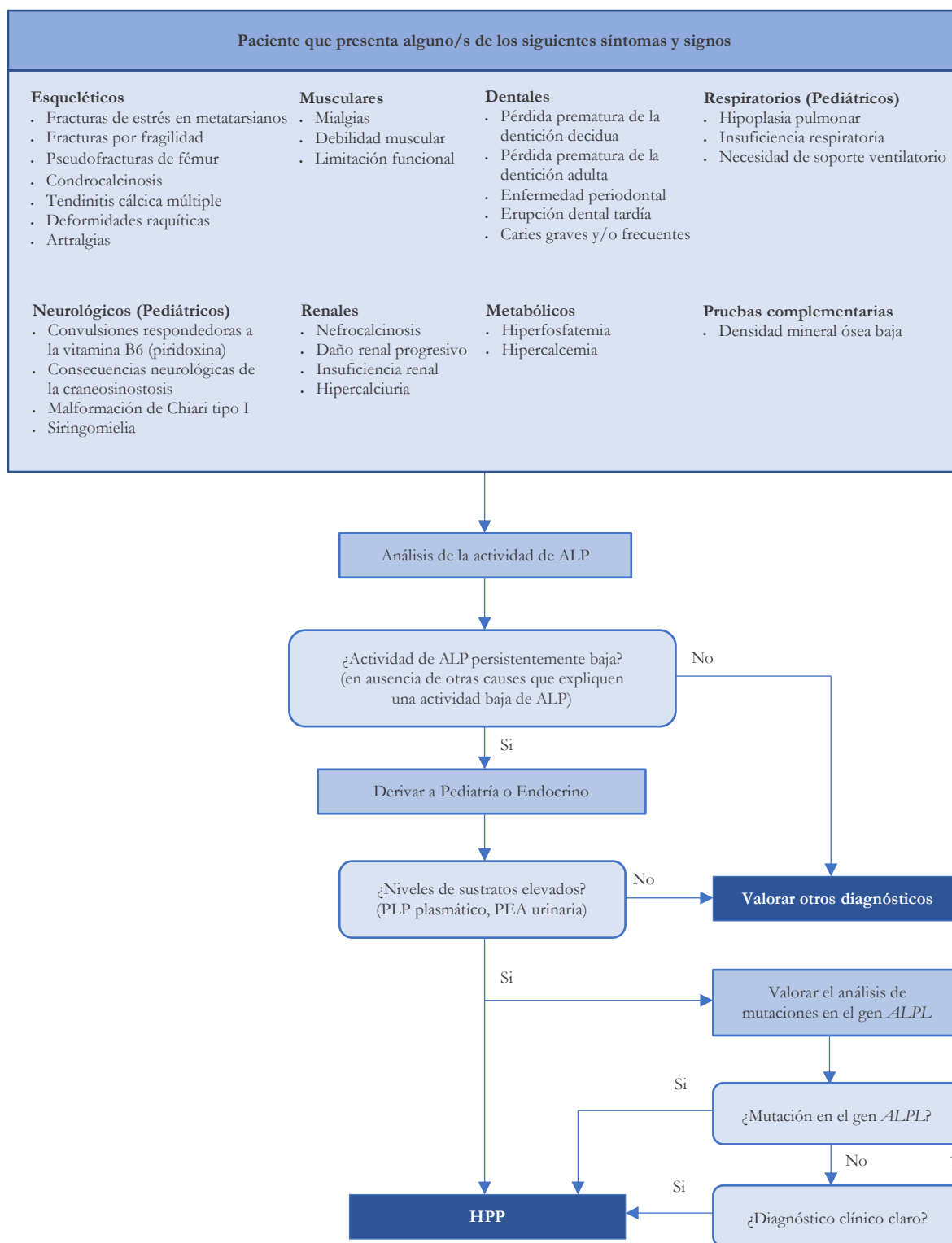


Figura 7. Algoritmo diagnóstico de HPP.

ALP: fosfatasa alcalina; HPP: hipofosfatasia; PEA: fosfoetanolamina; PLP: piridoxal 5' fosfato; *ALPL*: gen de la fosfatasa alcalina no específica de tejido. (Adaptado de N. Guañabens et al./Med Clin (Barc).2017;xxx(xx):xxx-xxx) (124).

*En 2 o más determinaciones, sin antecedentes de ALP normal y fuera de una situación aguda.

1.10. Correlación genotipo-fenotipo

Con el fin de evaluar la importancia relativa de las mutaciones sin sentido y la relación genotipo-fenotipo (25), se realizaron sobre la base de datos clínicos de pacientes, estudios de transfección (3), modelado asistido por ordenador (26,109), y estudios de las propiedades bioquímicas de la ALP en cultivos de fibroblastos de pacientes (142) o células transfectadas (143). Estos estudios confirmaron la gran variabilidad en las actividades enzimáticas residuales de las mutaciones sin sentido y el gran número de genotipos heterocigotos compuestos que explican la expresividad clínica altamente variable. Además, estas pruebas permitieron a los investigadores intentar distinguir los alelos severos y recesivos de los alelos moderados y dominantes (144,145). Mientras que el fenotipo en pacientes con HPP perinatal e infantil se caracteriza por déficits severos de mineralización ósea, raquitismo y nefrocalcinosis, la HPP en adultos se presenta con manifestaciones clínicas moderadas o leves como fracturas por estrés con trastornos de curación de fracturas, periodontitis, pérdida temprana de dientes deciduales y deposición articular de CPPD (26,146). Los fenotipos severos de HPP se manifiestan como una enfermedad recesiva, producida por mutaciones homocigotas o heterocigotas compuestas (140,147), mientras que las formas leves o moderadas de HPP generalmente se presentan con DNE de mutaciones heterocigotas (25,96).

La correlación genotipo-fenotipo también puede estudiarse observando los fenotipos resultantes de los genotipos recurrentes. En un estudio de Mornet, el 64% de los genotipos recurrentes conducen a un fenotipo similar y el 26% a un fenotipo que difiere de una clase fenotípica (por ejemplo, lactante/infantil) (25).

Las convulsiones suelen aparecer en los fenotipos más graves de HPP cuando la actividad de TNSALP es residual. La baja actividad de TNSALP mutante para desfosforilar PLP en la superficie de las células neuronales parece ser la causa de estas convulsiones dependientes de piridoxina (108).

Además, se ha observado que, dependiendo de la mutación, la capacidad de la TNSALP mutante para desfosforilar sustratos puede diferir de un sustrato a otro (PLP, PPi) (143). Mornet observó que las mutaciones sin sentido en los pacientes con convulsiones parecen estar ubicadas en regiones particulares de TNSALP, especialmente el sitio activo y el sitio del calcio (108).

Un estudio reciente de Mornet et al. (2021) clasificó HPP en tres subtipos distinguibles por sus características genéticas y prevalencia: HPP severa (1/300,000), principalmente debido a homocigosidad o heterocigosidad compuesta para variantes severas; HPP leve (1/2.430),

principalmente debido al DNE de variantes sin sentido; y HPP leve del adulto, caracterizada por signos inespecíficos (1/508). Mornet plantea la hipótesis de que la HPP leve se deba posiblemente a un mecanismo de haploinsuficiencia con una interacción negativa entre TNSALP y otro actor, posiblemente la matriz de colágeno (148).

En los casos en los que la HPP adulta no sea obvia, debido a hallazgos genéticos no concluyentes asociados a variantes genéticas raras del gen *ALPL* o variantes genéticas clasificadas como variantes de significado incierto (American College of Medical Genetics and Genomics — ACMG clase 3), podría ser difícil diagnosticar la enfermedad. En esos pacientes, la HPP solo debe diagnosticarse cuando se muestre una disminución persistente de la actividad de TNSALP y niveles elevados de PLP, además de manifestaciones esqueléticas y al menos una complicación adicional relacionada con los dientes, el sistema musculoesquelético o el sistema nervioso central (143).

1.11. Manifestaciones y formas clínicas de la Hipofosfatasia

Los pacientes con HPP presentan una deficiencia generalizada de TNSALP que se asocia con una forma rara de raquitismo y osteomalacia, es decir, cartílago o hueso pobremente mineralizado respectivamente (13,30,147). A diferencia de la mayoría de los tipos de raquitismos/osteomalacia, ni los niveles de calcio ni de fosfato inorgánico en la sangre se encuentran disminuidos en la HPP. De hecho, la hipercalcemia e hiperfosfatemia y la hipercalciuria es común en la HPP infantil. A pesar de que las manifestaciones clínicas más habituales se producen a nivel óseo, la HPP presenta una expresividad clínica muy variada. Los fenotipos varían desde la ausencia completa de mineralización ósea (95) y muerte fetal principalmente debido a problemas respiratorios asociados con deformidades torácicas e hipoplasia pulmonar (149), hasta fracturas espontáneas, pérdida prematura de dientes, convulsiones o incluso nefrocalcinosis (27). Las convulsiones pueden comenzar poco después del nacimiento en pacientes con HPP perinatal letal o lactante. Sin embargo, no se ha informado que ocurran convulsiones en pacientes con otros tipos de HPP (150–152). Whyte observó que los pacientes con HPP perinatal o infantil y convulsiones dependientes de vitamina B6, con o sin dificultad respiratoria significativa o deformidades torácicas, presentan alta morbilidad y mortalidad en los primeros 5 años de su vida (153).

Estudios recientes han demostrado que TNSALP puede tener un papel regulador en las células progenitoras óseas y musculares que influyen en la salud musculoesquelética. Por lo tanto, los niveles bajos de esta enzima se han asociado con debilidad muscular y coordinación motora disminuida (154). Los problemas de desarrollo, las fracturas recurrentes, con escasa curación, el estrés metatarsiano y las pseudofracturas son complicaciones esqueléticas típicas.

Algunos de estos pacientes sufren deposición de CPPD (condrocalcinosis), artropatía que incluye ataques de pseudogota o, a veces, periartrosis calcificada (11).

Además, se ha revelado que TNSALP puede modular la función mitocondrial y los niveles de ATP, y sus defectos pueden asociarse con disfunción mitocondrial, respiración celular y aumento de especies reactivas de oxígeno, lo que conduce a alteraciones metabólicas en estos pacientes (154).

Aunque el aumento de las tasas de fracturas por fragilidad y las lesiones recurrentes de la médula ósea se consideran un sello distintivo de la HPP debido a la mineralización ósea defectuosa en los pacientes afectados (155–157), esto no se aplica a todos los pacientes (137) debido a la amplia variedad de mutaciones genéticas. Por tanto, hay pacientes afectados de HPP que muestran valores elevados de la columna lumbar en la DXA y un mayor riesgo de fracturas relacionadas con HPP (137). Esto podría explicarse en gran parte por una mineralización comprometida de la microarquitectura ósea. Sin embargo, hasta la fecha hay pocos estudios que evalúen la afectación ósea diferencial entre el hueso trabecular y cortical en pacientes con HPP (145).

La HPP es una enfermedad que puede manifestarse a cualquier edad. El diagnóstico puede hacerse en el útero, durante la infancia, la edad adulta o frente a una fractura atípica postmenopáusica. En general, las formas más graves de la enfermedad están asociadas con síntomas y diagnósticos más tempranos. Las formas más leves generalmente se diagnostican en la edad adulta (4), donde los únicos síntomas pueden ser fracturas o pérdida dental.

Las diferentes manifestaciones pueden clasificarse desde las formas más graves hasta las más leves en hipofosfatasa perinatal letal, hipofosfatasa del lactante, hipofosfatasa infantil, hipofosfatasa del adulto, odontohipofosfatasa e hipofosfatasa perinatal benigna (13,27,95,158).

Sin embargo, esta clasificación no refleja de forma completa la variabilidad fenotípica de la enfermedad y no considera la evolución de la enfermedad a lo largo de la vida englobando a los pacientes adultos en formas leves de forma generalizada, a pesar de que estos pueden experimentar complicaciones incapacitantes derivadas de su enfermedad. Los pacientes que durante la infancia no manifiestan síntomas pueden desarrollar con el tiempo sintomatología reumatológica, ortopédica y/o metabólica que conduce a una intensa incapacidad (4).

1.11.1. Hipofosfatasia perinatal letal

La HPP perinatal letal es la forma más severa y se expresa en el útero o al nacer con ausencia casi total de mineralización ósea (138). La muerte neonatal es común en la forma perinatal letal en los primeros días o semanas después del nacimiento (8,149). Los problemas respiratorios graves debidos a deformidades torácicas e hipoplasia pulmonar suelen ser la causa directa de alrededor de la mitad de las muertes en estos pacientes (149,153,159). Las características comunes de la HPP perinatal letal son la imposibilidad de aumentar de peso, irritabilidad, llanto agudo, apnea periódica, anemia mielofísica, hemorragia intracraneal y convulsiones idiopáticas (27).

Los fetos gravemente afectados muestran una mineralización dramáticamente deteriorada. Los hallazgos radiográficos son muy indicativos de la enfermedad: enanismo con extremidades cortas, huesos arqueados, espolones osteocondrales cubiertos de piel que sobresalen de piernas o brazos (rasgo patognomónico), pulmones hipoplásicos y mineralización defectuosa del cráneo y de la columna vertebral (Figura 8a) (160).

Los signos clínicos de HPP pueden observarse en útero a partir del segundo trimestre de embarazo, sin embargo, estos pueden aparecer en semanas más avanzadas del embarazo y limitarse a los huesos largos arqueados. El nacimiento generalmente suele ocurrir entre las 37 y 40 semanas de gestación (141).

Los recién nacidos que desarrollan síntomas al nacer o durante las primeras semanas de vida presentan una forma muy grave de la enfermedad, incluso con manifestaciones multiorgánicas y con una tasa de mortalidad observada del 50 al 90% en ausencia de terapia de reemplazo enzimático (161). La mayoría de los lactantes, requieren asistencia respiratoria debido a la insuficiencia respiratoria causada por falta de mineralización de la cavidad torácica combinada con la insuficiencia muscular. A los pocos días del nacimiento pueden surgir complicaciones neurológicas con convulsiones epilépticas debido al metabolismo deficiente de la PLP con un mal pronóstico (162), además de hemorragias intracerebrales, apnea central con cianosis, episodios de bradicardia y fiebre inexplicable (161,163).

A diferencia de la hipocalcemia e hipofosfatemia observada en distintos tipos de raquitismo, estos pacientes con HPP perinatal suelen presentar hipercalcemia e hiperfosfatemia (50%), que rápidamente evolucionan a nefrocalcinosis y daño renal (161), siendo excepcional la presencia de niveles séricos bajos de calcio y fósforo en esta enfermedad (164). La causa de la hipercalcemia es desconocida, aunque podría deberse a la falta de incorporación ósea de calcio. La hiperfosfatemia es debida a un incremento en la reabsorción tubular de fosfato (2). Las manifestaciones radiológicas en las formas severas son patognomónicas de la enfermedad, donde se pueden observar una desmineralización extrema de todos los huesos

(Figura 8a), o raquitismo severo donde las epífisis se encuentran mal calcificadas mostrando lenguas de radiolucencia que se proyectan hasta las metáfisis (Figura 8b).

En algunos pacientes también es llamativo la presencia de un cráneo membranoso (*caput membraceum*), junto a una mineralización central, lo que sugiere suturas craneales anchas que, sin embargo, están funcionalmente cerradas (2,165).

Debido a que la HPP perinatal letal es una condición fatal y se hereda como un patrón autosómico recesivo, es necesario un diagnóstico prenatal. El método más fiable y adecuado en es la ecografía en serie a partir de la cual se puede hacer el diagnóstico en el segundo trimestre (165).

Además, es importante realizar un análisis cuidadoso combinando los rayos X y marcadores bioquímicos y moleculares para poder discriminar una HPP perinatal benigna de una forma letal de la enfermedad (4,141,166).

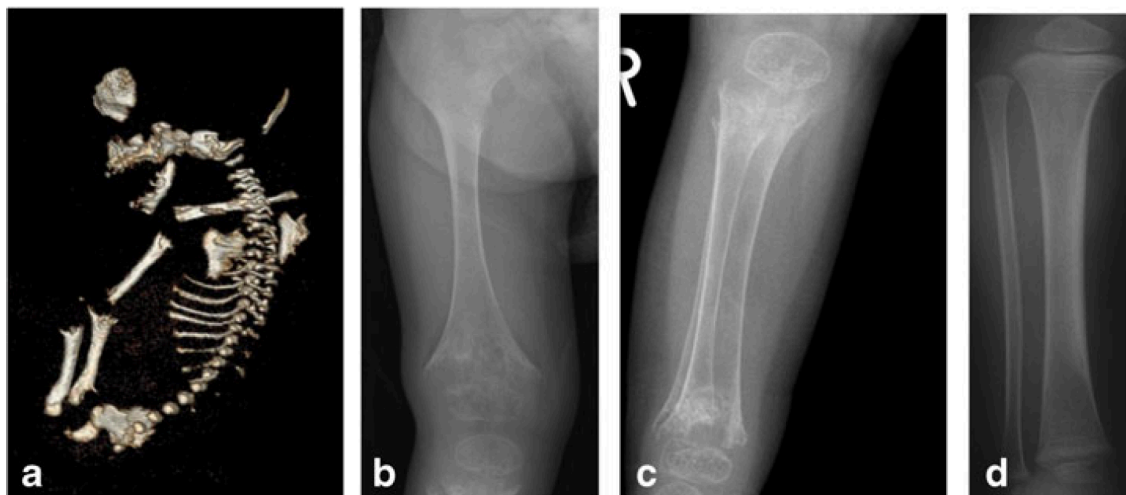


Figura 8. Hipofosfatasa perinatal letal.

a) Imagen escanográfica a las 30 semanas de embarazo en un feto afectado con HPP y una mutación homocigótica en el gen *ALPL* donde se observa una falta de mineralización del cráneo, costillas finas, y metáfisis femorales distales anormales con irregularidades; b) Radiografía del fémur desmineralizado de un niño de 18 meses afectado con HPP c) Radiografía de la tibia desmineralizada de un niño de 18 meses afectado con HPP y una mutación heterocigota compuesta en el gen *ALPL*; d) A modo de comparación, se muestra una radiografía de un niño de 20 meses no afectado (4).

1.11.2. Hipofosfatasa del lactante

Las manifestaciones en la HPP del lactante se presentan durante los 6 primeros meses de edad con una expresión clínica especialmente variable que va desde leve a grave (2,167). El desarrollo del bebe puede ser normal hasta que la enfermedad empieza a manifestarse con falta de crecimiento o debilidad muscular con hitos motores retrasados acompañando de

signos de raquitismo (168). El cierre prematuro de la sutura craneal (craneosinostosis) es uno de los signos más frecuente en HPP del lactante. La craneosinostosis poder provocar hipertensión intracraneal, papilema o plagiocefalia. Por otro lado, también podría aparecer una fontanela ancha que se cierra lentamente (2), anomalías metafisarias, invasión diafisaria y huesos muy frágiles (161,167). Otras manifestaciones son la proptosis, hipertelorismo leve y braquicefalia (151). Debido a la baja mineralización ósea, pueden aparecer anomalías metabólicas comunes como hipercalcemia, hiperfosfatemia, niveles bajos de PTH e hipercalciuria elevada ocasionando nefrocalcinosis y compromiso renal (151,168). La hipercalcemia también puede explicar en parte una clínica de irritabilidad, mala alimentación, anorexia, vómitos, hipotonía, polidipsia, poliuria, deshidratación y estreñimiento (3).

Los rasgos radiográficos son patognomónicos y se asemejan a los que se encuentran en la forma perinatal, aunque son menos graves (4,27).. La desmineralización esquelética progresiva va acompañada de fracturas y de deformidades óseas (168), incluyendo dolor óseo, arqueamiento de las piernas, agrandamiento de las articulaciones similar al raquitismo (4). Esta forma también puede venir acompañada de una clínica con complicaciones respiratorias debido a deformidades raquícticas del tórax (3) y convulsiones dependientes de peridoxina (11,58) que son buenos predictores de la letalidad en HPP del lactante (95).

La neumonía es una complicación severa que puede estar ocasionada por la deformidad progresiva del tórax, por fracturas de costillas y por traqueomalacia (2).

En los lactantes que sobreviven, a menudo hay una mejora espontánea en la mineralización ósea y una remisión de los demás problemas clínicos, a la excepción de la craneosinostosis (169).

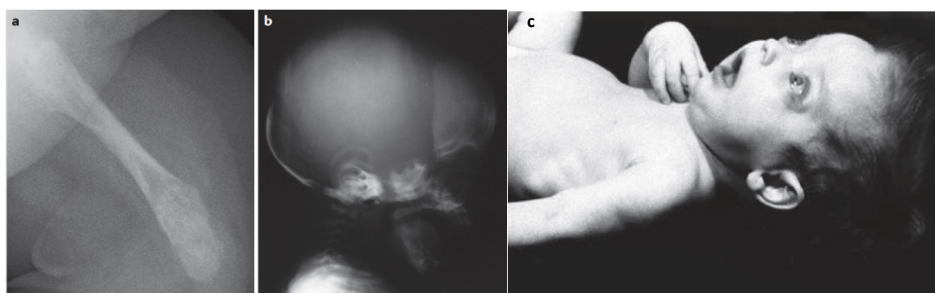


Figura 9. Hipofosfatasa del lactante.

a) Radiografía del fémur izquierdo de una niña de 3 meses donde se muestra la transición de un segmento del eje diafisario de forma adecuada a metadiafisias hipomineralizadas y distorsionadas proximales y distales, lo que sugiere un cambio metabólico repentino que altera el hueso endocondral formado más recientemente. b) Radiografía lateral del cráneo del mismo bebé donde se muestra hipomineralización, especialmente posterior. En consecuencia, las fontanelas parecen anchas (2). c) Niña de 4 meses con una fontanela anterior prominente, proptosis ocular, pectus excavatum y signos de raquitismo en uniones condrocostales (2).

1.11.3. Hipofosfatasia infantil

La HPP infantil se manifiesta después de los 6 meses de edad, con una expresividad clínica especialmente variable desde leve a grave (2,95). Uno de los signos más evidentes que pueden conducir al diagnóstico de HPP, es la pérdida temprana de dientes primarios con raíz intacta (en ausencia de un trauma evidente), antes de los 3 años (138,170). Esto es debido al defecto de mineralización y a la aplasia, hipoplasia o displasia del cemento dental que conecta la raíz del diente con el ligamento periodontal (cemento y hueso alveolar) (27,171). Puede afectar a todos los dientes o solo a aquellos en la región incisivo-canina, pero siempre suele comenzar en los dientes anteriores inferiores y superiores y luego en los dientes posteriores (138,170). Se pueden apreciar además amplias cámaras pulpareas y conductos radiculares agrandados, dando lugar a "dientes en concha" (2,172). Las manifestaciones esqueléticas como el raquitismo causan baja estatura y las deformidades esqueléticas pueden incluir piernas arqueadas, cráneo dolicocefálico con el aspecto de "cobre batido" y agrandamiento de las muñecas, rodillas y tobillos como resultado de una metáfisis ensanchada (27,147). En las radiografías se pueden observar defectos óseos focales cerca de los extremos de los huesos largos principales, así como "lenguas" de radiolucencia en huesos largos principales y marcada hipomineralización de las metáfisis del cúbito distal y el peroné proximal que pueden orientar al diagnóstico de HPP (173). El retraso en la marcha, hace necesario el uso de dispositivos de ayuda para caminar que conlleva a la hipotonía muscular (13,151) y fatiga (4). También puede aparecer proptosis, presión intracraneal elevada y daño cerebral causado por la craneosinostosis (151).

Hay algunos casos documentados de HPP infantil en los que se produce osteomielitis multifocal crónica recurrente (CRMO), posiblemente debido a edema espinal secundario al depósito de cristales de pirofosfato (173,174).

La falta de crecimiento y dolor óseo es frecuente en niños pequeños con una enfermedad grave o en bebés que requieren soporte nutricional (161), mientras que niños con síntomas leves de la enfermedad o con diagnósticos tardíos muestran estatura dentro de la normalidad (95).

En pacientes con HPP más severa también se han documentado casos de sordera de origen desconocido y en ausencia de daño cerebral que no se presenta al nacer y se puede desarrollar con el tiempo. En algunos pacientes también se ha identificado deficiencia de la hormona del crecimiento (161) e hiperprostaglandinismo que pueden afectar a la gravedad de la clínica (175).

Las manifestaciones de la HPP infantil suelen ser persistentes durante el crecimiento (172), sin embargo se ha descrito la remisión espontánea de la enfermedad ósea durante la vida

adolescente hasta la adulta, tal vez debido a la fusión de las placas de crecimiento. El desarrollo de la dentición permanente suele ser normal, pero puede ocurrir un resurgimiento tanto de problemas dentales como de la enfermedad esquelética con osteomalacia en la edad adulta (2,3).

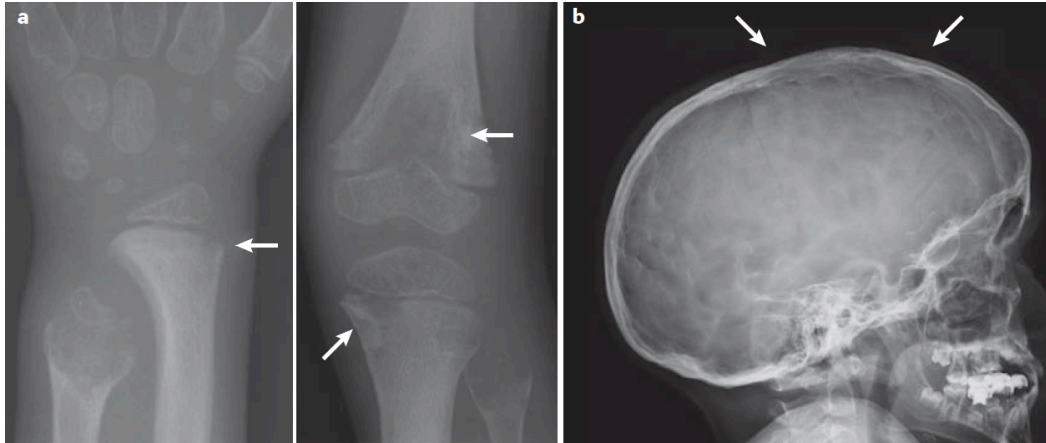


Figura 10. Hipofosfatasa infantil.

a) Radiografías de una niña de 3 años que muestran cambios característicos de la HPP infantil, que incluyen "lenguas" de radiolucencia (flechas) que se proyectan hacia las metafisis en la muñeca izquierda (panel izquierdo) y la rodilla izquierda (panel derecho). También es evidente la hipomineralización marcada de las metafisis del cúbito distal y el peroné proximal. b) Radiografía lateral de un niño de 9 años que muestra un cráneo alargado (dolicocefálico) con el aspecto de "cobre batido". El lugar de craniectomía (flechas) se está rellenando con hueso (2).

1.11.4. Hipofosfatasa del Adulto

La HPP del adulto se presenta generalmente en adultos de mediana edad, alrededor de los 50 años (4,181). La pérdida de la dentición adulta es una manifestación común en estos pacientes (155,176). Sin embargo, algún afectado recuerda la pérdida temprana de alguno de sus dientes deciduos con raíz completa durante la infancia o antecedentes de raquitismo, sin presentar ninguna manifestación esquelética reseñable durante la adolescencia o de adulto joven. Las primeras manifestaciones clínicas suelen ser dolor en el pie debido a fracturas recurrentes por estrés metatarsiano que no consolidan (2,11,176), y el depósito de CPPD que provoca ataques de artritis (pseudogota), artropatía por pirofosfato (27,178), así como la osificación de los ligamentos (sindesmofitos), similar a lo que ocurre en la enfermedad de Forestier (2) o la periartrosis calcificada.

Posteriormente, pueden aparecer dolores en la cadera o muslo que suelen terminar con diagnóstico de pseudofractura de fémur (176,179). A diferencia de la pseudofractura de fémur con localización en cuello femoral que ocurre en osteomalacia, las pseudofracturas femorales (zona de Looser) en adultos con HPP suelen ocurrir generalmente en la región

subtrocantérea proximal y lateral (179,180) (Figura 11). Las pseudofracturas femorales se asemejan a las lesiones prodrómicas de fracturas atípicas que a veces se asocian a la terapia antirresortiva para el tratamiento de la osteoporosis (177,180).

Además estos pacientes pueden desarrollar otras complicaciones graves que se producen espontáneamente por traumatismo o exposición ambiental a medida que envejecen, entre ellas: condrocalcinosis, inflamación de articulaciones, osteoartropatía, fracturas vertebrales, molestias musculoesqueléticas, fatiga muscular, hipercalcemia, nefrocalcinosis e insuficiencia renal (155,181,182). La HPP en el adulto a pesar de cursar generalmente con una clínica leve, puede hacerse muy incapacitante debido a la presencia recurrente de fracturas, dolor esquelético y articular y debilidad muscular.

Si bien, los síntomas más prevalentes en la HPP del adulto son los problemas óseos, dentales y musculares, se ha observado que también pueden aparecer síntomas neurológicos en estos pacientes con una alta prevalencia. Los síntomas neurológicos más prevalentes son fatiga, dolor de cabeza, alteraciones del sueño, cambios en la marcha, vértigo, depresión, neuropatía, trastorno de ansiedad e hipoacusia (150).

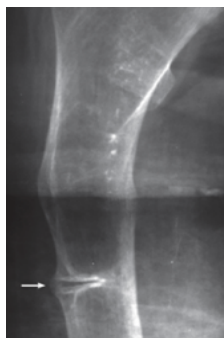


Figura 11. Hipofosfatasa del adulto.

Radiografía de una mujer de 57 años de edad con osteopenia proximal derecha en fémur y una pseudofractura característica que atraviesa la corteza subtrocantérea lateral (Zona de Looser) (2).

1.11.5. Odontohipofosfatasa

La odontohipofosfatasa es la forma más leve y probablemente la más frecuente de HPP (95). La pérdida prematura de dientes o los problemas orodentales tempranos que no se asocian a un contexto inflamatorio o infeccioso, deben de hacer sospechar al profesional sanitario de la posibilidad de odontohipofosfatasa tanto en niños como en mayores y adultos. Para ello se debe examinar el historial médico del paciente para detectar problemas óseos, raquitismo, osteomalacia, fracturas, osteopenia, osteoporosis, dolor, debilidad muscular, craneosinostosis (138) o incluso antecedentes familiares de muerte neonatal

inexplicada de hermanos (170). Se sospechará de odontohipofosfatasa cuando la única anomalía clínica es la enfermedad dental y los estudios radiológicos e incluso las biopsias óseas no muestren signos de raquitismo ni osteomalacia, siendo la única característica clínica, a parte de la afectación dental, una baja actividad de ALP que da lugar a la reducción de la absorción de calcio y fosfato (182) (27). El diagnóstico definitivo se podrá confirmar mediante análisis genético del gen *ALPL*. La desregulación del pirofosfato causa anomalías que afectan la formación del cemento que cubre la raíz del diente, lo cual es esencial para la estructura dental y la fijación al hueso alveolar (183), contribuyendo así a la exfoliación dental temprana. Esta forma se caracteriza principalmente por síntomas dentales con pérdida espontánea prematura de uno o más dientes deciduales (típicamente, se desprenden primero los incisivos inferiores y luego superiores) ocurre sin dolor, sin sangre, con la raíz del diente intacta, espacios pulpares agrandados y el conducto radicular ('dientes en concha'), ya que la característica deficiencia del cemento mineralizado deteriora la unión de la raíz del diente al ligamento periodontal (184). Las repercusiones bucodentales de la HPP pueden aparecer a cualquier edad y en todas las formas de enfermedad, tanto en lactantes como en niños. Los dientes de leche también pueden aparecer más tarde de lo habitual (colapso dental tardío) (138). Otras anomalías dentales pueden ser forma de corona voluminosa, amelogénesis y dentina defectuosa, el tejido duro que se encuentra dentro del esmalte (171,182). También se han descrito desviaciones de la anatomía de la raíz (taurodontismo), defectos en la cantidad y calidad de cemento de raíz, raíces cortas y anomalías en el esmalte (182). Una de los tratamientos más interesantes para estos pacientes es el uso de implantes dentales. La osteointegración satisfactoria de los implantes dentales dependerá, entre otras cosas, de la calidad del hueso en el que se colocan (182).

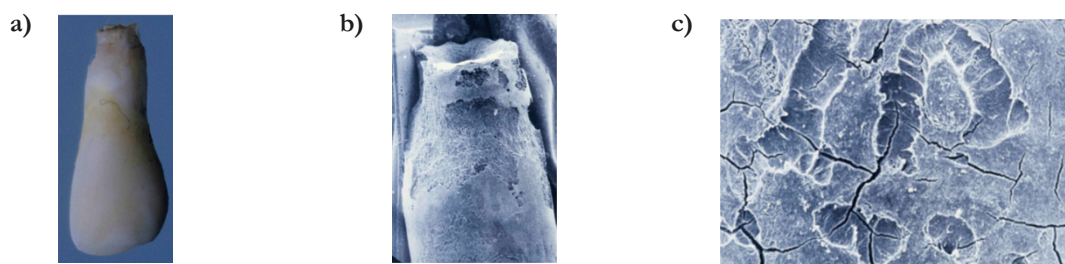


Figura 12. Odontohipofosfatasa.

a) Incisivo lateral superior izquierdo caducifolio exfoliado. b) Micrografía electrónica de barrido de la superficie de la raíz del incisivo lateral superior izquierdo caducifolio donde se observan las extensas áreas de resorción. c) Micrografía electrónica de barrido de la superficie de la raíz del incisivo lateral superior izquierdo caducifolio donde se observa el agrietamiento del cemento de la raíz y la presencia de "huellas de osteoclastos" de forma prematura (182).

1.11.6. Hipofosfatasia "prenatal benigna"

La HPP perinatal letal suele diagnosticarse en el útero generalmente como una enfermedad grave pudiendo desembocar en una interrupción del embarazo, muerte fetal o el nacimiento de un bebé afectado con una forma grave de HPP. Sin embargo, En 2011, una evaluación de 17 pacientes con HPP , reveló que, en ocasiones, la deformidad intrauterina sugestiva de HPP perinatal letal, puede mejorar de forma espontánea durante el tercer trimestre del embarazo, o en los primeros meses o años de vida, con una evolución que suele oscilar entre la HPP infantil y la odontofosfatasa (141).

En la forma “prenatal benigna”, una ecografía gestacional muestra signos de hipomineralización en los huesos de las extremidades. Estos pacientes presentan acortamiento y arqueamiento de las extremidades y, a menudo, hoyuelos que cubren las deformidades del hueso largo (185).

Tabla 3. Presentación clínica de HPP, diagnóstico diferencial y herencia

Localización	Perinatal	Lactante	Infantil	Adulto	Odonto-HPP
Hueso y articulación	Huesos arqueados. Espolones osteocondrales. Mineralización defectuosa del cráneo y la columna vertebral. Enanismo con extremidades cortas.	Huesos hipomineralizados. Huesos arqueados. Fracturas. Dolor óseo. Signos raquíuticos. Craneosinostosis. “Lenguas” de radiolucencia.	Craneosinostosis. Cráneo dolicocefálico con el aspecto de “cobre batido”. Fracturas. Huesos arqueados. Dolor óseo y articular. metáfisis ensanchada. “Lenguas” de radiolucencia.	Fracturas recurrentes por estrés metatarsiano. Pseudofractura de fémur. Fracturas vertebrales. Pseudogota. Artropatía por pirofosfato. Sindesmofitos. Periartritis calcificada. Dolor óseo / articular. Condrocálcinosis.	Sin anomalías esqueléticas. Pérdida de hueso alveolar.
Pulmón	Pulmones hipoplásicos y tórax raquíutico*. Apnea con cianosis*.	Insuficiencia respiratoria. Neumonía.	N/A	N/A	N/A
Neurología	Convulsiones*. Hemorragias intracerebrales*.	Hipertensión intracraneal. Papilema. Plagiocefalia. Convulsiones dependientes de piridoxina. Hemorragias intracerebrales. Sordera.	Hipertensión intracraneal. Daño cerebral causado por craneosinostosis. Sordera.	N/A	N/A
Muscular	Hipotonía.	Hipotonía.	Hipotonía.	Hipotonía. Molestias musculares.	N/A
Renal	Nefrocálcinosis*.	Nefrocálcinosis.	Nefrocálcinosis.	Nefrocálcinosis. Insuficiencia renal.	
Otras	Bajo peso, irritabilidad, llanto agudo, apnea periódica, anemia mielofísica, episodios de bradicardia y fiebre inexplicable*.	Proptosis, hipertelorismo leve, braquicefalia, anorexia, vómitos, polidipsia, poliuria, deshidratación y estreñimiento.	Proptosis y baja estatura.	Fatiga, inflamación de articulaciones y osteoartropatía	Corona voluminosa. Dentina defectuosa. Caries dental severa.
Dental	N/A	N/A	Pérdida prematura de dientes deciduos con raíz (Incisivos primero). Amplias cámaras pulpaes y conductos radiculares agrandados Dientes en concha.	Pérdida de dientes permanentes con raíz. Recuerda caída de dientes deciduos con raíz en la infancia. Dientes en concha.	Exfoliación dental temprana. Colapso dental tardío. Dientes en concha. Taurodontismo. Raíces cortas.
Bioquímica	Hipercalemia*. Hiperfosfatemia*.	Hipercalemia. Hiperfosfatemia. Hipercalcúria. PTH disminuida.	Hipercalemia. Hiperfosfatemia. Hipercalcúria. PTH disminuida. GH disminuida. Hiperprostaglandinismo.	Hipercalemia. Hiperfosfatemia. Hipercalcúria. PTH disminuida.	Hipercalemia. Hiperfosfatemia. Hipercalcúria. PTH disminuida.
Diagnóstico diferencial	Osteogénesis imperfecta (OI) tipo II. Hipocondrogénesis. Displasia campomela. Enfermedad de Caffey. Displasia cifomélica. Condrodisplasia.	Acondrogénesis. Osteogénesis imperfecta (OI). Raquitismo. Displasia tanatofórica.	Raquitismo. Leucemia. Osteomielitis multifocal crónica recurrente (CRMO). Osteoporosis juvenil idiopática (IJO).	Condrocálcinosis. Osteoartritis y pseudogota. Osteopenia/osteoporosis. Enfermedad de Forestier. Osteoartropatía.	Enfermedad periodontal. Displasia de dentina tipo I.
Presentación	En útero y tras el nacimiento.	Antes de los 6 meses de vida.	Después de los 6 meses de vida, hasta los 18 años	≥18 años	Cualquier edad.
Herencia	AR	AR	AR (frecuente) o AD (raro)	AR o AD	AR o AD

*Tras el nacimiento

1.12.Tratamiento

El tratamiento de la HPP debe ser multidisciplinar e individualizado en función de las manifestaciones clínicas de cada paciente, siendo las medidas de apoyo las más utilizadas (32). En la literatura se describen diferentes enfoques terapéuticos con resultados dispares. Tanto el trasplante de médula ósea en lactantes (186,187), como los tratamientos con hormona del crecimiento en niños con HPP han dado resultados satisfactorios con un aumento de la actividad de la fosfatasa alcalina y mejor crecimiento (188,189).

En la HPP perinatal grave, el paciente puede desarrollar hipoplasia pulmonar siendo necesario soporte respiratorio para controlar la insuficiencia respiratoria. Estos pacientes al nacimiento suelen requerir generalmente intubación con ventilación mecánica de alta frecuencia, óxido nítrico, fármacos (sildenafil, milrinona) e incluso oxigenación extracorpórea (8,168). Debe controlarse el calcio, el fósforo y la función renal cada 48-72 h en la primera semana de vida, y posteriormente de manera semanal según la evolución. Deberá también realizarse ecografía cerebral en las primeras 48 h y valorar evolutivamente según la clínica. Además, debe monitorizarse la función cerebral mediante electroencefalografía integrada por amplitud para detectar crisis convulsivas dependientes de piridoxina. En caso de convulsiones se administra piridoxina intravenosa (dosis inicial de 100 mg; posteriormente, 15-30 mg/kg/día en 3 dosis/día) (8).

En los casos en los que se produzca hipercalcemia, se deberá restringir el consumo de alimentos ricos en calcio, aumentar la ingesta de líquidos o incluso, en los casos graves, se podría considerar el uso de corticoides o diuréticos (con especial cuidado en el uso de diuréticos del asa, ya que pueden empeorar la hipercalcemia). Si los niveles de calcio son normales no se recomienda la suplementación de calcio y/o vitamina D3 ya que podría generar hipercalcemia, hiperfosfatemia e hipercalcemia (8).

El empleo de calcitonina con el objetivo de disminuir la resorción ósea no ha dado buenos resultados. Por otro lado, el tratamiento con fármacos antiresortivos (bifosfonatos) es frecuente en los hospitales de tercer nivel, debido al diagnóstico erróneo con otras patologías osteoporóticas. Esto provoca que el pronóstico del paciente con HPP empeore, ya que los bifosfonatos son análogos del PPi, un precursor del depósito de cristales de pirofosfato cálcico a nivel articular (177,190,191). Además, los bifosfonatos podrían exacerbar la hipomineralización de HPP directamente inhibiendo la formación de HA o al unirse a cationes de Zn^{2+} o Mg^{2+} , comprometiendo así cualquier actividad residual de TNSALP (192). Es importante señalar que el tratamiento con bifosfonatos en adultos con HPP puede aumentar el riesgo de fractura femorales atípicas (177,180,190,191).

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINE) son de utilidad como analgésicos, especialmente para tratar el dolor por edema óseo, así como para el tratamiento de calcificaciones extraarticulares (192). Las manifestaciones clínicas secundarias al depósito de cristales de pirofosfato cálcico o hidroxapatita (ataques de artritis, artropatía por pirofosfato, Sindesmofitos o la periartritis calcificada) responden tanto a tratamiento local de antiinflamatorios no esteroideos o glucocorticoides (124). Además, el uso de ciclos de antiinflamatorios no esteroideos da buenos resultados para el dolor persistente secundario a fracturas (175,191).

Otro enfoque terapéutico sería el uso de paratohormona (PTH) o anticuerpos monoclonales anti-esclerostina. El mecanismo de acción de la PTH se basa en la estimulación directa de la formación ósea (136). Se ha observado que la administración intermitente de teriparatida (PTH 1-34) a dosis bajas induce por diversos mecanismos, con un “efecto paradójico”, la activación del remodelado óseo con un aumento de masa ósea de forma equilibrada, una mejoría en la consolidación de fracturas y en la disminución del dolor (136,193). Sin embargo, también se han descrito casos en los que la respuesta al tratamiento con teriparatida puede variar siendo más o menos eficaz en función de la mutación en el gen *ALPL* (194–196). También se ha observado que el tratamiento con teriparatida durante 24 meses se asocia con el aumento de los valores de fosfatasa alcalina, disminución de la concentración de PLP y un incremento en la densidad mineral ósea (DMO) lumbar, con estabilidad de la DMO femoral (136,197).

Por otra parte, se ha demostrado que el tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-esclerostina aumenta la formación ósea y reduce la resorción ósea, aumentando la DMO en pacientes con HPP (97).

Se han evaluado varias terapias de sustitución enzimática para tratar la HPP. Entre ellas se encuentra el empleo de transfusión de plasma sanguíneo rico en TNSALP procedente de pacientes con enfermedad de Paget o purificado de placenta humana (192). Sin embargo, solo se observó en algunos pacientes cierta mejoría bioquímica, clínica y radiológica, pero de forma transitoria y con resultados no reproducibles. Para que el tratamiento sea efectivo no es suficiente con aumentar los niveles plasmáticos de TNSALP, sino que esta debe poder incorporarse a la estructura ósea (8,192). Otras vías de sustitución que se han explorado son el trasplante de médula ósea o de células madre mesenquimales alogénicas que se pueden diferenciar hacia osteoblastos. Aunque se ha observado cierta mejoría clínica, hay que tener en cuenta la inmunosupresión y su morbilidad (192).

La terapia de sustitución enzimática que ha demostrado mayor efectividad hasta la fecha es la TNSALP recombinante humana (asfotasa alfa). Desde 2015, la asfotasa alfa cuenta con

aprobación de la Agencia Europea del Medicamento para el tratamiento prolongado de las manifestaciones óseas en pacientes con HPP de inicio pediátrico (8).

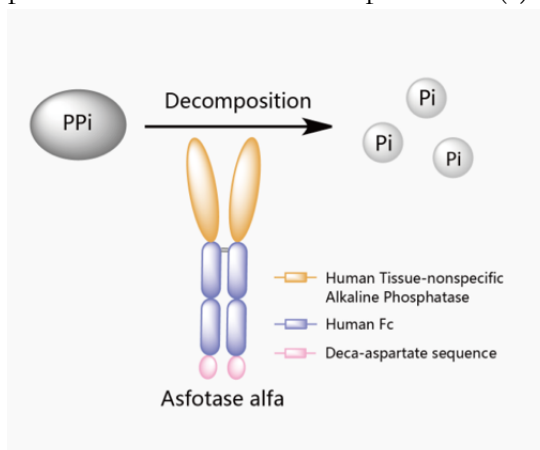


Figura 13. Representación de la estructura y mecanismo de asfotasa alfa

La asfotasa alfa, es una proteína formada por el dominio catalítico de TNSALP, el fragmento Fc de IgG1 y un motivo deca-aspartato que aumenta la afinidad para su unión a HA (168,198).

Los primeros resultados del estudio terapéutico con asfotasa alfa en 2012 en pacientes con HPP grave en las formas perinatales o infantil, demostraron una importante mejoría esquelética, muscular, pulmonar, así como del desarrollo cognitivo y motor. También se observó una disminución rápida de los niveles plasmáticos de PLP y PPi (168).

La asfotasa alfa se administra por vía subcutánea en dosis de 2 mg/kg de peso corporal tres veces por semana, o una pauta posológica de 1 mg/kg de peso corporal administrada por vía subcutánea seis veces por semana. La dosis máxima recomendada de asfotasa alfa es de 6 mg/kg/semana (8,199). Las reacciones adversas que pueden parecer con mayor frecuencia son reacciones locales en el lugar de la inyección y lipodistrofia local de forma ocasional, además de fiebre y cefalea (200).

Estudios recientes han demostrado la eficacia del tratamiento con asfotasa alfa en adultos y adolescentes con HPP de inicio pediátrico, mostrando una mejora de la consolidación ósea de las pseudoartrosis (201), una normalización de los niveles de los sustratos de TNSALP circulante y una mejora de las capacidades funcionales y calidad de vida relacionada con la salud (201–203), sin eventos adversos graves.

El tratamiento con asfotasa alfa requiere una correcta monitorización terapéutica, tanto para ajustar la dosis como para controlar los posibles efectos adversos. Además debe vigilarse la aparición de mineralización ectópica, manteniendo controles radiológicos, ecográficos renales y oftalmológicos (192). Actualmente se considera la solución terapéutica más efectiva para la HPP.

2. HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN

Hipótesis: La HPP es una enfermedad clasificada hasta la fecha como una enfermedad ultrarara debido a su baja prevalencia. Sin embargo, nosotros consideramos que no se trata de una patología tan infrecuente, sino que la baja prevalencia se debe a un serio problema de infradiagnóstico en la práctica clínica. Por lo tanto, sugerimos que la HPP podría tener una prevalencia mayor a la descrita. La implementación de un algoritmo diagnóstico puede solucionar el problema.

Justificación: El problema del infradiagnóstico de HPP unido a la reciente disponibilidad de un tratamiento eficaz para tratar esta patología ha generado la necesidad de establecer mejores algoritmos diagnósticos para la detección precoz de las formas de HPP info-juvenil, así como para reevaluar aquellos pacientes con alta sospecha clínica de HPP y que pudieran estar mal diagnosticados con otras patologías fenotípicamente similares, pero con una mayor prevalencia.

El laboratorio clínico juega un papel crucial en el diagnóstico de esta enfermedad. Sin embargo, el escaso valor conferido habitualmente a una actividad sérica de ALP disminuida (en contraste con la valoración que habitualmente se realiza de la hiperfosfatemia) es un factor limitante para el diagnóstico. De hecho, el informe de los valores disminuidos por debajo de los límites de normalidad para ALP, es una incorporación reciente en la práctica clínica.

Por otro lado, surge la necesidad de que los laboratorios clínicos reevalúen los métodos de análisis de los niveles de ALP sérica, adecuando los valores de referencia en función de la edad y el sexo, y diseñen conjuntamente con facultativos clínicos un algoritmo diagnóstico que permita la detección precoz de HPP.

Por lo tanto, el marco de esta tesis se centra en el diseño de un protocolo eficaz para mejorar el diagnóstico de HPP que pueda ser implantado en la práctica clínica para la detección precoz y fiable de este tipo de trastorno metabólico. Una búsqueda proactiva de este trastorno mediante un análisis estructurado y sistematizado permitirá conocer la prevalencia real de HPP en una población determinada y establecer medidas preventivas y terapéuticas apropiadas.

Debido a la gran variabilidad genética y clínica de la HPP, resulta de gran importancia llevar a cabo estudios de caracterización funcional tanto de las nuevas variantes del gen *ALPL* no descritas previamente, como de aquellas variantes de significado incierto que se vayan identificando, con el objeto de poder realizar una vinculación geno-fenotípica de cada una de ellas. De esta manera se podría ofrecer un diagnóstico individualizado para cada caso.

3. OBJETIVOS

Objetivo A: Estudio Retrospectivo

1. Identificación de posibles diagnósticos omitidos de HPP en población adulta e infantil en el Hospital Universitario Clínico San Cecilio de Granada en el año 2016 siguiendo el algoritmo planteado en esta tesis doctoral
2. Generación de un estudio poblacional de prevalencia de este tipo de patología en Granada.
3. Caracterización funcional *in vitro* de las variantes no descritas previamente.

Objetivo B: Estudio Prospectivo

1. Transferencia de los valores de referencia de ALP ajustados por edad y sexo e implantación de un algoritmo diagnóstico en la práctica clínica en el laboratorio del Hospital Universitario Clínico San Cecilio de Granada.
2. Detección precoz prospectiva de casos de HPP mediante el algoritmo implantado.
3. Caracterización geno-fenotípica de las variantes de significado incierto.

4. METODOLOGÍA Y POBLACIÓN DE ESTUDIO

4.1. Ámbito geográfico

El presente estudio se ha llevado a cabo dentro del área de cobertura del Hospital Universitario Clínico San Cecilio con asistencia a todo el Distrito Sanitario Granada-Metropolitano.

4.2. Población de estudio

El Distrito Sanitario de Atención Primaria Granada–Metropolitano está compuesto por una población aproximada de cerca de 660.000 habitantes.

En el estudio retrospectivo se revisaron todos los sujetos que habían recibido evaluación de la actividad ALP en la Unidad de Gestión Clínica de Laboratorios (UGCL) del Hospital Universitario Clínico San Cecilio de Granada durante un periodo de 12 meses (1 enero-31 diciembre 2016). El alcance en este estudio retrospectivo engloba un total de 78.590 sujetos (76.083 sujetos correspondientes a población adulta y 2.507 sujetos correspondientes a población pediátrica).

Por otra parte, en el estudio prospectivo se revisaron todas las analíticas de los sujetos que contaban con alguna determinación de los niveles séricos de ALP en UGCL del Hospital Universitario Clínico San Cecilio de Granada durante un periodo de 12 meses (1 de junio de 2018-31 de mayo de 2019). El alcance para el estudio prospectivo es de un total de 64.013 sujetos (62.412 sujetos correspondientes a población adulta y 2.507 sujetos correspondientes a población pediátrica).

4.3. Prevalencia

- La prevalencia de HPP en la población europea se ha estimado en 1/300.000 para las formas clínicas graves (16) y para las formas clínicas moderadas 1/2.430 (148). En España la prevalencia es desconocida.

4.4. Criterios de inclusión

- Aceptación y comprensión del consentimiento informado.
- Actividad ALP disminuida de forma persistente siguiendo los criterios que se detallan en el punto 4.6.1
- Historia clínica de patología musculo-esquelética y/o reumatológica
- Historia clínica con patología dental
- Historia clínica con patología renal
- Historia clínica con patología neurológica (convulsiones)

4.5. Criterios de exclusión

- Cirugía bypass coronario
- Enfermedad celíaca
- Tratamiento con Clofibrato
- Hipotiroidismo
- Displasia cleidocraneal
- Síndrome de Cushing
- Transfusión masiva
- Tratamientos con fármacos como clofibrato, antirresortivos óseos, tamoxifeno, glucocorticoides, quimioterápicos.
- Mieloma múltiple
- Intoxicación por vitamina D
- Deficiencia de vitamina C
- Anemia perniciosa o profunda
- Envenenamiento por metales pesados radiactivos
- Osteogénesis imperfecta tipo II
- Síndrome calcio-alcálicos
- Deficiencia de Zn^{2+} o Mg^{2+}
- Enfermedad de Wilson
- Sangre recolectada incorrectamente (oxalato, ácido etilendiaminatetraacético (EDTA))
- Inanición

4.6. Diseño del estudio

4.6.1. Estudio Retrospectivo

El presente estudio fue aprobado por el comité de ética del Hospital Universitario Clínico San Cecilio de Granada de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial (Proyecto ID: 0768-N-17. Comité de Ética en Investigación del Centro de Granada (CEI-Granada) el 5 de septiembre de 2017).

Se establecieron distintos grupos de sujetos en base a los siguientes tramos de edad:

-Tramo 1: Población infantil (de 0 a 12 años)

-Tramo 2: Población adolescente (de 13 a 19 años)

-Tramo 3: Población adulta (20 años o más)

Se utilizaron los valores de referencia para la población pediátrica que se muestran en la Tabla 4. De acuerdo con estos valores, los límites de ALP para incluir a los pacientes en este estudio, son los que se detallan a continuación:

-Tramo 1: dos o más determinaciones de ALP de ≤ 100 U/L

-Tramo 2: dos o más determinaciones de ALP de ≤ 50 U/L

-Tramo 3: dos o más determinaciones de ALP, al menos una de ellas ≤ 30 U/L y el resto ≤ 40 U/L

Tabla 4. Valores de referencia de ALP estratificados por edad y sexo usados durante estudio retrospectivo.

Población pediátrica	Niños (U/L)	Niñas (U/L)
1–30 días	75–316	48–406
30 días–1 año	82–383	124–341
1–3 años	104–345	108–317
4–6 años	93–309	96–297
7–9 años	86–315	69–325
10–12 años	42–362	51–332
13–15 años	74–390	50–162
16–18 años	52–171	47–119
Adultos	40-120 U/L	

En el laboratorio de análisis clínicos Hospital Universitario Clínico San Cecilio de Granada se implantó un algoritmo diagnóstico ante la sospecha clínica de HPP para la detección precoz de forma prospectiva de casos de HPP.

De este modo, el protocolo de diagnóstico de HPP comienza con la identificación un resultado de ALP inferior a los valores de referencia, a través de la base de datos del sistema informático de laboratorio, que se establecieron en los distintos grupos de sujetos en base a los distintos tramos de edad descritos anteriormente.

Seguidamente, se llevan a cabo los siguientes pasos:

- a) Si en la historia clínica existen dos o más resultados de ALP, pero alguno de ellos no está por debajo de los valores de referencia, se analizan los niveles de ALP en futuras analíticas, además de valorar las manifestaciones clínicas asociadas en el paciente afectado.
- b) Si no existen más resultados de niveles séricos de ALP y el paciente tiene una alta sospecha de HPP debido a manifestaciones clínicas compatibles con esta patología, se recomienda solicitar una nueva determinación del nivel de ALP para comprobar si los niveles disminuidos se mantienen de forma persistente.
- c) En el caso de valores persistentemente bajos de ALP:
 - c.1) Descartar otras causas que disminuyan la actividad de ALP (Ver Tabla 2).

- c.2) Si el paciente presenta una alta sospecha de HPP por sintomatología clínica compatible tras excluir causas secundarias de hipofosfatemia, se recomienda la derivación a la unidad especializada más adecuada para su edad (pediatría o endocrinología).
- d) Pruebas de segundo nivel para el diagnóstico de HPP:
 En la unidad de pediatría o endocrinología se le informará al paciente sobre la enfermedad y se solicitará:
- d.1) Determinación de niveles séricos de PLP.
- d.2) En caso de valores de PLP por encima de los valores de referencia (3,6 a 18 ng/mL) se solicitarán estudios de secuenciación del gen *ALPL* para la identificación de variantes genéticas asociadas a HPP (Figura 14).

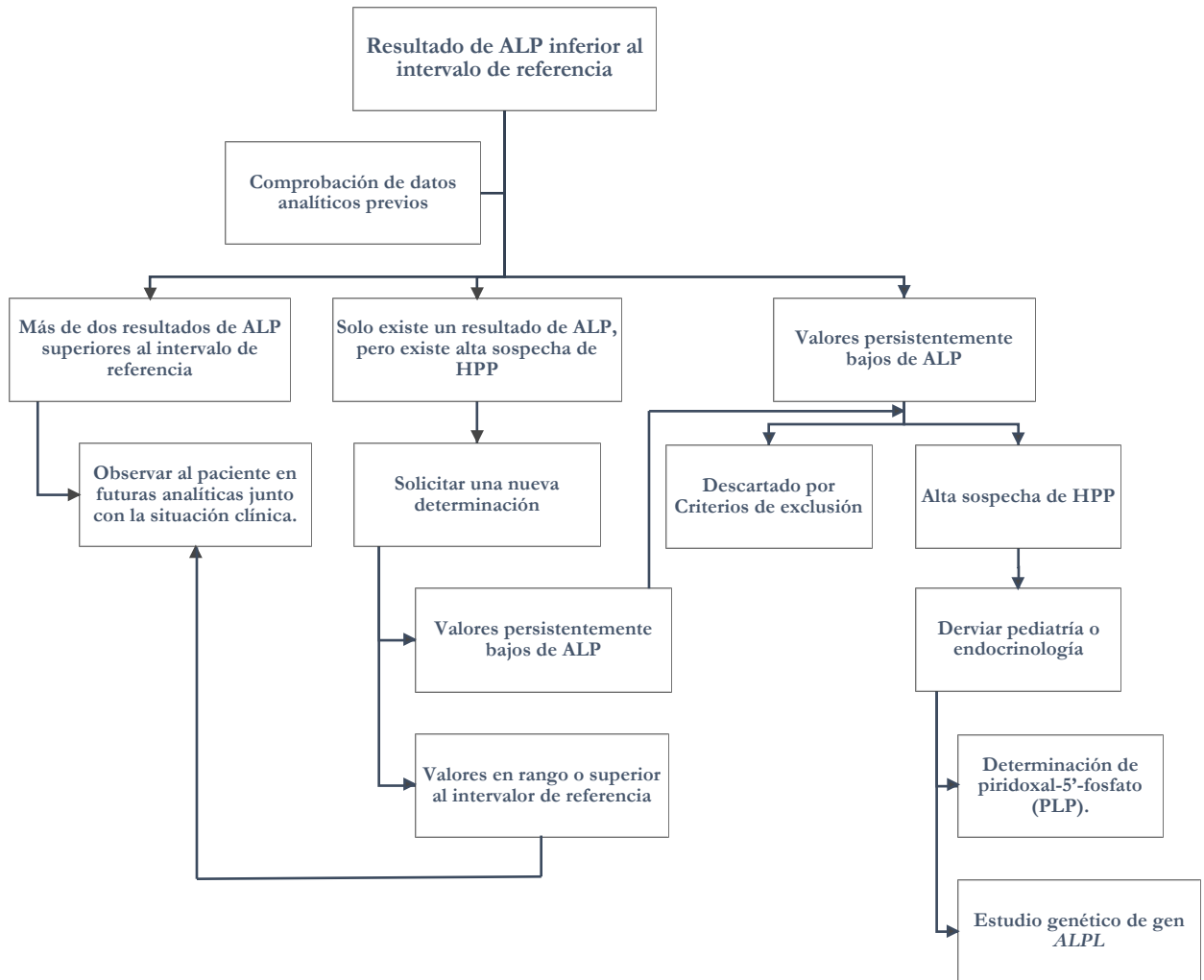


Figura 14. Algoritmo diagnóstico de HPP llevado a cabo en la UGCL.

4.6.2. *Estudio Prospectivo*

El presente estudio fue realizado de acuerdo a los estándares éticos del comité ético de investigación provincial de Málaga (CEI Málaga) y de la Declaración de Helsinki de 1975, revisada en 2013. (aprobado el 11-abril-2018).

De acuerdo con la reunión mantenida por el Grupo de Trabajo Andaluz de Hipofosfatasa y Laboratorio Clínico el mes de junio de 2017 en Antequera, se acordó modificar los valores de referencia para la fosfatasa alcalina en el laboratorio de análisis clínicos del Hospital Universitario Clínico San Cecilio en población pediátrica, basándose en el estudio CALIPER para la población pediátrica, y en los valores de referencia recomendados por la IFCC para la población adulta (Tabla 5).

Tabla 5. Valores de referencia de ALP estratificados por edad y sexo basados en el estudio CALIPER para población pediátrica y en los estándares de la IFCC para población adulta.

<i>Sexo</i>	<i>Desde</i>	<i>Hasta</i>	<i>L (U/L)</i>	<i>H (U/L)</i>	<i>Referencia</i>
Femenino	0 días	14 días	76	233	CALIPER
Femenino	15 días	1 año	113	443	CALIPER
Femenino	2 años	9 años	132	315	CALIPER
Femenino	10 años	12 años	119	393	CALIPER
Femenino	13 años	14 años	52	239	CALIPER
Femenino	15 años	16 años	45	108	CALIPER
Femenino	17 años	18 años	40	80	CALIPER
Femenino	19 años	150 años	33	98	IFCC
Masculino	0 días	14 días	76	233	CALIPER
Masculino	15 días	1 año	113	443	CALIPER
Masculino	2 años	9 años	132	315	CALIPER
Masculino	10 años	12 años	119	393	CALIPER
Masculino	13 años	14 años	107	442	CALIPER
Masculino	15 años	16 años	75	312	CALIPER
Masculino	17 años	18 años	49	139	CALIPER
Masculino	19 años	150 años	43	115	IFCC

L: Valor inferior; H: Valor superior

Además de las modificaciones de los valores de referencia, también se modificó parte del algoritmo diagnóstico inicial. De tal manera que, siguiendo este nuevo procedimiento, en el estudio prospectivo se revisaron las determinaciones de actividad ALP durante la validación rutinaria realizada en el laboratorio que presentaban niveles inferiores a los valores de referencia (Tabla 5), sin utilizar los tramos de edad del estudio retrospectivo. El resto del algoritmo diagnóstico quedó invariable.

Los protocolos usados tanto en el estudio retrospectivo como en el prospectivo incluyeron para todos los participantes seleccionados:

- La cumplimentación de un cuestionario de calidad de vida, modelo EQ-5D (Anexo 1) por cada uno de los sujetos participantes.
- Para el estudio bioquímico de HPP se redactó un documento de consentimiento informado específico del proyecto que fue firmado por el paciente, o por sus progenitores en el caso de menores de edad. Además, a cada participante en el estudio se le proporcionó un documento de consentimiento informado adicional para la realización del estudio genético de HPP, proporcionado por el Centro de Diagnóstico Biomédico (CDB) del Hospital Clínic de Barcelona, donde se llevó a cabo la secuenciación del gen *ALPL* (Anexos 2 y 3 respectivamente).
- Extracción de sangre para determinar los niveles séricos de PLP
- Extracción de sangre para identificar las variantes del gen *ALPL* que codifica la proteína TNSALP mediante la secuenciación de los exones y las regiones colindantes.

4.7. Limitaciones del estudio retrospectivo y prospectivo:

Debido al gran volumen de datos que se estudian en la UGCL del Hospital Universitario Clínico San Cecilio de Granada, puede darse el caso de que no existan datos actualizados en las historias clínicas sobre los datos de contacto de los potenciales sujetos afectados. Esto puede dar lugar a la imposibilidad de contactar con los pacientes afectados suponiendo un sesgo para el estudio. En otras ocasiones, puede ocurrir que sean los propios pacientes los que no estén interesados en participar en el estudio.

4.8. Variables de los estudios:

4.8.1. Variables clínico-demográficas:

- *Edad*
- *Sexo*
- *Historia de fracturas (fracturas de estrés en metatarsianos, fracturas de fémur, fracturas de repetición, etc.)*
- *Condrocalcinosis*
- *Anormalidades dentales (pérdida prematura de dientes deciduales, caries de repetición, deformidad dental y/o mandibular, etc.)*
- *Convulsiones dependientes de piridoxina*
- *Patologías músculo esqueléticas, reumatológicas y/o renales*

4.8.2. Variables analíticas

- Fosfatasa alcalina:

Los niveles de ALP se midieron en muestras de sangre mediante espectrofotometría de absorción en analizadores AU5800 (Beckman Coulter, California, EEUU). Para ello se utilizó el método basado en las recomendaciones de la IFCC. La actividad ALP se determinó midiendo la tasa de conversión de p-nitrofenil fosfato (pNPP) en p-nitrofenol (pNP) en presencia de iones magnesio y zinc y de 2-amino-2-metil-1-propanol (AMP) como aceptor de fosfato a pH 10,4. La tasa de cambio en la absorbancia debido a la formación de pNP se midió bicromáticamente a 410/480 nm siendo esta tasa una función directa de la actividad de ALP en la muestra. Las determinaciones de fosfatasa alcalina de rutina fueron realizadas en el Laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Clínico San Cecilio de Granada.

- Piridoxal-5'-fosfato:

Las concentraciones plasmáticas de PLP, forma activa de vitamina B6 y uno de los sustratos principales de la TNSALP, se determinaron mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) en la Unidad de Análisis Clínicos del Hospital Infantil Universitario Niño Jesús (Madrid). La determinación cromatográfica se realizó en un sistema HPLC isocrático con detector de fluorescencia. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 320 nm y 415 nm, respectivamente. Los valores de referencia de PLP fueron de 3,6 a 18 ng/mL.

- Secuenciación del gen *ALPL*:

- a) Estudio retrospectivo:

En el estudio retrospectivo se realizó la extracción de DNA de linfocitos de sangre periférica y a continuación la amplificación del gen *ALPL* mediante PCR. Posteriormente, se realizó secuenciación Sanger, utilizando como base el producto de la PCR, con el objeto de conocer la secuencia de las regiones codificantes y uniones exón-intrón del gen *ALPL* utilizando como referencia la secuencia truncada NM_000478.4. Esta técnica permite secuenciar de forma independiente ambas hebras de DNA con nucleótidos marcados con fluorescencia. El producto de la reacción de secuenciación se leyó en un secuenciador automático, mediante una electroforesis capilar.

Los resultados del estudio genético en el estudio retrospectivo fueron aportados por el Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM) del Hospital Infantil Universitario Niño Jesús (Madrid), según a la metodología descrita por Riancho et al., (2016) (215).

b) Estudio prospectivo:

En esta parte del estudio, se utilizó la metodología detallada en el punto anterior, pero utilizando como referencia la secuencia truncada (NM_000478.5). A continuación, se realizó un estudio de variantes en número de copias mediante amplificación de sondas tras ligación múltiple (MLPA)(MRCHolland) y posterior análisis de resultados mediante el programa SeqPilot (JSI Medical Systems).

Los resultados de la secuenciación del gen *ALPL* en DNA de sangre periférica en el estudio prospectivo fueron aportados por el CDB del Hospital Clínic de Barcelona.

4.9. Estudio de caracterización funcional y estructural de las nuevas variantes identificadas

Durante el estudio retrospectivo identificamos dos nuevas variantes en el gen *ALPL* no descritas previamente [(c.558G>A;p.Trp186*) y (c.1327G>A;p.Ala443Thr)], mientras que durante el estudio prospectivo identificamos tres variantes de significado incierto [(c.69_74del; p.Glu23_Lys24del), (c.875C>T; p.Pro292Leu) y (c.1135C>A;p.His379Asn)]. Se llevaron a cabo estudios de caracterización funcional de estas variantes genéticas de TNSALP con el objetivo de determinar el grado de afectación de la enzima, así como para intentar realizar una vinculación geno-fenotípica y estructural de cada variante. Para ello se llevó a cabo la transfección de células humanas embrionarias de riñón (HEK293T) con el vector pcDNA 3.1 conteniendo las distintas secuencias codificantes para cada una de las variantes del gen *ALPL* a estudiar incluyendo la secuencia WT de *ALPL*.

4.9.1. Diseño de vectores de expresión

Los vectores empleados a lo largo de estudio de caracterización de las variantes se fundamentaron en la modificación del plásmido pcDNA 3.1, al cual se le insertó el gen *ALPL* con las diferentes mutaciones de estudio planteadas (pcDNA 3.1:*ALPL* c.558G>A, pcDNA 3.1:*ALPL* c.1327G>A, pcDNA 3.1:*ALPL* c.69_74del, pcDNA 3.1:*ALPL* c.875C>T y pcDNA 3.1:*ALPL* c.1135C>A). Además de estos vectores, se utilizó el plásmido pcDNA 3.1 sin ningún inserto (pcDNA 3.1) y el vector pcDNA 3.1 con el inserto del gen *ALPL* WT (pcDNA 3.1:*ALPL*) para su uso como controles en los ensayos a realizar. En este caso, el plásmido pcDNA 3.1:*ALPL* actuó como referencia para estudiar los cambios funcionales

promovidos por las variantes. Por su parte, el vector pcDNA 3.1 vacío fue utilizado como control interno para comprobar la expresión basal del gen *ALPL* a nivel celular. Estos plásmidos cuentan con promotores de citomegalovirus, así como genes que confieren resistencia a ampicilina y neomicina para su selección en cultivos procariontes y eucariotas, respectivamente. Las secuencias del gen *ALPL* y sus correspondientes variantes genéticas fueron insertadas cada una independientemente en el multicloning site, con las secuencias flanqueantes para las enzimas *HindIII* y *BamHI* (Figura 15). Todos los vectores fueron suministrados por GenScript.

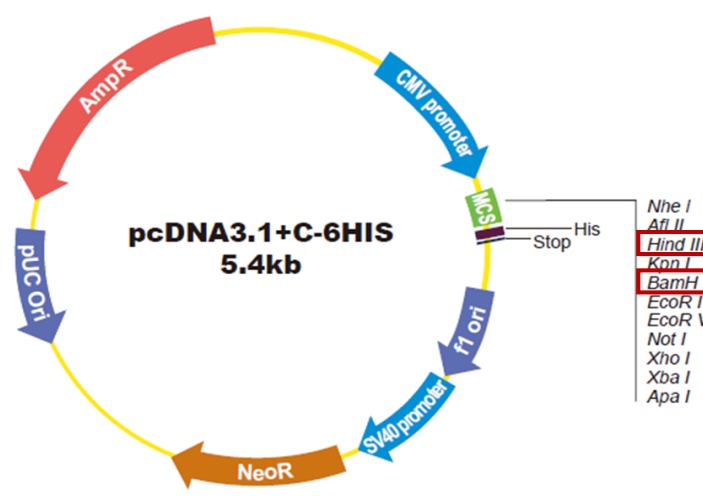


Figura 15. Estructura del plásmido pcDNA 3.1.

En rojo aparece representado el gen de resistencia a ampicilina. En verde aparece representada la región de multicloning site (MCS) seleccionada para insertar el gen *ALPL*, flanqueada por las dianas de las enzimas de restricción *Hind III* y *BamHI*.

4.9.2. Transformación de *Escherichia coli* JM109 (*E. coli* JM109) con los distintos plásmidos

Para aumentar la cantidad de los diferentes plásmidos que se emplearon posteriormente en los experimentos propuestos, se realizó una transformación de la cepa JM109 de *E. coli* mediante choque térmico. En este proceso, se introdujeron los plásmidos pcDNA 3.1, pcDNA 3.1: *ALPL* WT, pcDNA 3.1: *ALPL* c.558G>A, pcDNA 3.1: *ALPL* c.1327G>A, pcDNA 3.1: *ALPL* c.69_74del, pcDNA 3.1: *ALPL* c.875C>T y pcDNA 3.1: *ALPL* c.1135C>A.

Para cada una de las transformaciones, se mezclaron 50 μ L de células competentes *E. coli* JM109 y un 1 μ g de cada uno de los plásmidos de interés. Esta mezcla se mantuvo en hielo durante 5 minutos (min). Seguidamente, se realizó un choque térmico de 42 $^{\circ}$ C durante 90

segundos (s), y la mezcla se volvió a transferir rápidamente a hielo durante 5 min. A continuación, se añadieron 900 μ L de LB y la mezcla se incubó durante 1 hora (h), a 37 °C y a 200 rpm, para la recuperación y crecimiento de estas células. Finalmente, las células se centrifugaron a 4000 rpm durante 5 min y se procedió a la siembra por agotamiento del pellet obtenido en placas de LB-agar con ampicilina (100 mg/mL), a fin de seleccionar las colonias que contenían el plásmido de interés, dejando las placas incubar overnight a 37 °C. Tras el crecimiento de colonias aisladas, éstas se picaron y se sembraron en 100 mL de LB líquido suplementado con ampicilina (100 mg/mL), dejándose incubar overnight a 37 °C y 200 rpm. Transcurrido este periodo, se procedió a la extracción de los plásmidos, realizando una Midiprep, mediante el kit NucleoBond® Xtra Mida EF (Macherey-Nagel™) y siguiendo el protocolo del fabricante. La pureza y concentración de los plásmidos extraídos se determinó mediante una lectura espectrofotométrica, empleando el NanoDrop Spectrophotometer (bioNovan), seleccionando únicamente las muestras con relaciones de absorbancia 280/260 nm comprendidas en torno a 1,8.

Seguidamente, se realizaron comprobaciones para confirmar que los plásmidos extraídos eran los correctos. En primer lugar, se realizó una PCR utilizando el kit comercial de Horsepower Taq DNA Polimerase (Canvax), siguiendo el protocolo establecido por la casa comercial y usando como cebadores, pares de oligonucleótidos complementarios a las secuencias del pcDNA 3. Para ello, se programaron los ciclos a 94 °C 5min, 25 x (95 °C 35s, 59 °C 35s, 72°C-1 min/kb), 72°C 7min, 4°C. Por último, la visualización del proceso de amplificación se realizó por electroforesis en un gel de agarosa al 2%, empleando el DNA Ladder (Canvax) como marcador de peso molecular.

4.9.3. Cultivo de células renales HEK293T

Toda la experimentación se realizó en células humanas embrionarias de riñón 293T (HEK293T), proporcionada por la casa comercial ATCC®. Esta línea en concreto se seleccionó debida a su alta capacidad replicativa y a la sencillez de su transfección, además de ser un modelo idóneo para la expresión del gen *ALPL*. Los cultivos se realizaron en medio Advanced Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 1X (gibco® by lifetechnologies™), suplementado con suero bovino fetal (FBS, por sus siglas en inglés) al 10%, HAM's F12 (biowest) al 5% y antibiótico/antimicótico (biowest) al 1%.

Previo al 90% de confluencia, se realizó el subcultivo de la línea celular. Los correspondientes subcultivos se obtuvieron sembrando 15.000 células/cm² en un Flask T-75 dada su elevada tasa de proliferación.

4.9.4. Transfección transitoria de células HEK293T

El proceso de transfección transitoria de la línea HEK293T con los diferentes plásmidos de estudio se llevó a cabo mediante lipofección, empleando para ello el reactivo LipoD293 (SigmaGen laboratories). La transfección transitoria de las diferentes construcciones del estudio se realizó por triplicado. Para ello, se sembraron 150.000 células/pocillo en placas de 24 pocillos, dejándolas crecer durante 24 h a 37 °C y 5% CO₂. La transfección se llevó a cabo siguiendo los protocolos establecidos por la casa comercial, en concreto empleando 1,5 µL de LipoD293, 500 ng de DNA (plásmido de interés) y Advance DMEM sin suplementar (Volumen final = 50 µL) por cada pocillo a transfectar. La máxima producción de TNSALP se obtuvo a las 48 h, momento en el que se realizaron las determinaciones de actividad enzimática de fosfatasa alcalina y las extracciones de RNA.

4.9.5. Determinación de la actividad enzimática de ALP

La determinación de la actividad enzimática de ALP se realizó con el Alkaline Phosphatase Assay Kit (Abnova) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se realizaron triplicados para cada grupo, tanto para análisis de actividad ALP del extracto extracelular como de la fracción intracelular. La lisis celular se llevó a cabo mediante Tritón x-100 (0,2%). Las determinaciones colorimétricas asociadas a la actividad ALP fueron analizadas en un espectrofotómetro (Dynex Technologies) a una absorbancia de 405 nm y el proceso se repitió a los 4 min. La velocidad de la reacción es directamente proporcional a la actividad enzimática. Finalmente, las actividades terminaron de cuantificarse realizando cálculos entre ambas determinaciones y normalizando con el blanco (H₂O milliQ) y el calibrador (incluido en el propio kit).

4.9.6. Determinación de la expresión transcripcional de ALPL

La determinación de la expresión transcripcional de *ALPL* transfectado se realizó mediante una extracción de RNA total, seguida de una retrotranscripción (RT) y una PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR). La extracción de RNA de cada uno de los grupos se realizó empleando el kit comercial RNeasy® Mini Kit (QIAGEN) según las recomendaciones del fabricante. La determinación de la concentración y calidad de RNA se realizó empleando NanoDrop Spectrophotometer (bioNovan). De estas únicamente se retrotranscribieron las muestras que presentaron una relación de absorbancia 260/280 nm = 2. La síntesis de cDNA mediante RT se realizó a partir de 1µg RNA en los diferentes grupos, utilizando el kit iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad). Los ciclos de RT se programaron con un priming de 5 min a 25°C, transcripción reversa durante 20 min a 46 °C, inactivación de la retrotranscriptasa durante 1 min a 95°C, y finalmente la etapa de enfriamiento a 4°C durante tiempo indefinido.

Finalmente, la determinación de la expresión génica se realizó mediante una qPCR empleando el termociclador CFX96 Real-Time thermocycler (Bio-Rad). Para la realización de esta, se empleó el gen de la proteína ribosomal 13 (RPL13) como *housekeeping* dada su expresión constitutiva, a fin de poder normalizar los resultados obtenidos en el proceso. Se emplearon los cebadores de ambos genes a una concentración de 15µM y el kit PowerUp SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Science).

El conjunto de cebadores diseñados para amplificar un fragmento de 121 pb del gen *ALPL* de plásmidos tanto WT como mutantes es el siguiente:

ALPL-F: 5'-TGGCACCTGCCTTACTAACT-3' y

ALPL-R: 5'-CACGTTGGTGTGAGCTTCT-3'.

Los datos de expresión génica se normalizaron a la expresión del gen de referencia de la proteína ribosómica L13 (RPL13) y se informaron como expresión de *ALPL* normalizada. Se utilizó el siguiente conjunto de cebadores para amplificar el gen de referencia: *RPL13-F*: 5'-CGTAAGATCCGCAGACGTAAGGC-3' y *RPL13-R*: 5'-GGACTTGTTCGCCTCCTCGGAT-3'.

4.9.7. Modelado tridimensional de la proteína TNSALP

En primer lugar, se identificó la secuencia proteica mediante una búsqueda en UniProt, obteniendo de esta forma la secuencia WT de la proteína (Uniprot ID: P05186). Una vez se obtuvo esta secuencia, se establecieron las distintas secuencias con las variantes a analizar (p.Trp186*, p.Ala443Thr, p.Glu23_Lys24del, p.Pro292Leu y p.His379Asn). Seguidamente, se realizó un alineamiento de las secuencias mutadas mediante Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) confirmando que en cada caso la proteína con mayor Query Cover y porcentaje de identidad correspondía con la TNSALP humana. Una vez comprobada la identidad de las secuencias mutadas, se empezó el modelaje tridimensional, empleando para ello el programa SWISS MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>). Este programa permite establecer predicciones tridimensionales de secuencias aminoacídicas, comparándolas con proteínas ya cristalizadas que comparta una cierta homología en la secuencia o en la estructura a la que darían lugar. Por ello y dado que la TNSALP no se encuentra cristalizada, se empleó como molde para el modelaje la proteína mutada y WT de la proteína cristalizada con mayor homología estructural y secuencial. Adicionalmente, también se buscó que este molde compartiera un número mínimo de ligandos, dado que estos podrían interferir en la determinación de la estructura tridimensional.

La proteína seleccionada como molde fue la isoforma placentaria PLAP que comparte un 74% de homología en su secuencia aminoacídica con TNSALP (Uniprot ID: P05187) (SMTL ID: 1ew2). Finalmente, la visualización del modelado 3D se realizó con el software USCF Chimera (205).

4.9.8. Análisis estadístico

Estudio retrospectivo

Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk para estudiar la distribución de las variables. La medida de ALP se calculó en base a los resultados de tres experimentos independientes en células transfectadas. Se realizó una transformación de \log_{10} para normalizar estos datos y se realizó un ANOVA para comparar las diferencias entre los grupos. La significación estadística se estableció en $p < 0,05$ (dos colas).

Estudio prospectivo

Para este análisis se partió de los datos en bruto por triplicado para cada uno de los grupos. Partiendo de estos, se pudieron observar las diferencias estadísticamente significativas, para niveles de significancia ($p \leq 0,05$), mediante la realización de pruebas de ANOVA comparando los diferentes grupos experimentales.

El análisis estadístico se realizó con el software específico SPSS versión 22.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL).

5. RESULTADOS

5.1. Estudio Retrospectivo

5.1.1. Filtrado de pacientes en la población adulta

La base de datos de la Unidad de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Clínico San Cecilio de Granada registró aproximadamente 121.000 análisis de ALP correspondientes a 78.590 sujetos (76.083 correspondientes a población adulta y 2.507 a población pediátrica) entre el 1 de enero y el 31 de diciembre de 2016. Entre la población adulta, identificamos 1.907 sujetos con niveles de ALP por debajo del límite inferior de los valores de referencia (40 U/L). Para reducir los falsos positivos, se excluyeron 1.551 sujetos que tenían solo una evaluación de ALP. Entre los 356 sujetos restantes que mostraron dos o más evaluaciones de $ALP \leq 40$ U/L, se seleccionaron 65 sujetos con al menos una evaluación de $ALP \leq 30$ U/L. Tras revisar las historias clínicas, se excluyeron 9 sujetos por causas secundarias de HPP (mieloma múltiple (n = 1), síndrome leche-alcalino (n = 1), desnutrición (n = 1) o por muerte (n = 6)). Entre los 56 sujetos restantes, 16 sujetos (50 ± 16 años, 81% mujeres) aceptaron participar en el estudio (Figura 16), a los que se les determinó las concentraciones de PLP.

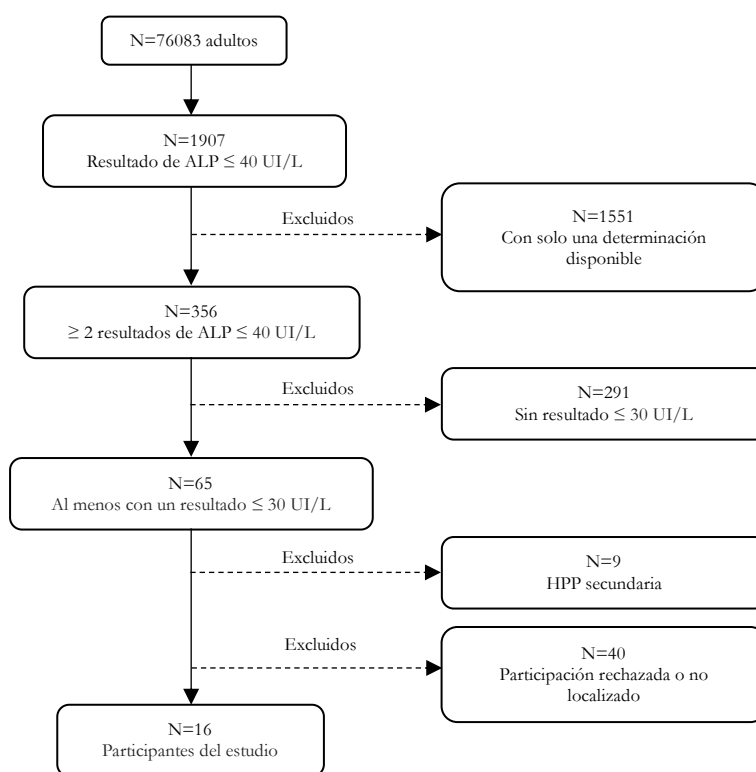


Figura 16. Diagrama de flujo del reclutamiento de pacientes potencialmente afectados por HPP de la población adulta.

5.1.2. Características bioquímicas y clínicas en adultos.

De los 16 sujetos seleccionados en la cohorte de población adulta, la mayoría eran asintomáticos para HPP o presentaban síntomas leves. Ninguno de ellos había sido diagnosticado previamente de HPP. El diagnóstico principal de cada paciente se describe en la Tabla 6, incluyendo algunos diagnósticos relacionados con la HPP, como osteoartritis (n = 2), enfermedad reumática inflamatoria (n = 1), osteoporosis (n = 3) y fibromialgia (n = 1). Sin embargo, la mayoría de los 16 sujetos presentaron otros diagnósticos no relacionados con HPP. Ninguno de ellos tenía antecedentes familiares de HPP o raquitismo en la infancia. Ninguno de ellos había sido tratado con bifosfonatos. Ocho de los 16 pacientes (7 de ellos mujeres) tenían fracturas prevalentes (metatarso, húmero, tibia, tobillo, muñeca, peroné o cadera). Seis de los 16 pacientes (5 mujeres y 1 hombre) tenían condrocalcinosis sintomática. Cinco de los 16 pacientes informaron anomalías dentales. Con respecto a las determinaciones bioquímicas, 10 adultos mostraron niveles disminuidos de ALP y niveles aumentados de PLP en comparación con los valores de referencia. Siete de estos diez pacientes presentaron mutaciones en el gen *ALPL*. Dos de estas mutaciones identificadas correspondían a nuevas variantes no descritas previamente.

Tabla 6. Características clínicas, niveles de ALP, niveles de PLP y estudio genético en población adulta. **Estudio Retrospectivo**

Nº	Años	Sexo	Historia de fracturas	Condrocalcinosis	Anormalidades dentales	Diagnóstico principal	ALP (UI/L)	PLP (ng/mL)	Estudio genético
1	50	F	1 (metatarso)	No	No	Esclerosis múltiple	25	58.76*	c.659G>T; p.Gly220Val
2	53	M	No	No	No	Policitemia vera	30	13.95	(-)
3	69	F	1 (muñeca)	No	No	Osteoartritis	17	55.74*	c.1366G > A; p.Gly456Arg
4	27	F	No	No	Si	Enfermedad de Thiemann, Colitis ulcerosa	25	12.17	(-)
5	53	M	2 (metatarso, tobillo)	No	No	Dermatitis	26	22.99*	c.473-2A>G
6	43	F	No	Si	No	Miastenia gravis	25	23.90*	(-)
7	48	F	1 (tobillo)	Si	No	Esclerosis sistémica, osteoporosis	29	8.98	(-)
8	45	F	No	Si	No	Lupus, cáncer colon	30	12.02	(-)
9	34	F	3 (metatarso, muñeca, cadera)	No	No	Púrpura trombocitopénica idiopática	19	24.12*	c.558G > A; p.Trp186* ^a
10	45	F	2 (tibia, peroné)	No	Si	Fractura de tobillo	30	9.41	(-)
11	60	M	No	Si	No	Pancreatitis aguda, leucemia linfocítica colelitiasis	20	19.66*	(-)
12	38	F	2 (metatarso, tobillo)	Si	Si	Colitis ulcerosa	28	37.41*	(-)
13	30	F	No	No	Si	Espondiloartritis anquilosante	22	19.48*	c.558G>A; p.Trp186* ^a
14	65	F	No	Si	Si	Fibromialgia, osteoartritis, osteoporosis	18	62.26*	c.1327G>A; p.Ala443Thr ^b
15	70	F	1 (húmero)	No	No	Osteoporosis, cáncer de mama	21	37.25*	c.1327G>A; p.Ala443Thr ^b
16	36	F	No	No	No	Artritis crónica, fibromialgia, lupus	26	9.47	(-)

^a Primera variante genética encontrada. ^b Segunda variante genética encontrada. (-) denota un resultado negativo. * Niveles de PLP superiores a los valores de referencia.

5.1.3. Resultados genéticos en la población adulta

De los 10 adultos a los que se les realizó estudio genético, 7 de ellos presentaron mutaciones en el gen *ALPL*, siendo diagnosticados de HPP. Dos pacientes (pacientes 9 y 13, Tabla 6) presentaron la misma mutación en el gen *ALPL* en el exón 6 en heterocigosis, c.558G> A; p.Trp186*. Mientras que otros dos pacientes (pacientes 14 y 15, Tabla 6) presentaron una mutación *ALPL* en el exón 12 en heterocigosis, c.1327G> A; p.Ala443Thr. Estas dos mutaciones son nuevas variantes genéticas, no descritas previamente.

Los otros tres pacientes mostraron mutaciones en el gen *ALPL* descritas previamente. Uno de ellos (paciente 5, Tabla 6), presentó una mutación en el exón 6 en heterocigosis, en la región aceptora canónica de splicing (c.473-2A>G), lo que provocó una alteración en el procesamiento del mRNA. Otro sujeto (paciente 1, Tabla 6) presentó una mutación en el exón 7 en heterocigosis (c.659G> T; p.Gly220Val25). El sujeto restante (paciente 3, Tabla 6) presentó una mutación en el exón 12 en heterocigosis (c.1366G>A; p.Gly456Arg) encontrando una variante similar en estudios previos (161).

De los 7 pacientes adultos con mutación en el gen *ALPL*, cinco de ellos presentaron antecedentes de fracturas, uno de ellos presentó condrocalcinosis y dos de ellos informaron anomalías dentales (Tabla 6). Entre los sujetos estudiados, encontramos que los pacientes con mutación en el gen *ALPL* mostraron niveles significativamente más bajos de ALP y niveles más altos del sustrato PLP (Figura 17). Además, los pacientes con fracturas mostraron niveles de PLP más elevados que los pacientes sin fracturas, aunque sin alcanzar significación estadística (Figura 18).

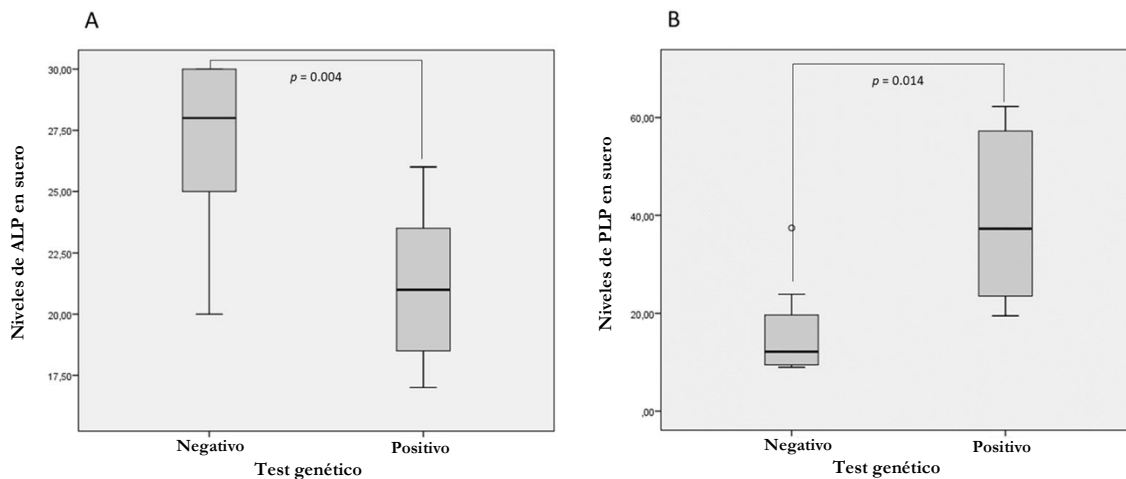


Figura 17. Niveles séricos de ALP y PLP en presencia o ausencia de mutaciones en el gen *ALPL*.

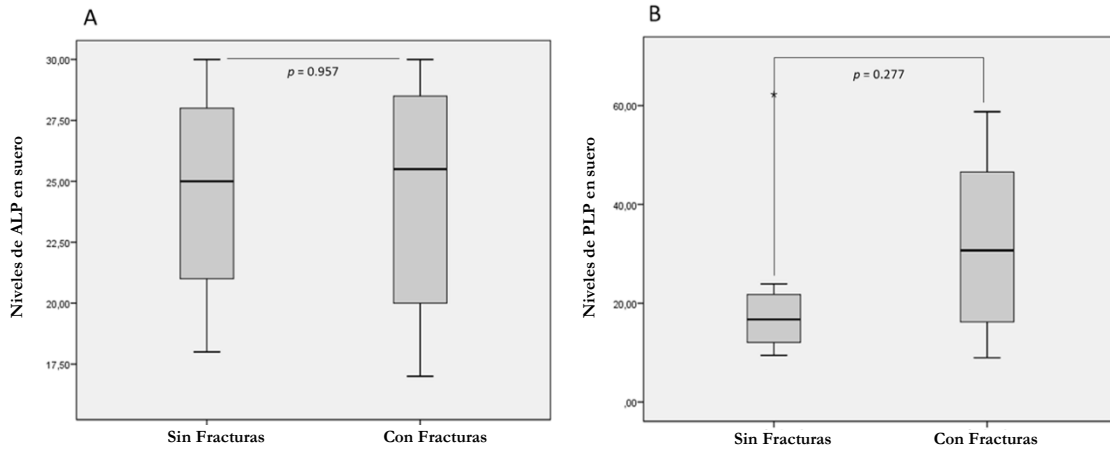


Figura 18. Niveles séricos de ALP y PLP en pacientes con presencia o ausencia de fracturas.

5.1.4. Filtrado de pacientes en la población pediátrica

En la población pediátrica, se excluyeron 2.003 de 2.507 sujetos seleccionados, por tener una sola evaluación de ALP realizada y se seleccionaron 504 sujetos que mostraban dos o más determinaciones de ALP con niveles por debajo de 150 U/L. Entre estos últimos, se excluyeron aquellos sujetos que presentaron alguna evaluación de ALP con niveles séricos por encima de los límites de referencia (472 sujetos). En este punto, clasificamos a la población pediátrica en dos grupos según la edad y los valores de referencia de ALP (de 0 a 12 años y de 13 a 19 años). Por lo tanto, se seleccionaron 7 sujetos con al menos una determinación por debajo del umbral de 100 U/L y 25 sujetos con al menos una determinación por debajo del umbral 50 U/L, respectivamente. Tras revisar las historias clínicas, 4 sujetos pertenecientes al primer grupo y 5 del segundo, fueron excluidos por tener causas secundarias de HPP [hipotiroidismo ($n = 3$), desnutrición ($n = 4$) y leucemia o tratamiento con quimioterapia ($n = 2$)]. Finalmente, solo 8 sujetos pertenecientes al grupo de 13 a 19 años (18 ± 1 años, 87,5% mujeres) aceptaron participar en el estudio (Figura 19). Ninguno de ellos tenía antecedentes familiares de HPP o raquitismo.

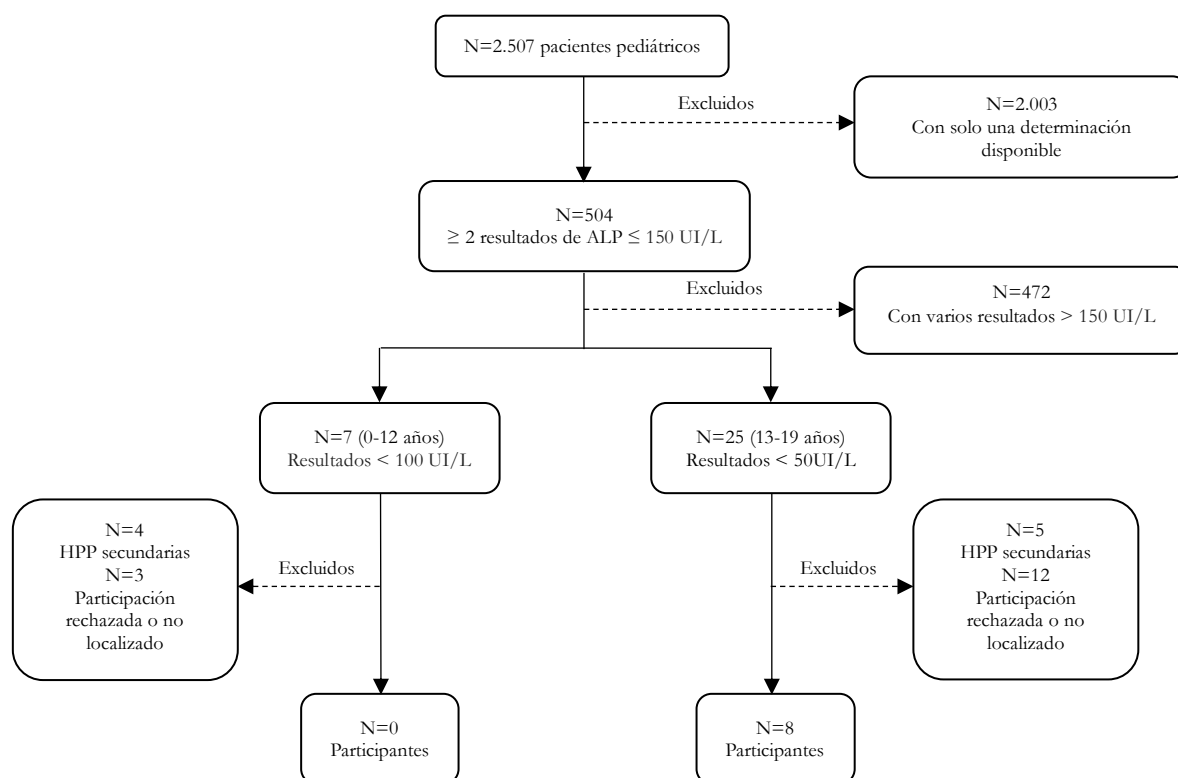


Figura 19. Diagrama de flujo del reclutamiento de pacientes potencialmente afectados por con HPP de la población pediátrica.

5.1.5. Resultados bioquímicos, genéticos y clínicos en población pediátrica

Uno de estos 8 sujetos tenía antecedentes de fracturas (fémur, tibia, peroné y radio) por politraumatismo. Solo uno de los 8 sujetos tenía un diagnóstico relacionado con HPP (artralgia), presentando la mayoría de ellos otras patologías no relacionadas con HPP (Tabla 7). A pesar de que 2 de los 8 sujetos presentaron niveles bajos de ALP y un nivel muy elevado de PLP en comparación con los valores de referencia, no se encontraron mutaciones en el gen *ALPL* para ninguno de ellos.

Tabla 7. Características clínicas, niveles de ALP, niveles de PLP y estudio genético en la población pediátrica. **Estudio Retrospectivo.**

Nº	Años	Sexo	Historia de fracturas	Condrocálcinosis	Anormalidades dentales	Diagnóstico principal	ALP (UI/L)	PLP (ng/mL)	Estudio genético
1	18	F	No	No	No	Pérdida de la audición	37	11.25	(-)
2	19	F	No	No	No	Esclerosis múltiple	50	9.72	(-)
3	19	F	No	No	No	Lupus	40	10.05	(-)
4	18	F	No	No	No	Migraña	49	32.68*	(-)
5	19	F	No	No	No	Artralgias	42	23.92*	(-)
6	19	M	4 (fémur, tibia, peroné, radio)	No	No	Politrauma	46	11.98	(-)
7	18	F	No	No	No	Asma	40	9.77	(-)
8	19	F	No	No	No	Infección Gastrointestinal	43	18.43	(-)

(-) denota un resultado negativo. *Niveles de PLP superiores a los valores de referencia.

5.1.6. Caracterización funcional de las dos nuevas variantes genéticas identificadas

La actividad ALP se determinó en células HEK293T transfectadas con plásmidos que contenían *ALPL* WT o con los correspondientes mutantes del gen *ALPL*. El mutante truncado (p.Trp186*) mostró una disminución drástica de la actividad ALP comparable tanto con las células no transfectadas como con las células transfectadas con el vector vacío (Figura 20). El segundo mutante (p.Ala443Thr) también mostró una reducción significativa en la actividad de ALP, aunque la actividad de ALP fue mayor que en el mutante truncado, lo que sugiere que la segunda mutación tiene un impacto menor en la estructura 3D de TNSALP.

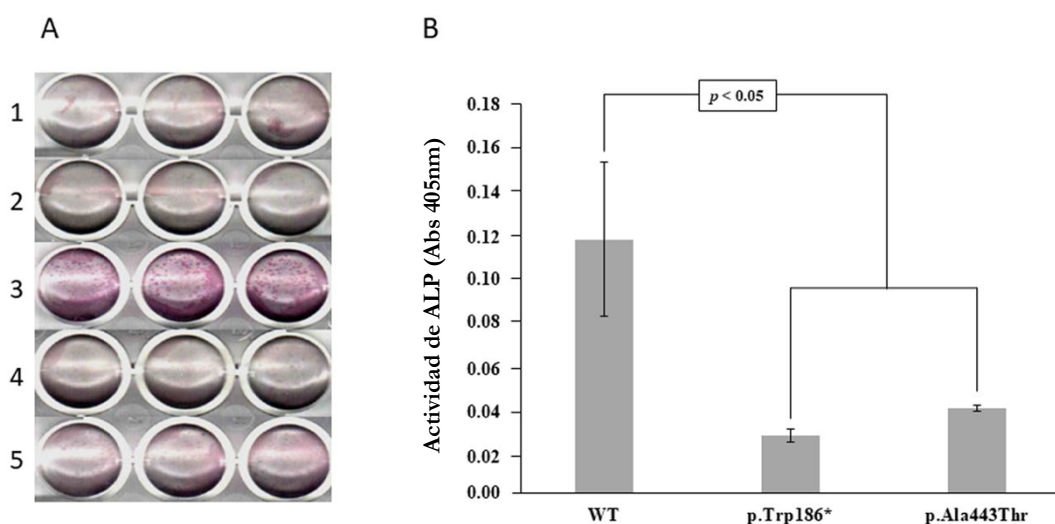


Figura 20. Determinación de actividad ALP en células HEK293T transfectadas y no transfectadas.

A) En el Panel A se muestran los resultados cualitativos de la actividad ALP en células HEK293T en las siguientes condiciones: células no transfectadas (línea 1), células transfectadas con pCDNA 3.1 (línea 2), células transfectadas con pCDNA 3.1: *ALPL* WT (línea 3), células transfectadas con pCDNA 3.1: *ALPL* c.558G>A mutante (p.Trp186*) (línea 4) y células transfectadas con pCDNA 3.1: *ALPL* c.1327G>A mutante (p.Ala443Thr) (línea 5). B) En el panel B se muestran los resultados cuantitativos del ensayo de ALP expresados como absorbancia a 405 nm. Los resultados se expresan como media y error estándar, derivados de tres experimentos independientes.

5.1.7. Expresión relativa de mRNA de las dos nuevas variantes genéticas identificadas

Para evaluar la eficiencia de la transfección y poder conocer la actividad real de cada variante, se realizaron ensayos de RT-qPCR a partir del RNA total extraído de los distintos cultivos de células HEK293T conteniendo las distintas construcciones. De esta forma, pudimos calcular la expresión transcripcional del gen *ALPL* y de sus correspondientes variantes genéticas, observándose que en los cultivos *ALPL*-WT, la expresión fue similar a la de los

cultivos transfectados con las distintas variantes. La expresión de *ALPL* en células transfectadas con el vector vacío fue menor que en el resto de construcciones, correspondiendo este nivel de expresión a la contribución endógena del gen *ALPL* en células HEK293T (Figura 21).

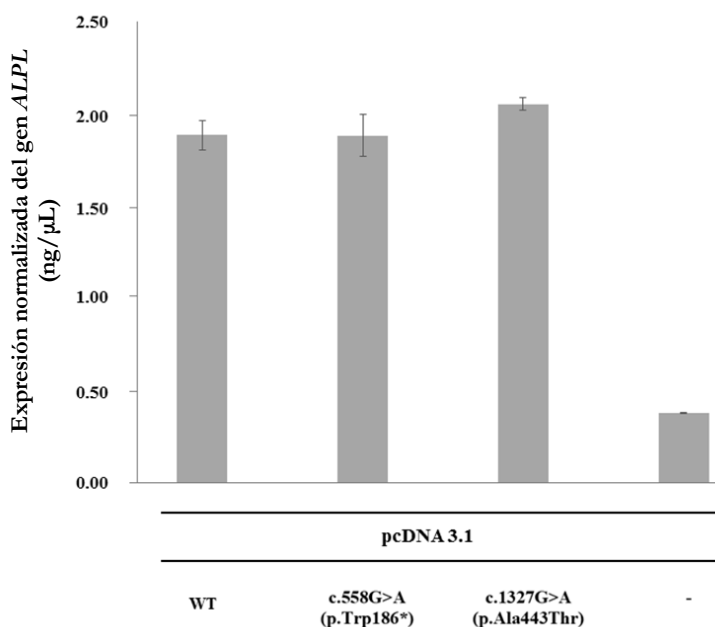


Figura 21. Expresión transcripcional normalizada de *ALPL* WT y de los nuevos mutantes usando RPL13 como *housekeeping*.

Los resultados se expresan como medias y error estándar derivados de tres experimentos independientes.

5.1.8. Efecto de las nuevas variantes genéticas a nivel estructural mediante modelaje tridimensional de la estructura TNSALP

Para predecir el efecto de las dos mutaciones identificadas en la estructura de TNSALP, se obtuvo un modelo 3D basado en la homología de secuencia entre TNSALP, que no tiene estructura cristalina resuelta, y la isoenzima placentaria que sí dispone de estructura resuelta. Aunque ambas secuencias de proteínas comparten sólo un 74% (35), la estructura de ambas moléculas está muy conservada (Figura 22). La primera nueva mutación identificada (c.558G>A;p.Trp186*) produce una proteína TNSALP truncada que conserva solo 1/3 de su secuencia, lo que afecta a la pérdida de la mayor parte de su estructura (Figura 22A,C). El análisis bioinformático de la segunda nueva mutación identificada (c.1327G>A;p.Ala443Thr) reveló que incluso manteniendo una estructura muy similar, la variante p.Ala443Thr mostró modificaciones relevantes en la polaridad general de la molécula completa, aumentando los grupos hidrofóbicos de superficie (Figura 22B, D) pudiendo esto afectar a su función.

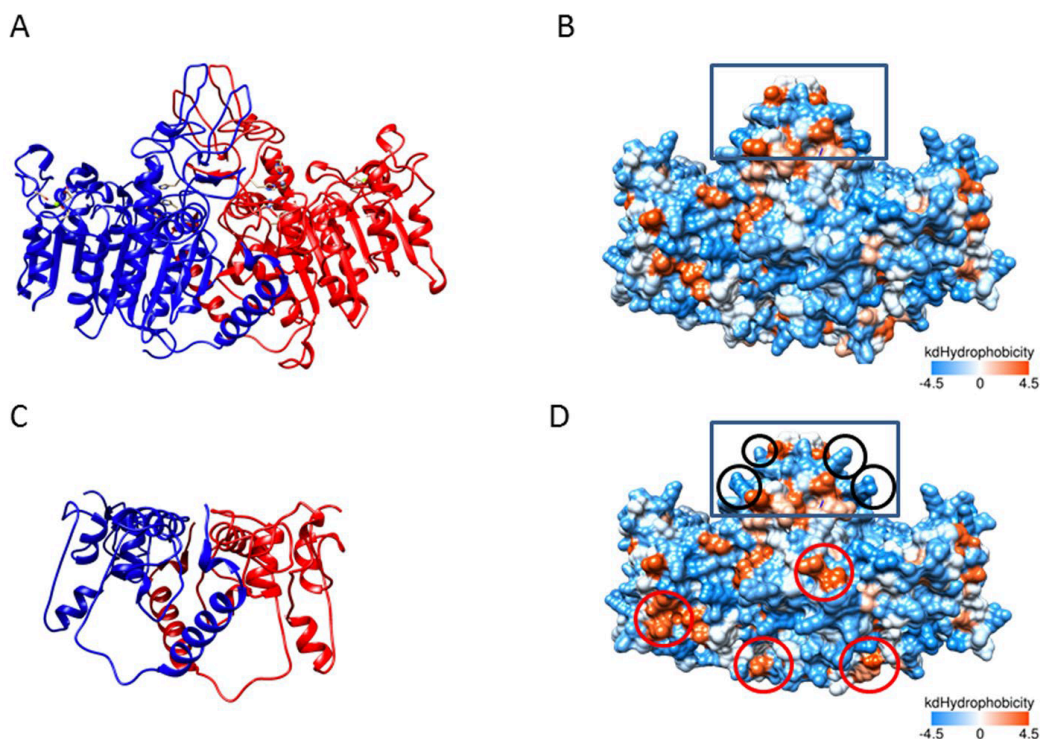


Figura 22. Modelado 3D de TNSALP WT y las correspondientes variantes identificadas en el estudio retrospectivo.

El modelado de la estructura se basa en la homología de secuencia entre TNSALP y la isoenzima placentaria (ID de PDB: 1E2W). Los paneles A y C muestran la estructura 3D de TNSALP WT y del mutante truncado respectivamente, en una representación de cinta. Los dos monómeros de la proteína están coloreados en rojo y azul. Los paneles B y D muestran la estructura 3D de TNSALP WT y el segundo mutante (p.Ala443Thr) respectivamente, usando una representación basada en la hidrofobicidad de los residuos. El color de la superficie molecular por hidrofobicidad de aminoácidos se ha utilizado de la siguiente manera: de azul oscuro para los residuos más hidrófilos, pasando a blanco, anaranjado y rojo para los residuos más hidrófobos. Los cambios más hidrófilos introducidos en el mutante respecto al WT se delimitan con círculos negros y los cambios más hidrófobos, con círculos rojos. El dominio corona se delimita con un rectángulo.

5.2. Estudio prospectivo

5.2.1. *Filtrado de pacientes*

Tras revisar los resultados de las determinaciones de ALP de forma prospectiva desde del mes de junio 2018 a mayo 2019 a un total de 64.013 sujetos (62.412 sujetos correspondientes a población adulta y 2.507 sujetos correspondientes a población pediátrica) se les realizó determinación de ALP. Se seleccionaron un total de 765 sujetos que presentaron niveles disminuidos de ALP. De estos, 522 sujetos fueron descartados por presentar una sola determinación de ALP. De los 243 sujetos resultantes (204 correspondientes a población adulta y 39 a población pediátrica), 128 fueron descartados por presentar dos o más determinaciones de ALP en rango o superior a los valores de referencia. Tras estudiar las

historias clínicas de los 115 pacientes restantes, se descartaron 54 sujetos por posibles causas de HPP secundaria. De los 61 sujetos con sospecha de HPP solo 24 pacientes participaron en el estudio. A estos 24 pacientes se les determinaron los niveles de PLP. De ellos, 17 adultos y 3 niños presentaron actividad de ALP disminuida de manera persistente y niveles de PLP aumentados en comparación con los valores de referencia. A los 20 pacientes se les realizó una secuenciación del gen *ALPL*.

5.2.2. Resultados genéticos

De los 17 pacientes adultos, 11 de ellos presentaron mutaciones en el gen *ALPL*, siendo diagnosticados con HPP, mientras que otros 3 de ellos presentaron variantes de significado incierto, no siendo portadores de ninguna variante claramente patogénica. De los 3 pacientes de población pediátrica, 2 de ellos presentaron mutaciones no descritas anteriormente en el gen *ALPL*: El paciente 2 (Tabla 9) presentó la variante c.17T>C; p.(Leu6Ser) en el exón 2 en heterocigosis. Mientras que el paciente 3 (Tabla 9) presentó la variante c.498_500delCAC; p.(Thr167del) en el exón 6 en heterocigosis.

Además, en tres de los pacientes adultos identificamos variantes de significado incierto: El paciente 1 (Tabla 8) presentó la variante c.875C>T; p.(Pro292Leu) en el exón 9 en heterocigosis. El paciente 15 (Tabla 8) presentó la variante c.69_74del; p.Glu23_Lys24del en el exón 3 en heterocigosis, mientras que el paciente 21 (Tabla 8) presentó la variante (c.1135C>A;p.His379Asn) en el exón 10 en heterocigosis.

El resto de pacientes presentaron mutaciones previamente descritas, que se detallan a continuación: El paciente 4 (Tabla 8) presentó la variante c.382G>A que codifica para el cambio de aminoácido p.(Val128Met) en el exón 5 en heterocigosis. El paciente 10 (Tabla 8) presentó la variante c.1327G>A; p.(Ala443Thr) en el exón 12 en heterocigosis. El paciente 11 (Tabla 8) presentó la variante c.1366G>A; p.(Gly456Arg) en el exón 12 en heterocigosis. El paciente 16 (Tabla 8) presentó la variante c.558G>A; p.(Trp186*) en el exón 6 en heterocigosis. El paciente 18 (Tabla 8) presentó la variante c.407G>A; p.(Arg136His) en el exón 5 en heterocigosis. El paciente 19 (Tabla 8) presentó la variante c.334G>C; p.(Gly112Arg) en el exón 5 en heterocigosis. El paciente 20 (Tabla 8) presentó la variante c.1328C>T; p.(Ala443Val) en el exón 12 en heterocigosis. Dos pacientes (paciente 13 y 14 (Tabla 8)) presentaron la misma mutación c.473-2A>G en el intrón 5 en heterocigosis, mientras que otros dos (paciente 6 y 17 (Tabla 8)) presentaron la mutación c.571G>A; p.(Glu191Lys) en el exón 6 en heterocigosis.

5.2.3. *Características bioquímicas y clínicas*

La mayoría de los pacientes presentaron síntomas articulares u osteocondritis a excepción de tres de ellos que no presentaron sintomatología relacionada con HPP (4 y 8 (Tabla 8) y paciente 3 (Tabla 9)). Ninguno de ellos tenía antecedentes familiares de HPP o raquitismo en la infancia. Además, no observamos ningún paciente con síntomas de condrocalcinosis. Solo dos de los pacientes (mujeres ambas) presentaron historia de fracturas, una de ellas con fractura del troquíter del hombro izquierdo (paciente 14 (Tabla 8)) y la otra con fractura del escafoides carpo izquierdo (paciente 18 (Tabla 8)). Esta última paciente además había sufrido recientemente varias pérdidas dentales con raíz completa.

Tabla 8. Características clínicas, niveles de ALP, niveles de PLP y estudio genético en población adulta. **Estudio Prospectivo**

Nº	Años	Sexo	Historia de fracturas	Condrocalcinosis	Anormalidades dentales	Diagnóstico principal	ALP (UI/L)	PLP (ng/mL)	Estudio genético
1	62	M	No	No	No	Gonalgia, meniscopatia, hipertrofia benigna de próstata	16	* 119	c.875C>T; p.(Pro292Leu)**
2	60	M	No	No	No	Acromegalia, hipertrofia benigna de próstata, lumbartrosis, tendinitis calcificante de hombro	25	* 61	(-)
3	61	M	No	SI	No	Hemocromatosis, artrosis femoropatelar de rodilla derecha	32	* 50	(-)
4	32	M	No	No	No	Estenosis de válvula pulmonar	24	* 145	c.382G>A; p.(Val128Met)
5	69	M	No	No	No	Osteoporosis, artrosis primaria, poliartralgia, artritis reumatoide, espolón	35	11,15	No procede
6	50	M	No	No	No	Cifosis de Scheuermann, litiasis renal, encondroma fémur, artralgias inespecíficas, bursitis del 1º metatarso, osteoporosis	35	* 20,3	c.571G>A; p.(Glu191Lys)
7	24	M	SI	No	No	Fractura clavícula y amputación fémur. Accidente de coche	26	14,6	No procede
8	64	M	No	No	No	Estenosis hepática, insuficiencia renal crónica	20	9,13	No procede
9	53	M	No	No	No	Osteopenia, dermatomiositis, hemocromatosis	34	* 19,1	(-)
10	33	M	No	No	No	Espondiloartritis psoriásica, gonalgia izquierda, lumbalgia, escoliosis, púrpura trombocitopénica inmune, dolor de hombro y pie izquierdo	27	* 120	c.1327G>A; p.(Ala443Thr)
11	64	M	No	No	No	Cardioversión, cardiopatía, diabetes mellitus tipo 2	27	* 122	c.1366G>A; p.(Gly456Arg)
12	56	M	No	No	No	Lumbartrosis, artrosis acromioclavicular bilateral, coxartrosis, artralgia clavícula, manos glúteas, Policitemia vera, psoriasis	28	11,62	No procede
13	46	F	No	No	No	Lupus, dolor articular, Metatarsalgia distal	21	* 33,2	c.473-2A>G
14	63	F	Si (Troquíter hombro izquierdo)	No	No	Poliartritis, osteocondritis, raquialgia, gonartrosis fase 1	21	* 28,6	c.473-2A>G
15	27	F	No	No	No	Dolor de rodilla y lumbar, Bocio tiroiditis autoinmune	23	* 34	c.69_74del; p.(Glu23_Lys24del)**
16	41	F	No	No	No	Lumbartrosis síndrome facetario, gonartrosis grado I, poliartralgia, tendinopatía del supraespinoso	30	* 43	c.558G>A; p.(Trp186*)
17	61	F	No	No	No	Osteoporosis, espondiloartritis dorso-lumbar con osteofitosis, aplastamiento de L1	15	* 160	c.571G>A; p.(Glu191Lys)
18	40	F	Si (Escafoides carpo izquierdo)	No	Si (caída dental con raíz completa)	Poliartralgia, escoliosis dorsal, pierna izquierda hinchada, osteocondritis esternocostal	30	* 59	c.407G>A; p.(Arg136His)
19	29	F	No	No	No	Gonalgia, gonartrosis, osteocondritis, síndrome de Scheuermann, poliartritis, artritis idiopática juvenil (inicio a los 3 años),	13	* 225	c.334G>C; p.(Gly112Arg)
20	66	F	No	No	No	Listesis lumbar, déficit de vitamina D, pies cavos, dorsalgia, raquialgia, discartrosis L5	28	* 175	c.1328C>T; p.(Ala443Val)
21	45	F	No	No	No	Parestesia en cara y miembros superiores. Dolor en codos, cadera y miembros inferiores. Fatiga.	10	*462	c.1135C>A; p.(His379Asn)**

*Niveles de PLP superiores a los valores de referencia. **Variante de Significado Incierto. (-) denota un resultado negativo.

Tabla 9. Características clínicas, niveles de ALP, niveles de PLP y estudio genético en población pediátrica. **Estudio Prospectivo**

Nº	Años	Sexo	Historia de fracturas	Condrocalcinosis	Anormalidades dentales	Diagnóstico principal	ALP (UI/L)	PLP (ng/mL)	Estudio genético
1	6	M	No	No	No	Enfermedad de Duchenne	104	* 29	(-)
2	15	M	No	No	No	Pies valgos	73	* 118	c.17T>C; p.(Leu6Ser)
3	15	M	No	No	No	Enfermedad de Crohn	45	* 45,5	c.498_500delCAC; p.(Thr167del)

*Niveles de PLP superiores a los valores de referencia. **Variante de Significado Incierto. (-) denota un resultado negativo.

5.2.4. Caracterización funcional de las tres variantes de significado incierto en modelo celular in vitro

La actividad ALP se determinó en células HEK293T transfectadas con plásmidos que contenían *ALPL* WT o con los correspondientes mutantes del gen *ALPL*. El mutante truncado (p.Glu23_Lys24del) mostró una disminución de la actividad ALP al compararlo tanto con las células transfectadas con WT como con las células con transfectadas con pcDNA 3.1 vacío (Figura 23). El segundo mutante (p.Pro292Leu) también mostró una reducción significativa en la actividad de ALP mayor que el primer mutante. Y por último, el tercer mutante (p.His379Asn) fue el que mostró una actividad de ALP drásticamente disminuida en comparación con el resto de mutantes y con las células transfectadas con WT, incluso por debajo de la actividad enzimática de las células transfectadas con pcDNA 3.1 vacío, lo que sugiere que esta última variante es altamente patogénica.

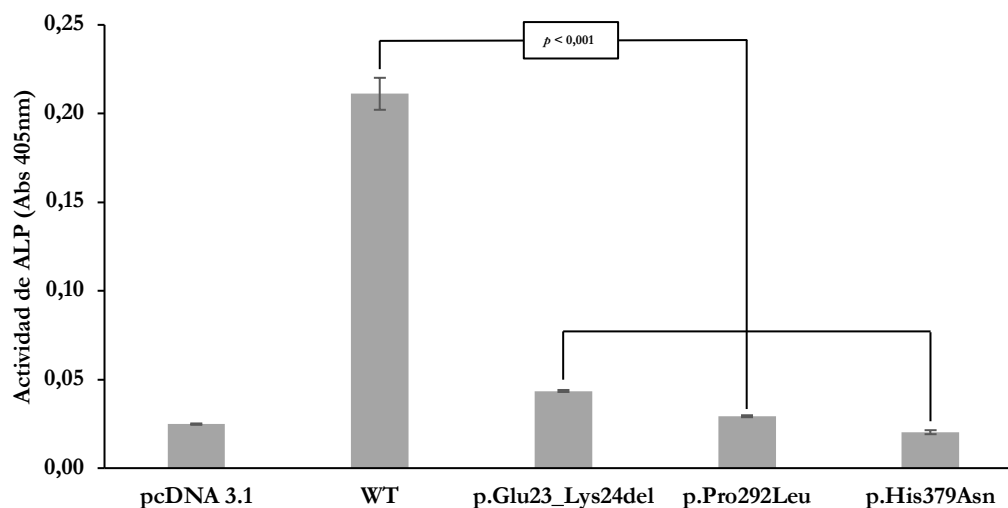


Figura 23. Determinación de actividad ALP en células HEK293T transfectadas y no transfectadas.

Se muestran los resultados cuantitativos del ensayo de ALP expresados como absorbancia a 405nm. Los resultados se expresan como media y error estándar, derivados de tres experimentos independientes.

5.2.5. Expresión relativa de mRNA de variantes de significado incierto

Poder conocer la actividad real de cada variante, se realizaron ensayos de RT-qPCR a partir del RNA total extraído de los distintos cultivos de células HEK293T transfectados con los distintos plásmidos correspondientes. De cada uno de los cultivos, se realizó el cálculo la expresión transcripcional del gen *ALPL* y de sus correspondientes variantes genéticas, observándose que la expresión en los cultivos *ALPL*-WT fue similar a la de los cultivos transfectados con las distintas variantes. La expresión de *ALPL* en células con el vector pcDNA 3.1 vacío fue menor que en el resto de construcciones, correspondiendo este nivel de expresión a la contribución endógena del gen *ALPL* en células HEK293T (Figura 24).

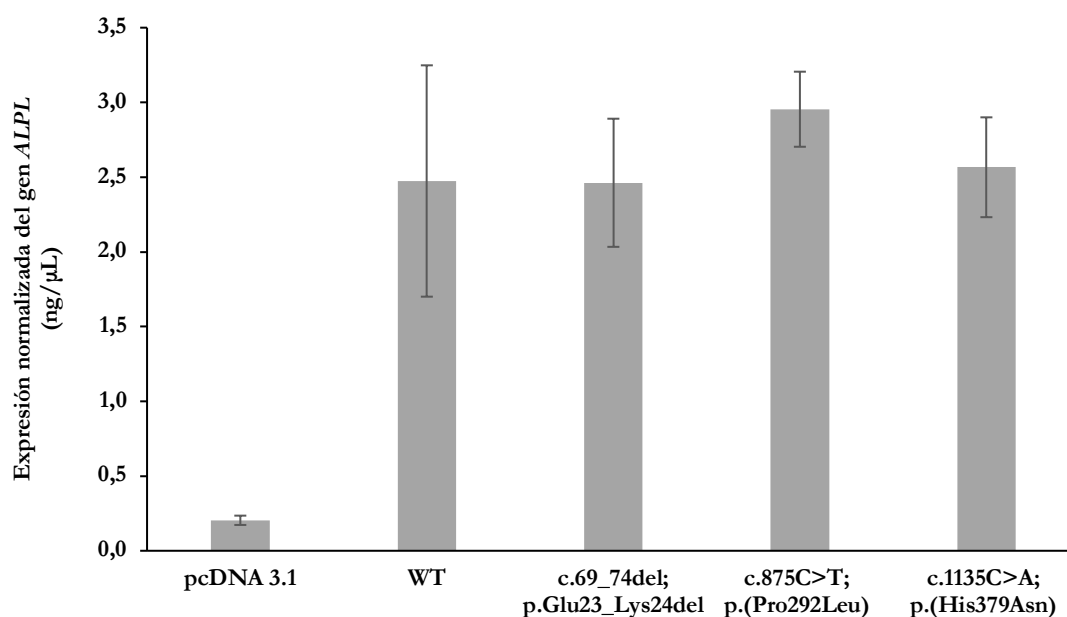


Figura 24. Expresión transcripcional normalizada de *ALPL* WT y de los nuevos mutantes usando RPL13 como *housekeeping*.

Los resultados se expresan como medias y error estándar derivados de tres experimentos independientes.

5.2.6. Efecto de las mutaciones de significado incierto mediante modelaje tridimensional de la estructura de TNSALP

Para el estudio del efecto de las mutaciones de significado incierto mediante modelaje tridimensional, se construyó un modelo basado en la homología de secuencia entre la TNSALP y la isoforma placentaria (Figura 25A). Analizando virtualmente la estructura molecular de las variantes genéticas objeto de estudio, se observa que la variante p.Glu23_Lys24del únicamente presenta cambios significativos en el extremo de la hélice α anexa al extremo N-terminal, lugar donde se produce la delección y en donde se puede observar un acortamiento en la estructura proteica (Figura 25B). Por otra parte, la variante

p.Pro292Leu afecta a dos de las cadenas β que conforman la lámina β , la cual actúa como dominio estructural y parte íntegra del dominio de unión al calcio. Esta variante provoca el alargamiento de estas cadenas y reduce la extensión de los loops existentes entre ambas (Figura 25C). Por último, la variante p.His379Asn afecta a nivel de uno de los dos sitios de unión a Zn^{2+} de cada uno de los monómeros de la proteína. A pesar de que no cause ningún impacto a nivel estructural, reduce a la mitad los átomos de Zn^{2+} que la metaloenzima puede reclutar para llevar a cabo su función catalítica (Figura 25D).

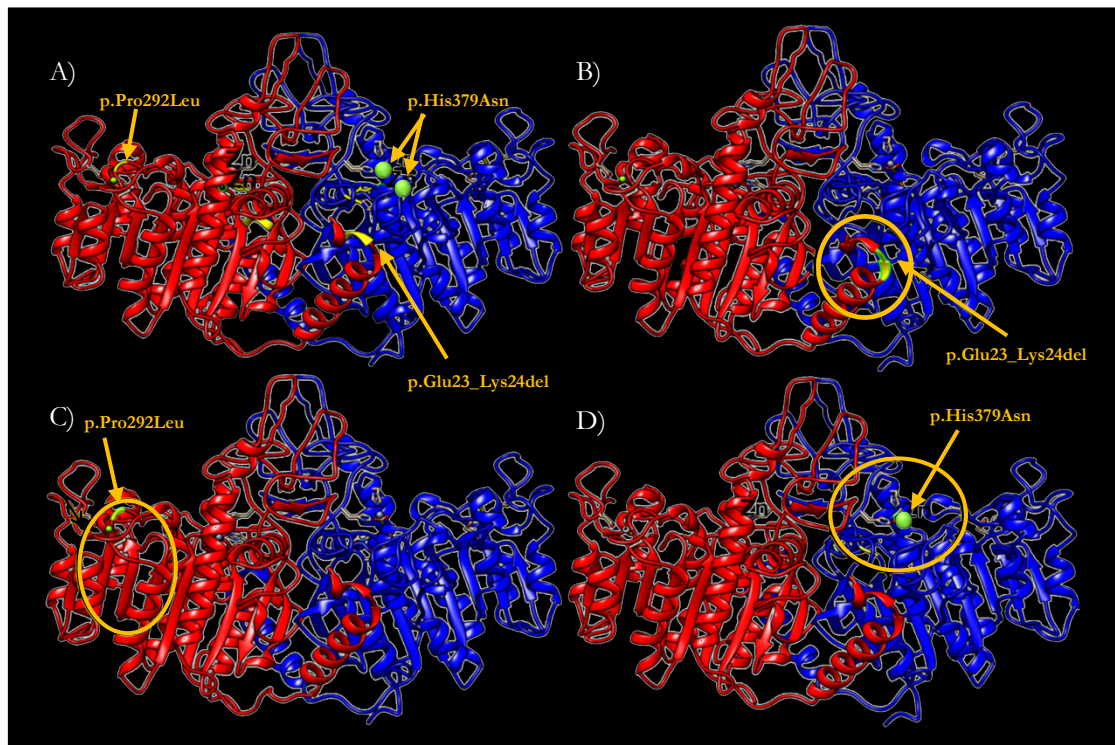


Figura 25. Representación tridimensional de la proteína TNSALP en forma de cintas.

A) TNSALP WT. Se marcan en amarillo los aminoácidos modificados por las variantes genéticas, así como se remarcan en verde los átomos de Zn^{2+} que actúan como cofactores. B) TNSALP con cambio aminoacídico p.Glu23_Lys24del. Se marca en naranja la delección y se resalta con un círculo naranja los mayores cambios estructurales. C) TNSALP con el cambio aminoacídico p.Pro292Leu. Se marca en naranja la sustitución aminoacídica y se resalta con un círculo naranja los mayores cambios estructurales. D) TNSALP con cambio aminoacídico p.His379Asn. Se marca en naranja el cambio aminoacídico y se resalta con un círculo naranja los mayores cambios estructurales.

Por otro lado, se realizó un estudio sobre los cambios de polaridad que presenta la proteína en respuesta a estas variaciones genéticas (Figura 26). En este sentido, se puede observar que la variante p.Glu23_Lys24del, presenta importantes cambios en la polaridad y el plegamiento de la proteína en torno a la región mutada, exponiendo dos residuos altamente hidrofóbicos al exterior y cambiando la conformación que adquiere la hélice α en la que se encuentran a nivel espacial (Figura 26B). También se puede observar un pequeño cambio en la región inferior de los dominios de la interfaz, retrayendo uno de los característicos racimos de residuos hidrofílicos presentes en la TNSALP WT, aunque cabe destacar, que este cambio está presente en las 3 variantes genéticas. Por otra parte, los cambios causados por la variante p.Pro292Leu se encuentran deslocalizados de las inmediaciones de la interfaz del homodímero, causando una mayor oquedad en la región marcada en la Figura 26C. Finalmente, los cambios en la polaridad causados por la variante p.His379Asn (Figura 26), fueron mínimos, provocando la compactación de algunos residuos hidrofóbicos expuestos en la proteína TNSALP WT.

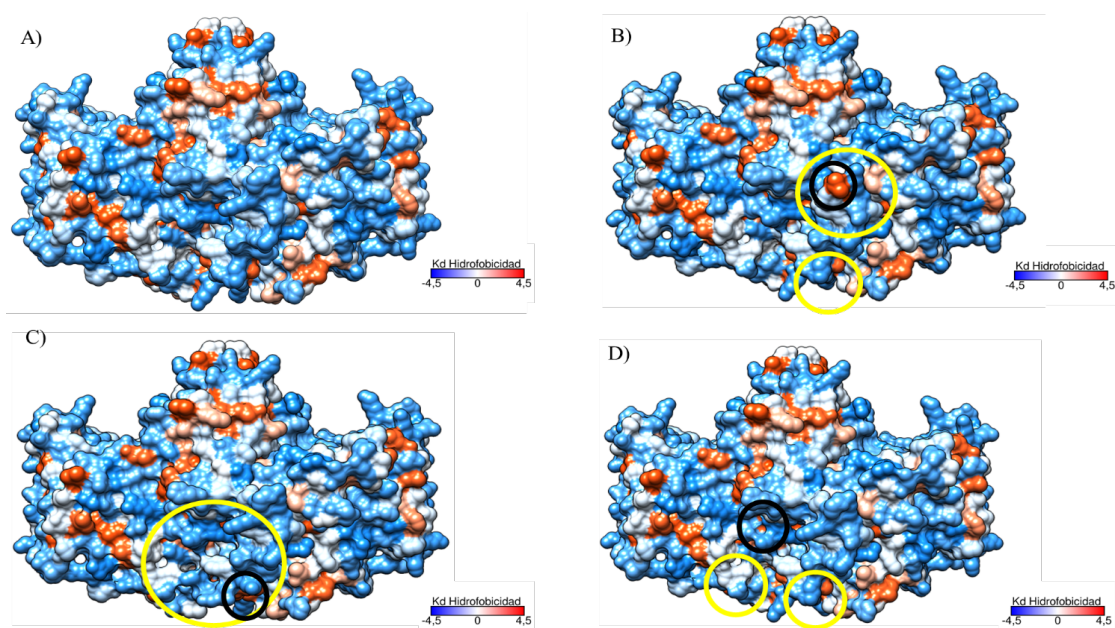


Figura 26. Representación tridimensional de la proteína TNSALP en función de su hidrofobicidad.

Se representa la hidrofobicidad en escala Kd de hidrofobicidad, con valores acorde a la escala de hidrofobicidad de Kyte y Doolittle, desde los aminoácidos más hidrófilos en azul claro, hasta los más hidrófobos en rojo anaranjado. Se marca en círculos amarillos los cambios a aminoácidos más hidrófilos y en círculos negros los cambios a aminoácidos más hidrófobos, de las diferentes variantes respecto a la TNSALP WT. A) TNSALP WT B) Variante genética p.Glu23_Lys24del. C) Variante genética p.Pro292Leu. D) Variante genética p.His379Asn.

6. DISCUSIÓN

6.1. Estudio retrospectivo

Observamos que el 0,12% de los sujetos con determinaciones de los niveles de ALP durante el año 2016 en el Hospital Universitario Clínico San Cecilio de Granada presentaron niveles séricos de ALP persistentemente bajos. Sin embargo, no todos estos sujetos estaban afectados por HPP.

En nuestro estudio encontramos 7 de 16 pacientes adultos con una mutación en el gen *ALPL*. En concordancia con la proporción reportada por el estudio de McKiernan (156), encontramos que 5 sujetos (4 mujeres y 1 hombre) presentaron todas las características clínicas y bioquímicas de la HPP (nivel bajo de ALP sérico total, niveles altos de PLP y antecedentes de fracturas prevalentes) (pacientes 1, 2, 5, 9 y 15, Tabla 6). Además, identificamos dos mujeres con mutación en el gen *ALPL*, nivel bajo de ALP sérico y niveles altos de PLP, pero sin antecedentes de fracturas prevalentes (pacientes 13 y 14, Tabla 6). Sin embargo, ambas pacientes mostraron anomalías dentales, y una de ellas antecedentes de condrocalcinosis siendo esta sintomatología compatible con HPP de adultos u odontohipofosfatasa (128).

Por otro lado, dos pacientes (ambas mujeres) presentaron niveles de ALP y PLP en suero compatibles con el diagnóstico de HPP, aunque no se detectó ninguna mutación en el gen *ALPL* en el análisis de secuenciación llevado a cabo en nuestro estudio. A pesar de no presentar mutaciones en dicho gen, sugerimos que ambas pacientes podrían estar afectadas con HPP, ya que tanto las manifestaciones bioquímicas como clínicas se asociaron con síntomas comunes relacionados con la HPP (pacientes 11 y 12, Tabla 6). Esta inconsistencia podría explicarse por factores adicionales que pueden influir en la expresión clínica de HPP. En este sentido, podrían existir mutaciones en regiones no codificantes del gen, como las regiones promotoras o intergénicas del gen *ALPL*, que no son detectadas por la secuenciación Sanger utilizada en nuestro estudio. Existen otros estudios en concordancia con esta hipótesis, que explican la ausencia de mutaciones en este gen en pacientes con clínica y bioquímica compatible con HPP (140).

Además, la regulación de los niveles extracelulares de PPi, responsable de algunos síntomas de HPP, es compleja e involucra a varios genes además del gen *ALPL* (139).

Por otra parte, el gen *RUNX2* que codifica para el factor de transcripción RUNX2 de osteoblastos, específico de hueso/cartílago, está involucrado en el proceso de regulación de la mineralización ósea, participando en la regulación de la actividad de TNSALP (131). La mutación en este gen está relacionada con el desarrollo de displasia cleidocraneal (OMIM 119600). Esta patología se caracteriza por macrocefalia con suturas persistentemente

abiertas, clavículas ausentes o hipoplásicas, anomalías dentales y osificación retardada de los huesos púbicos. Los pacientes afectados por este trastorno, presentan fenotipos que pueden solaparse con los de HPP con características radiográficas y bioquímicas similares. Esta podría ser otra explicación a la ausencia de mutaciones en el gen *ALPL* en pacientes con bioquímica y clínica compatible con HPP.

Los pacientes 9 y 13 (Tabla 6) presentaron una nueva mutación en el gen *ALPL* no descrita anteriormente (c.558G>A;p.Trp186*). Dicha mutación conduce a un cambio aminoacídico generando una versión más corta de la proteína TNSALP, que conserva sólo un tercio de la secuencia original, al introducir un codón de parada en la posición 186. Se realizó la caracterización funcional de la TNSALP con la mutación descrita anteriormente observándose una drástica disminución de la actividad de ALP (Figura 20). Esta mutación da lugar a la pérdida de algunos determinantes estructurales importantes, como es el sitio activo en la posición 110, algunos sitios de unión a metales y así como la cisteína 139 implicada en la formación del enlace disulfuro (Figura 22A,C). Algunos estudios estructurales confirman que el catión que se uniría al sitio de unión al metal es un ion Ca^{2+} , que podría jugar un papel crítico en la función TNSALP (26). Las mutaciones que afectan a estos determinantes estructurales podrían explicar la drástica pérdida de actividad de esta proteína. Sin embargo, el fenotipo clínico asociado a la mutación c.558G>A; p.Trp186* no es específico, ya que uno de estos pacientes (paciente 9) presentó fracturas en varias localizaciones y mientras que el segundo paciente (paciente 13) presentó anomalías dentales. Esta dificultad para vincular genotipo con fenotipo puede explicarse por la influencia de otros factores genéticos, epigenéticos o no genéticos en este trastorno (206). La sintomatología asociada a esta mutación genética es compatible con HPP del adulto.

Los pacientes 14 y 15 (Tabla 6) también mostraron una nueva mutación en el gen *ALPL* no descrita anteriormente. Esta mutación implica un reemplazo aminoacídico en la posición 443 de la proteína (c.1327G>A; p.Ala443Thr). Los resultados de la mutagénesis realizada para validar el fenotipo asociado a esta variante, mostraron una fuerte reducción de la actividad ALP (Figura 20). El aminoácido reemplazado se encuentra en la posición 443, junto al dominio corona de la enzima (26) (Figura 22B, D). Esta región es la responsable de la unión de la enzima con el colágeno, que ha sido identificado como una molécula importante para la función tanto en la definición de la conformación como en la estabilidad de la proteína TNSALP (207). Además, el dominio corona parece estar también involucrado en la interacción monómero-monómero (26). Atendiendo a la hidrofobicidad general de la proteína, esta mutación implica la aparición de varios grupos hidrófobos en la superficie del dímero (Figura 22B, D) que podrían afectar tanto a la dimerización de la enzima y como a la

interacción con el colágeno de la matriz extracelular. Ambos procesos son esenciales para la función de TNSALP y podrían explicar la drástica disminución de la actividad ALP encontrada en los ensayos *in vitro*. Sorprendentemente, aunque a esta mutación afectó significativamente a la hidrofobicidad general de la proteína, las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria no sufrieron modificaciones relevantes (Figura 22B, D).

A pesar de que esta mutación no había sido descrita previamente, otros grupos han reportado dos mutaciones diferentes en la misma posición (p.Ala-443Val (96) y p.Ala443Glu (208)), mostrando los pacientes afectados una sintomatología relacionadas con HPP del adulto. Las mutaciones localizadas en el dominio corona se han relacionado con HPP severa o moderada según la ubicación y el genotipo homocigoto o heterocigoto, reforzando el importante papel de este dominio en la actividad ALP (26).

En nuestro estudio, las características clínicas que presentaron los pacientes afectados con esta mutación parecen estar asociadas a una baja densidad mineral ósea con diagnóstico de osteoporosis. Ambas mutaciones no descritas se presentan en nuestros pacientes con una herencia dominante en heterocigosis con una sintomatología leve, que podría explicarse mediante el DNE.

Las dos nuevas mutaciones genéticas encontradas en nuestro estudio han sido anotadas en la base de datos de mutaciones génicas de fosfatasa alcalina no específica de tejido con fecha 27 de octubre de 2018 (209).

Con respecto al resto de pacientes afectados con mutaciones previamente descritas, podemos comentar que los pacientes 1, 3 y 5 (Tabla 6) presentaron mutaciones en el gen *ALPL* relacionadas con HPP del adulto, ya que los tres refirieron antecedentes de fracturas en varias localizaciones (Tabla 6). En estudios previos, la mutación encontrada en el paciente 3, que conduce a un reemplazo de aminoacídico en la posición 456, se asoció con HPP del adulto e infantil con síntomas leves en dos pacientes de la misma familia (161). Al igual que en el paciente 3 de nuestro estudio, el paciente adulto del estudio al que se hace referencia también había sufrido fracturas. Sin embargo, a diferencia del paciente de nuestro estudio, las dos pacientes habían sufrido pérdida prematura de alguno de sus dientes, por lo que es difícil correlacionar el genotipo con el fenotipo en este caso.

Asimismo, la mutación encontrada en el paciente 1 (Tabla 6) fue asociada con odonto-HPP por Taillander et al. (210), sin embargo nuestro paciente 1 (Tabla 6) presentaron fracturas del metatarso sin anormalidades dentales, siendo de nuevo difícil establecer una asociación geno-fenotípica. En el paciente 5 (Tabla 6) se encontró una mutación en una región intergénica que afecta el procesamiento del mRNA. Esta mutación se asoció con una forma de HPP asintomática y con una forma de HPP muy leve en otros estudios (204). En

coherencia con esta observación, encontramos que el paciente afectado presentó únicamente dos fracturas (en metatarso y tobillo), sin otros síntomas adicionales relacionados con HPP. Basándonos en estos resultados, todas las mutaciones genéticas encontradas en los sujetos de nuestro estudio parecen estar relacionadas con HPP adulta con sintomatología leve.

Las herramientas bioinformáticas de predicción patogénica sugieren que todas las mutaciones encontradas en nuestro estudio, incluidas las dos nuevas variantes genéticas identificadas, son patogénicas según los criterios de clasificación del *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG). Según la clasificación de la base de datos Varsome (<https://varsome.com>), la primera mutación no descrita (c.558G> A; p.Trp186 *) encontrada en los pacientes 9 y 13 (Tabla 6), es clasificada como patogénica (clase 5), mientras que la segunda mutación no descrita (c.1327G> A; p. Ala443Thr) que se encuentra en los pacientes 14 y 15 (Tabla 6), se clasifica como probablemente patogénica (clase 4).

En cuanto a la población pediátrica, a pesar de encontrar a 8 niños con niveles de ALP persistentemente disminuidos, no encontramos ningún paciente con mutación en el gen *ALPL*. Además, ninguno de los 8 niños evaluados presentó condrocalcinosis o anomalías dentales. Solo uno de ellos presentó antecedentes de fracturas recurrentes en varias localizaciones (paciente 6, Tabla 7), aunque tampoco presentó niveles de PLP superiores a los valores de referencia. Sin embargo, dos niñas (pacientes 4 y 5, Tabla 7) manifestaban niveles de ALP y PLP compatibles con signos bioquímicos de HPP. A pesar de que no se encontraron antecedentes de fracturas prevalentes ni anomalías dentales en ninguna de estas dos pacientes, se deben considerar los niveles anormales de ALP o PLP para estudios adicionales con el fin de evaluar la presencia de HPP probablemente asintomática o moderada en ausencia de mutaciones genéticas, como se argumentó anteriormente, o causada por mutaciones en regiones del gen no analizadas en nuestro estudio, como regiones promotoras o regiones intrónicas del gen *ALPL*.

De manera similar a otros estudios (155,156), encontramos una mayor proporción de mujeres (n=6,86% aproximadamente) que de hombres (n=1,14% aproximadamente) diagnosticadas con HPP (con prueba genética positiva) en nuestra cohorte final de adultos. Sin embargo, no podemos afirmar que la HPP sea más prevalente en mujeres que en hombres en nuestra población de estudio, ya que en nuestra cohorte inicial de adultos con niveles séricos bajos persistentes de ALP, no se encontraron diferencias de sexo significativas (54% mujeres, 46% hombres). De esta cohorte inicial, la mayoría de los sujetos con niveles bajos de ALP que rehusaron participar en nuestro estudio o que no estaban disponibles, fueron hombres, lo que llevó a una cohorte final con una mayor proporción de mujeres que de hombres (81% de mujeres frente a 19% de hombres aproximadamente, n=16), lo que supone

un sesgo a la hora de interpretar la prevalencia de HPP en función del sexo. La mayor prevalencia de mujeres entre los sujetos afectados por HPP encontrada en el presente estudio y en otros estudios podría explicarse porque los trastornos relacionados con el metabolismo óseo se dan con mayor frecuencia en la población femenina (como la osteoporosis posmenopáusicas), que pueden estar diagnosticadas de forma incorrecta, detectando finalmente una afección por HPP siguiendo el protocolo diagnóstico sugerido en este trabajo. Por otra parte, las mujeres tienen una mayor conciencia sobre la salud ósea que los hombres, lo que conduce a una mayor participación de mujeres que de hombres en este tipo de estudios.

Siguiendo el protocolo descrito en el estudio retrospectivo, encontramos 7 pacientes adultos afectados por HPP (con estudio genético positiva), sin diagnóstico previo de dicho trastorno, de los 16 sujetos estudiados. Estos datos indican que casi la mitad de la población estudiada (~44%) no estaba correctamente diagnosticada en la práctica clínica habitual. Si extrapolamos estos datos a la población actual de España, esto podría significar la existencia de 4.000 casos potenciales de HPP actualmente no diagnosticados. Teniendo en cuenta la proporción de pacientes potenciales de HPP que no participaron en este estudio por diferentes causas (71%), y según nuestros resultados, la estimación actual de casos potenciales de HPP no diagnosticados en España podría llegar hasta los 15.000 casos. Por lo tanto, la prevalencia estimada de HPP leve en nuestro estudio podría duplicar las estimaciones previamente reportada en el estudio de Mornet, *et al* (1/3.100 vs 1/6.370) (16). Sin embargo, aunque en el estudio anterior Mornet, *et al.* estimaron que la prevalencia de HPP leve en la población europea fue de 1/6.370 (16), tras realizar una revisión genética de 424 pacientes con HPP y gracias a pruebas funcionales adicionales, estimaron una mayor prevalencia de formas leves de HPP (1/2.430) (148), similar a la prevalencia estimada en nuestro estudio (1/3.100).

6.2. Estudio Prospectivo

A diferencia del estudio retrospectivo, en el estudio prospectivo observamos que la mayoría de los 24 sujetos seleccionados presentaron signos o síntomas compatibles con HPP.

Todos los sujetos diagnosticados genéticamente con HPP a excepción de tres de ellos (paciente 3, 7 y 14, Tabla 8), presentaron patologías óseas (la mayoría síntomas articulares u osteocondritis). Uno de los pacientes (paciente 9, Tabla 8), además de presentar sintomatología esquelética (Cifosis de Scheuermann, encondroma fémur, artralgias inespecíficas, bursitis del 1^{er} metatarso y osteoporosis), también presentó litiasis renal de repetición, posiblemente asociada al depósito de cristales cálcicos a nivel renal.

6.2.1. Variantes descritas previamente

De los pacientes adultos, el paciente 4 (Tabla 8) presentó la variante c.382G>A que codifica para el cambio de aminoácido p.(Val128Met) en el exón 5 en heterocigosis. Esta variante se encuentra localizada en las inmediaciones del sitio activo de la enzima, por lo que el cambio aminoacídico podría provocar cambios estructurales y/o en la función de la TNSALP. Esta variante se puede considerar patogénica, ya que se ha descrito en varios pacientes con HPP de distintos tipos de gravedad (desde las formas perinatal hasta la forma adulta) (211,212) probablemente debido a distintos grados de penetrancia. El trabajo de del Angel et al. 2020 mostró que esta variante presentaba un 60% de la actividad enzimática respecto a la proteína WT pero sin presentar DNE (212). Aunque el paciente de nuestro estudio portador de esta variante no presentaba clínica compatible con HPP (estenosis de válvula pulmonar), los hallazgos bioquímicos y genéticos observados, permiten sugerir que dicho paciente padece HPP leve o asintomática.

El paciente 10 (Tabla 8) presentó la variante c.1327G>A que codifica para el cambio de aminoácido p.(Ala443Thr) en el exón 12 en heterocigosis. Esta variante se puede considerar probablemente patogénica, ya que ha sido descrita en dos pacientes con HPP del adulto en nuestro estudio retrospectivo (213) así como en el trabajo de del Angel et al. 2020, donde se mostró que esta variante presentaba una fuerte reducción de la actividad ALP (93%) respecto a la proteína WT, lo que apoyaría la clasificación de esta variante genética como patogénica. Esta variante se localiza en el dominio corona, el cual estabiliza la estructura homodimérica de la proteína, por lo que un cambio a este nivel estructural puede dar lugar a una alteración del homodímero afectando a la función de TNSALP (96). A nivel clínico, el paciente portador de esta variante, presentó una sintomatología característica de HPP del adulto con una importante afectación esquelética (gonalgia izquierda, lumbalgia, escoliosis, espondiloartritis psoriásica, dolor de hombro y pie izquierdo), en consonancia con la sintomatología que presentaron los dos pacientes de nuestro estudio retrospectivo (pacientes 14 y 15, Tabla 6), con elevada afectación ósea además de anomalías dentales. Por lo tanto, estos datos permiten establecer una asociación geno-fenotípica para esta variante.

El paciente 11 (Tabla 8), presentó la variante c.1366G>A que codifica para el cambio de aminoácido p.(Gly456Arg) en el exón 12 y en heterocigosis. Esta variante se puede considerar probablemente patogénica ya que se ha identificado en pacientes con HPP de distintos tipos de gravedad (infantil, odontohipofosfatasa y HPP del adulto) (32,161,212,213). La variante se localiza en la interfaz del homodímero, por lo que puede alterar la estructura del dímero y como consecuencia la función proteica (161). En nuestro estudio retrospectivo identificamos esta misma variante en un paciente que presentaba

características clínicas compatibles con HPP del adulto (fractura de muñeca y osteoartritis). Sin embargo, este paciente presentó una sintomatología no relacionada con HPP (cardiopatía y diabetes mellitus tipo 2) presentando, por tanto, un diagnóstico bioquímico y genético compatible con HPP sin clínica asociada, siendo por tanto difícil de relacionar el genotipo con el fenotipo en este caso.

Por otra parte, los pacientes 13 y 14 (Tabla 8), presentaron la misma mutación c.473-2A>G en el intrón 5 y en heterocigosis con valores disminuidos de ALP y aumentados de PLP similares entre los dos pacientes, siendo estos valores cercanos al rango de normalidad. Como ya describimos en el paciente estudio retrospectivo, la variante se encuentra localizada en la región aceptora canónica de splicing, lo que provoca una alteración en el procesamiento del mRNA. Los pacientes afectados presentaron características clínicas compatibles con HPP a nivel esquelético (dolor articular y metatarsalgia distal en el paciente 13 y poliartritis, osteocondritis, raquialgia, gonartrosis de fase 1 e historia de fractura del troquíter del hombro izquierdo en el paciente 14). En el estudio retrospectivo también encontramos un paciente con la misma variante (paciente 5, Tabla 6) que también presentaba síntomas esqueléticos como son las fracturas en metatarso y tobillo. Esta variante se puede considerar como patogénica de acuerdo con las recomendaciones del ACMG, ya que ha sido descrita previamente en la literatura médica como causante de HPP del adulto (204).

Sin embargo, el hecho de presentar la misma mutación en diferentes sujetos, no implica la aparición de una sintomatología similar, como ocurre en los pacientes 6 y 17 (Tabla 8). En estos casos, la misma mutación (c.571G>A; p.(Glu191Lys)) en el exón 6 en heterocigosis, dio lugar a valores de ALP y PLP muy diferentes entre ambos pacientes. Mientras que el paciente 6 presentó valores de ALP y PLP cercanos al rango de normalidad, el paciente 17 presentó valores de ALP y PLP, alejados del rango de normalidad. A pesar de la diferencia entre los valores bioquímicos de ALP y PLP, ambos pacientes presentaron características clínicas similares a nivel esquelético compatibles con HPP del adulto. Así, el paciente 6 presentó cifosis de Scheuermann, litiasis renal, encondroma fémur, artralgias inespecíficas, bursitis del 1^{er} metatarso y osteoporosis, mientras que el paciente 17, presentó espondiloartrosis dorso-lumbar con osteofitosis, aplastamiento de la vértebra L1 y osteoporosis en tratamiento con bifosfonatos (ácido zolendrónico). Hay que hacer especial hincapié en la contraindicación del uso de bisfosfonatos en pacientes afectados por HPP, ya que al ser análogos de PPI puede empeorar los síntomas articulares debido al depósito de CPPD (177,190,191) así como agravar los síntomas derivados de la hipomineralización producida en la HPP (192). Esta variante se puede considerar como patogénica de acuerdo con las recomendaciones del ACMG ya que se ha descrito en pacientes con HPP de distintos

tipos de gravedad desde síntomas esqueléticos como en el caso de los pacientes 6 y 17, hasta pérdida prematura de dientes o insuficiencia respiratoria grave (<https://alplmutationdatabase.jku.at/table/>). Se ha observado una elevada prevalencia de esta variante que ha sido descrita en todas las formas de HPP (desde HPP infantil hasta HPP prenatal benigna). La variante p.(Glu191Lys) se localiza cerca del sitio de unión al calcio, sin quedar claro su repercusión sobre la estructura de TNSALP. Diversos estudios han mostrado una reducción de la actividad enzimática de ALP asociada a esta variante entre un 12 y un 78% respecto a la proteína WT, lo que se asocia directamente con la gravedad de la forma clínica de HPP que se presente (96,109,212). Por otra parte, esta variante se ha descrito en algunos pacientes con HPP en heterocigosis compuesta, como por ejemplo p.(Glu191Lys) además de p.(Gly334Asp). Los estudios funcionales *in vitro* identificaron esta variante (p.(Glu191Lys)) como una variante leve sin DNE, mientras que la variante p.(Gly334Asp) localizada en el otro alelo se identificó como una variante grave y con DNE. Por ello, la heterocigosis compuesta, podría explicar la alta variabilidad fenotípica de la variante p.(Glu191Lys) (214).

Otra de las variantes identificadas (paciente 16, Tabla 8) y previamente descritas (c.558G>A) codifica para el cambio de aminoácido p.(Trp186*) en el exón 6 y en heterocigosis. Esta variante se puede considerar patogénica ya que fue descrita en dos pacientes con HPP del adulto en nuestro estudio retrospectivo (pacientes 9 y 13, Tabla 6). La variante codifica para un codón de stop prematuro que da lugar a la pérdida de más de la mitad (2/3) de la secuencia de la proteína, y en consecuencia, tiene una importante afectación a nivel funcional (213). Como ya discutimos en el estudio retrospectivo, el fenotipo de esta variante no es específico, pudiendo presentar tanto una sintomatología grave con fracturas de distinta localización como una sintomatología leve compatible con odonto-HPP. En el estudio prospectivo, el paciente portador de esta mutación presentó una sintomatología esquelética compatible con HPP (lumbartrosis, síndrome facetario, gonartrosis grado I, poliartralgia, tendinopatía del supraespinosos), en concordancia con los resultados genéticos y bioquímicos que sugieren un diagnóstico típico de HPP del adulto. Al igual que se ha observado en otras variantes genéticas asociadas a HPP, es difícil correlacionar el genotipo con el fenotipo en esta variante. Por lo que la elevada variabilidad fenotípica en este caso, podría explicarse por la influencia de distintos grados de penetrancia por causas multifactoriales.

En el caso de la variante c.407G>A descrita en el paciente 18 (Tabla 8), se produce un cambio de aminoácido p.(Arg136His) en el exón 5 y en heterocigosis. Esta variante se puede considerar patogénica, siendo descrita previamente como causante de HPP infantil grave (95). La variante presenta una reducción de la actividad enzimática de ALP del 93% respecto

a la proteína WT en uno de los alelos(212). El paciente afectado con dicha variante presentó unas características clínicas típicas de HPP con varias complicaciones esqueléticas (poliartralgias, escoliosis dorsal, pierna izquierda hinchada y osteocondritis esternocostal). Además, presentó una fractura previa de escafoides del carpo izquierdo y pérdida de varias piezas dentales con raíz completa.

La variante c.334G>C que codifica para el cambio de aminoácido p.(Gly112Arg) en el exón 5 y en heterocigosis presentada en el paciente 19 (Tabla 8) se puede considerar probablemente patogénica ya que se ha identificado previamente en pacientes con odonto-HPP (95). La mutación identificada en este paciente se localiza en el centro activo de la proteína, por lo que un cambio en este aminoácido corrobora la alteración de la estructura y/o función de la TNSALP. El paciente afectado presentó una patología esquelética acusada incluyendo síntomas articulares (gonalgia y gonartrosis) y osteocondritis (Síndrome de Scheuermann). Aunque los síntomas graves aparecieron en edad adulta, el paciente presentó algunos síntomas reumatológicos de inicio a los 3 años de edad (artritis idiopática juvenil), por lo que el fenotipo de este paciente podría asociarse con HPP infantil a pesar de haber sido diagnosticado en la edad adulta. Esto corrobora el problema de infradiagnóstico que ocurre en muchos casos en pacientes afectados por HPP.

En el paciente 20 (Tabla 8), se identificó la variante c.1328C>T que codifica para el cambio de aminoácido p.(Ala443Val) en el exón 12 y en heterocigosis. Esta variante se puede considerar patogénica habiéndose descrito en pacientes con HPP de adulto e infantil. La variante presenta una notable reducción de la actividad enzimática de ALP con respecto a la proteína WT (actividad de 1.4% en el caso de HPP del adulto y de 7.7% en el caso de HPP infantil) sin DNE (96,212). La mutación se localiza en la zona del dominio corona por lo que tanto la estructura como la función de la enzima estarían afectadas (96). El paciente portador de esta variante presentaba criterios clínicos (Lístesis lumbar, déficit de vitamina D, pies cavos, dorsalgia, raquialgia, discartrosis L5), bioquímicos y genéticos compatibles con HPP del adulto.

6.2.2. Nuevas variantes genéticas no descritas previamente

Dos de los tres pacientes pertenecientes a la población pediátrica con mutaciones identificadas en el gen *ALPL* presentaron variantes que no habían sido previamente descritas. Uno de ellos (paciente 2, Tabla 9), presentó la variante c.17T>C, que codifica para el cambio de aminoácido p.(Leu6Ser) en el exón 2 en heterocigosis. Esta variante se puede considerar como probablemente patogénica, debido a que se encuentra localizada en la región del centro activo de la proteína y por consiguiente podría alterar la estructura y/o

función de la misma. Además, se ha descrito una variante en el mismo aminoácido en un paciente de HPP infantil (215). Sin embargo, esta mutación produce una proteína TNSALP truncada afectando estructura y la función de la enzima, siendo esta mutación por tanto no comparable a la mutación de nuestro paciente en la que solo se produce un cambio aminoacídico. La predicción *in silico* mediante algoritmos bioinformáticos indica que esta variante se incluye en el 1% de las variantes poco frecuentes del genoma y que posiblemente podría alterar la estructura y/o función de la proteína. Por la sintomatología clínica observada en el paciente afectado (paciente 2, Tabla 9) (pies valgus), asociada a los resultados del presente análisis genético, podemos sugerir que el fenotipo asociado a esta variante corresponde a la forma de HPP infantil leve.

Otro de los pacientes (paciente 3, Tabla 9), presentó la variante c.498_500delCAC; p.(Thr167del), en el exón 6 en heterocigosis. A pesar de que la sintomatología clínica que presenta el paciente (enfermedad de Crohn ileal) no es patognomónica de HPP, la variante se puede considerar probablemente patogénica ya que da lugar a la delección *in-frame* del residuo 167, situado en las inmediaciones del sitio activo de la enzima, entre el sitio de unión de Ca^{2+} y Zn^{2+} . Por la cercanía a estos residuos, esta delección podría afectar a la función normal de TNSALP. Además, en esta misma posición se ha descrito una variante patogénica donde se produce un cambio aminoacídico (p.Thr167Met) asociado a HPP severa tanto en población pediátrica (95) como en adulta (216). Todo esto apoyaría la clasificación de esta variante como probablemente patogénica.

6.2.3. Variantes de significado incierto

En nuestro estudio prospectivo, localizamos tres nuevas variantes en tres pacientes adultos que tras utilizar herramientas bioinformáticas de predicción *in silico* fueron clasificadas como variantes de significado incierto, ya que aún no había suficiente evidencia para categorizarlas como patogénicas o probablemente patogénicas.

Uno de ellos (paciente 1, Tabla 8) presentó la variante c.875C>T que codifica para el cambio de aminoácido p.(Pro292Leu) en el exón 9 y en heterocigosis. Esta variante presenta una actividad de ALP muy disminuida y niveles PLP muy elevados con respecto a los valores de referencia, además de sintomatología leve compatible con HPP (gonalgia y meniscopatía). El paciente 15 (Tabla 8) también presentó una variante de significado incierto c.69_74del en el exón 3 y en heterocigosis, que implica la delección de los residuos 23 y 24 (p.Glu23_Lys24del). Este paciente presentó niveles disminuidos de ALP y aumentados de PLP pero más cercanos a los rangos de normalidad que la variante anterior. Por otra parte, el paciente 21 (Tabla 8) presentó una variante de significado incierto c.1135C>A. que codifica para el cambio de

aminoácido p.(His379Asn) en el exón 10 en heterocigosis, que da lugar a una reducción más drástica de la actividad enzimática asociada a niveles circulantes de PLP notablemente elevados.

Para analizar en mayor profundidad la identidad de estas variantes de significado incierto, se realizó una amplia caracterización funcional mediante la determinación de la actividad ALP en células HEK293T transfectadas con *ALPL* WT o con los correspondientes mutantes del gen *ALPL*. Además, para intentar predecir el efecto de las variantes genéticas se realizó un modelaje tridimensional de la estructura TNSALP basado en la homología estructural con la isoenzima PALP.

La caracterización funcional *in vitro* de la variante p.Pro292Leu muestra unos niveles de actividad enzimática de ALP algo más elevados que la variante p.His379Asn (Figura 23).

En cuanto al estudio del efecto de las diferentes variantes de significado incierto sobre la estructura proteica de TNSALP, la variante p.Pro292Leu parece afectar a dos de las cadenas β que conforman la lámina β , la cual actúa como dominio estructural implicado en la unión al calcio. Esta variante provoca el alargamiento de estas cadenas y reduce la extensión de los *loops* existentes entre ambas. La unión del calcio es crucial para el correcto plegamiento y el ensamblaje de la molécula TNSALP (30) por lo que parece ser fundamental para la actividad de la misma en la mineralización ósea (26). Sin embargo, la importancia estructural y funcional de este sitio de unión al calcio de TNSALP no está aún del todo clara (27). Se han descrito dos variantes en la misma posición aminoacídica en heterocigosis compuesta en pacientes afectados con HPP (c.(98C>T); (874C>A) y c.(815G>T); (874C>T)). En el primer caso (c.(98C>T);(874C>A)) se asoció a HPP del lactante observándose una reducción de la actividad enzimática de ALP del 96% respecto a la proteína WT en uno de los alelos. La variante c.874C>A que codifica para el cambio aminoacídico p.(Pro292Thr) afecta al sitio de unión a calcio de TNSALP. En el otro alelo, la variante c.98C>T que codifica para el cambio aminoacídico p.(Ala33Val) se localiza en la interfaz del homodímero (217). La otra variante en el mismo aminoácido en heterocigosis compuesta (c.(815G>T); (874C>T)) se identificó en tres hermanos de la misma familia que presentaron HPP. Dos de ellos eran gemelos con HPP perinatal letal, que murieron poco después del nacimiento debido a una insuficiencia respiratoria como consecuencia de varios defectos multifactoriales. Sin embargo, debido a distintos grados de penetrancia, la otra hermana presentaba una forma posnatal leve de HPP, caracterizada por una lesión ósea cerca de su muñeca izquierda que parecía ser una fractura intrauterina curada (211). Estos resultados muestran que la gravedad de la sintomatología parece estar estrechamente relacionada con el aminoácido codificado en esa posición. En el caso de la variante identificada en nuestro paciente (p.Pro292Leu), se origina un fenotipo

leve de HPP en contraste con los fenotipos graves asociados a otras mutaciones en la misma región. Esto podría explicarse por la similitud en la estereoquímica y carga de la prolina con la leucina, dando lugar a una sustitución aminoacídica de menor gravedad. Por otra parte, la presencia de heterocigosis compuesta identificada en los pacientes con fenotipos graves que presentan variantes en el mismo aminoácido que la variante de nuestro paciente con fenotipo leve (p.Pro292Leu) podría ser la causa de la sintomatología grave de HPP. A nivel tridimensional, los cambios observados en la lámina β causados por esta variante, se asemejan a los cambios observados en otras mutaciones (p.Val217Ala o p.Val217Lys), que afectan a aminoácidos que también forman parte de esta lamina β causando inestabilidades en la región hidrófoba y generando alargamientos de estas cadenas β , presentándose en la forma perinatal letal de HPP (218).

En la caracterización funcional *in vitro* de la variante p.Glu23_Lys24del se observa también una disminución significativa en la actividad de ALP con respecto a la proteína WT, aunque no tan acusada como en el caso de las otras 2 variantes de significado incierto analizadas en el estudio (Figura 23). La caracterización estructural mostró que esta variante da lugar a la modificación de la primera cadena α de la proteína, generando ligeros cambios estructurales (Figura 25) y grandes cambios en la hidrofobicidad (Figura 26) de esa región concreta del dominio N-terminal. La región del dominio N-terminal está compuesta por 22 residuos con un importante papel en la dimerización proteica y es el sitio de anclaje de GPI a la molécula TNSALP. En el lugar donde se produce la delección se puede observar un acortamiento en la estructura proteica que repercute en la pérdida de la estructura hidrofóbica que protege a los 22 residuos, observándose la exposición hacia la superficie de un residuo hidrofílico. Además, esta delección localizada en el extremo N-terminal podría repercutir sobre el sitio de anclaje al GPI, pudiendo dar lugar a un anclaje de la proteína TNSALP a la membrana celular en lugar de secretarse al medio extracelular (219). A pesar de que las características clínicas (dolor de rodilla y lumbar) y bioquímicas del paciente afectado son compatibles con HPP, la variante p.Glu23_Lys24del no presenta un fenotipo claramente patogénico de HPP (<https://varsome.com>).

Tal y como se esperaba, la actividad ALP de la variante p.His379Asn presentó niveles muy disminuidos (Figura 23), concordando con los valores observados en las determinaciones serológicas de dicha paciente. La variante p.His379Asn a simple vista podría parecer no generar un efecto importante a nivel estructural (Figura 25) ni a nivel de polaridad (Figura 26), sin embargo, el cambio aminoacídico que origina esta variante da lugar a la pérdida de uno de los sitios de unión a Zn^{2+} de la proteína. Este catión localizado en el sitio activo de TNSALP actúa como cofactor de la enzima para desarrollar una adecuada actividad

enzimática (27). Por lo tanto, la principal causa de la disminución tan drástica de la actividad de la enzima parece estar asociada a la reducción del 50% de capacidad de unión de Zn^{2+} .

En un principio y debido a la falta de evidencias científicas suficiente, las variantes c.875C>T; p.(Pro292Leu) y c.1135C>A; p.(His379Asn) fueron clasificadas de acuerdo con las recomendaciones del ACMG como variantes de significado incierto. Sin embargo, tras la reciente búsqueda en la web Varsome (<https://varsome.com/>), estas dos variantes ya han sido reclasificadas como probablemente patogénicas, en concordancia con los resultados observados en nuestros estudios de caracterización funcional y estructural.

6.2.4. Pacientes con bioquímica y clínica compatible con HPP, pero con estudio genético negativo

De los 4 pacientes en los que no se identificó ninguna mutación en el gen *ALPL*, 3 de ellos presentaron niveles de ALP disminuidos y PLP elevados junto con sintomatología clínica compatible con HPP (Tabla 8). El paciente 5 presentaba acromegalia, lumboartrosis y tendinitis calcificante de hombro; el paciente 6, artrosis femoropatelar de rodilla derecha; mientras que el paciente 12 presentaba osteopenia. Además, estos dos últimos pacientes presentaban hemocromatosis, lo que podría explicar la disminución de la actividad de ALP y el aumento de PLP, ya que hay estudios recientes que han demostrado que la actividad ferroxidasa de la ferritina es un potente inhibidor de la osteogénesis, al inhibir significativamente la actividad de la TNSALP (129) (Figura 6). Actualmente la hemocromatosis no se considera como causa de exclusión de HPP, pero estas evidencias muestran que se trata de una causa secundaria de hipofosfatemia por lo que los protocolos deberían actualizarse y ser considerados en la práctica clínica.

Por otra parte, el factor de transcripción RUNX2 está involucrado en el proceso de regulación de la mineralización ósea, participando en la regulación de la actividad de TNSALP. Mutaciones en el gen codificante del factor de transcripción RUNX2 producen fenotipos similares a la forma de HPP infantil (131) dando lugar a una enfermedad conocida como Displasia Cleidocraneal. Esta podría ser otra explicación a la ausencia de mutaciones en el gen *ALPL* en pacientes con bioquímica y clínica compatible con HPP. Aunque la prevalencia de esta patología es muy baja, resultaría de gran interés realizar la secuenciación del gen codificante de RUNX2 para descartar el diagnóstico de Displasia Cleidocraneal como causa de niveles disminuidos de ALP y elevados de PLP.

Aún sin identificar ninguna mutación en el gen *ALPL*, no podemos descartar la HPP en estos pacientes, ya que en el estudio genético por secuenciación Sanger realizado no se

secuencian algunas regiones del gen *ALPL*, como las regiones promotoras o regiones intrónicas del gen (140). En este sentido, se debería de realizar un seguimiento clínico a estos pacientes. En el caso de una alta sospecha clínica, sería recomendable realizar una secuenciación completa del gen *ALPL* mediante Next Generation Sequencing (NGS), que permitiría además de identificar delecciones, identificar mutaciones en las regiones no codificantes o mutaciones en la secuencia reguladora del gen (25,220). También sería interesante secuenciar el gen *RUNX2* en busca de mutaciones que puedan concordar con el fenotipo de estos pacientes.

Al igual que en el estudio retrospectivo, con los resultados del estudio prospectivo también realizamos un estudio de prevalencia de HPP en nuestro país. De tal manera que, siguiendo el protocolo descrito en el estudio prospectivo, de los 24 sujetos estudiados encontramos 15 pacientes afectados por HPP (con determinación genética positiva), sin diagnóstico previo de dicho trastorno. Estos datos indican que más de la mitad de la población estudiada (62%) no estaba correctamente diagnosticada en la práctica clínica habitual. Si extrapolamos estos datos a la población actual de España, esto podría significar la existencia de 10.779 potenciales casos de HPP actualmente no diagnosticados. Teniendo en cuenta la proporción de pacientes potenciales de HPP que no participaron en este estudio por diferentes causas (60%), y según nuestros resultados, la estimación actual de potenciales casos de HPP no diagnosticados en España podría llegar hasta los 27.177 casos. Por lo tanto, la prevalencia estimada de HPP leve en nuestro estudio prospectivo podría casi duplicar las estimaciones realizadas en el estudio retrospectivo (1/1.692 vs 1/3.100).

6.3. Discusión general

En nuestros estudios se demuestra que la HPP es una enfermedad infradiagnosticada, siendo necesaria la utilización de algoritmos diagnósticos bien estructurados en hospitales de tercer nivel para detectar HPP en la práctica clínica.

En contraste con la importancia que a menudo se otorga a los hallazgos de niveles elevados de ALP en suero, los niveles de ALP inferiores a los valores de referencia no suelen despertar el mismo interés en la práctica clínica. Esto suele ser debido en gran parte al desconocimiento de la HPP, siendo este uno de los principales factores limitantes para su diagnóstico. Otro factor limitante del diagnóstico es la existencia de algunas situaciones clínicas que suelen estar asociadas con aumento de los niveles de ALP circulante (como embarazo, varias enfermedades hepato biliares, cirugía ortopédica y/o fracturas recientes) (156,221,222), que podrían enmascarar el diagnóstico de HPP.

El hallazgo de niveles séricos de ALP disminuidos no es sinónimo de HPP, existiendo otras situaciones clínicas que producen disminución de la actividad de dicha enzima. Un reciente estudio mostró que solo la mitad de los pacientes de entre 20 y 77 años que presentaban niveles séricos de ALP disminuidos de forma persistente, presentaban una mutación en el gen *ALPL* (204). Nuestros resultados tanto en el estudio retrospectivo como en el prospectivo mostraron datos similares, observando que de los pacientes con valores de ALP persistentemente disminuidos y sospecha de HPP aproximadamente un 44% (en el estudio retrospectivo) y un 62% (en el estudio prospectivo) presentaban alguna variante en el gen *ALPL*.

Además, observamos que el 100% de los pacientes adultos de nuestro estudio que presentaban alguna mutación en el gen *ALPL*, presentaban niveles inferiores o iguales a 30 UI/L de forma persistente, dato a tener en cuenta en la práctica clínica, ya que aumentaría la sospecha de HPP. En este contexto, los niveles séricos de ALP inferiores o iguales a 30 UI/L de forma persistente en adultos y los hallazgos clínicos y radiográficos deben de ser considerados junto con la acumulación de sustratos naturales para TNSALP, con el fin de establecer un diagnóstico correcto de HPP.

Debido a la variabilidad clínica de la HPP y al solapamiento de los síntomas clínicos con otras patologías esqueléticas y dentales más prevalentes y conocidas (como osteoporosis, raquitismo, osteogénesis imperfecta o enfermedad periodontal), se hace necesario realizar un correcto diagnóstico diferencial con el resto de patologías con manifestaciones clínicas comunes con HPP, con el objeto de evitar diagnósticos y tratamientos erróneos como el tratamiento con bifosfonatos, análogos del PPi que pueden aumentar el depósito de CPPD (177,190,191) así como el empeoramiento de los síntomas derivados de la hipomineralización de HPP al actuar directamente inhibiendo la formación de HA o unirse a cationes de Zn^{2+} o Mg^{2+} disminuyendo la actividad de TNSALP (192). Para ello es importante la difusión de dicha enfermedad a todos los niveles, tanto en atención primaria como en el ámbito hospitalario.

Sigue siendo un desafío establecer el diagnóstico de HPP en portadores heterocigotos que pueden presentar síntomas atípicos o leves. El laboratorio clínico también juega un papel importante en esta labor, ya que uno de los criterios diagnósticos de HPP de mayor accesibilidad es la determinación de la actividad persistentemente disminuida de la ALP que junto con la determinación de niveles de PLP elevados en plasma pueden hacer sospechar del diagnóstico de HPP que puede corroborarse con y los hallazgos clínicos y radiológicos. Las pruebas genéticas para la identificación de mutaciones en el gen *ALPL* pueden agregar información adicional para establecer el diagnóstico definitivo de HPP.

Es fundamental que el laboratorio establezca unos valores de referencia adecuados y estandarizados por edad y sexo. Todo esto junto con comentarios adecuados en los informes de laboratorio en caso de valores de ALP disminuidos de forma persistente, permiten alertar al clínico ante la sospecha bioquímica de HPP.

Actualmente, se han descrito más de 400 mutaciones diferentes en el gen *ALPL* que se han anotado en la base de datos de mutaciones de *ALPL* (<https://alplmutationdatabase.jku.at>) La correcta identificación de nuevas variantes y el estudio de su fenotipo permitirá mejorar el conocimiento de este trastorno metabólico para hacerlo accesible a la comunidad científica, permitiendo un mejor manejo de la enfermedad.

Por lo tanto, es imprescindible establecer una correcta valoración clínica para realizar un diagnóstico adecuado de este trastorno, debido a la potencial gravedad de la enfermedad, su intensa afectación de la calidad de vida en muchos pacientes, o la posible iatrogenia derivada de un diagnóstico equivoco. Además, la disponibilidad de un tratamiento de reemplazo enzimático específico de la HPP (TNSALP humana recombinante, asfotasa alfa) especialmente en formas graves en el periodo infato-juvenil supone un cambio en la estrategia terapéutica que implica la realización de un diagnóstico correcto que permita proporcionar un tratamiento y manejo precoz y adecuado para estos pacientes.

Actualmente, se han descrito más de 400 mutaciones diferentes en el gen *ALPL* y se han anotado en la base de datos de mutaciones de *ALPL* (<https://alplmutationdatabase.jku.at>) La correcta identificación de nuevas variantes y el estudio de su fenotipo permitirá mejorar el conocimiento de este trastorno metabólico para hacerlo accesible a la comunidad científica, permitiendo un mejor manejo de la enfermedad.

Por lo tanto, es importante establecer una correcta valoración clínica para realizar un diagnóstico adecuado de este trastorno, debido a la potencial gravedad de la enfermedad, su intensa afectación de la calidad de vida en muchos pacientes, o la posible iatrogenia derivada de un diagnóstico equivoco. Además, la disponibilidad de un tratamiento de reemplazo enzimático específico de la HPP (TNSALP humana recombinante, asfotasa alfa) especialmente en formas graves en el periodo infato-juvenil supone un cambio en la estrategia terapéutica que hace necesario realizar un diagnóstico correcto que permita proporcionar un tratamiento y manejo precoz y adecuado para estos pacientes.

7. CONCLUSIONES

1. La HPP del adulto es una enfermedad infraestimada en nuestro medio de acuerdo a nuestros estudios, con una prevalencia estimada de HPP moderada por nuestro grupo de investigación en nuestro país de 1/3.100, similar a la prevalencia estimada por Mornet, et al. (2021) en Europa (1/2.430).
2. La estimación de la prevalencia según los resultados de nuestro estudio prospectivo casi duplicaría la reportada en nuestro estudio retrospectivo 1/1692 vs 1/3100.
3. Estimamos que en España existen entre 15000 y 27000 casos no diagnosticados de la enfermedad
4. La implementación de algoritmos diagnósticos bien estructurados en los que se incluyan las determinaciones bioquímicas de ALP y PLP junto con el estudio de las manifestaciones clínicas, radiológicas y estudios genéticos del gen *ALPL*, permiten el diagnóstico precoz de HPP.
5. Los estudios de caracterización funcional y estructural realizados durante esta tesis en el estudio retrospectivo sobre las dos nuevas mutaciones del gen *ALPL* no descritas previamente, c.558G> A; p.Trp186* y c.1327G> A; p.Ala443Thr muestran una drástica disminución de la actividad de TNSALP en ambas variantes genéticas, así como modificaciones importantes en la estructura de la proteína. Estos resultados, en concordancia con las características bioquímicas y clínicas de estos pacientes, permiten asociar estas variantes con un fenotipo patogénico de HPP.
6. Las variantes p.Pro292Leu y p.Glu23_Lys24del, presentan una notable reducción de actividad aunque se asocian con una sintomatología más leve de HPP. Mientras que la variante p.His379Asn revela la pérdida de 2 de los cuatro sitios de unión a Zn^{2+} en la proteína dimérica, lo que podría explicar la drástica reducción de actividad mostrada por esta variante y el fenotipo de HPP grave del paciente.
7. Tras una reevaluación de las variantes de significado incierto p.Pro292Leu y p.His379Asn, ambas variantes han sido clasificadas como probablemente patogénicas.
8. La dificultad para vincular genotipo con fenotipo puede explicarse por la influencia de otros factores genéticos, epigenéticos o no genéticos de HPP.
9. Se requieren estudios génicos más complejos para evaluar a los pacientes con características clínicas y bioquímicas compatibles y sin mutación del gen *ALPL*.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Rathbun JC. Hypophosphatasia; a new developmental anomaly. *Am J Dis Child*. 1948;75(6):822–31.
2. Whyte MP. Hypophosphatasia-aetiology, nosology, pathogenesis, diagnosis and treatment. *Nat Rev Endocrinol*. 2016;12(4):233–46.
3. Mornet E. Hypophosphatasia. *Orphanet J Rare Dis*. 2007 Dec 4;2(1):40.
4. Linglart A, Biosse-duplan M. Hypophosphatasia. 2016;95–105.
5. Bianchi ML. Hypophosphatasia: an overview of the disease and its treatment. Vol. 26, *Osteoporosis International*. Springer-Verlag London Ltd; 2015. p. 2743–57.
6. Vinan-Vega MN, Abate EG. Hypophosphatasia: Clinical assessment and management in the adult patient—a narrative review. Vol. 24, *Endocrine Practice*. American Association of Clinical Endocrinologists; 2018. p. 1086–92.
7. Araci MB, Akgun B, Atik T, Isik E, Ak G, Barutcuoglu B, et al. Clinical and molecular findings in children and young adults with persistent low alkaline phosphatase concentrations. *Ann Clin Biochem*. 2021;
8. Martos-Moreno GA, Calzada J, Couce ML, Argente J. Hypophosphatasia: Clinical manifestations, diagnostic recommendations and therapeutic options. *An Pediatría*. 2018;88(6):356.e1-356.e11.
9. Robison R. The Possible Significance of Hexosephosphoric Esters in Ossification. *Biochem J*. 1923 Jan 1;17(2):286–93.
10. A. EF. The Significance of Phosphoric Esters in Metabolism. *Nature*. 1933 Nov;132(3343):803–803.
11. Millán, J. L., Whyte MP. Alkaline Phosphatase and Hypophosphatasia. *Calcif Tissue Int*. 2016;98(4):398–416.
12. Chown B. Renal rickets and dwarfism: A pituitary disease. *Br J Surg*. 1936;23:552–556.
13. Fraser D. Hypophosphatasia. *Am J Med*. 1957;22(5):730–46.
14. Leung ECW, Mhanni AA, Reed M, Whyte MP, Landy H, Greenberg CR. Outcome of perinatal hypophosphatasia in manitoba mennonites: A retrospective cohort analysis. In: *JIMD Reports*. Springer; 2013. p. 73–8.
15. Sobel, E. H., Clark, L. C. Jr, Fox, R. P. & Robinow M. Rickets, deficiency of alkaline phosphatase activity and premature loss of teeth in childhood. *Pediatrics*. 1953;11:309–322.
16. Mornet E, Yvard A, Taillandier A, Fauvert D, Simon-Bouy B. A Molecular-Based Estimation of the Prevalence of Hypophosphatasia in the European Population. *Ann Hum Genet*. 2011;75(3):439–45.
17. Bethune JE, Dent CE. Hypophosphatasia in the adult. *Am J Med*. 1960;28(4):615–22.
18. Mueller HD, Stinson RA, Mohyuddin F, Milne JK. Isoenzymes of alkaline phosphatase in infantile hypophosphatasia. *J Lab Clin Med*. 1983 Jul 1;102(1):24–30.
19. Gorodischer R, Davidson RG, Mosovich LL, Yaffe SJ. Hypophosphatasia: A developmental anomaly of alkaline phosphatase? *Pediatr Res*. 1976;10(7):650–6.

20. Whyte MP. Hypophosphatasia. In: Bilezikian JP et al., editor. Principles of Bone Biology 3rd edn. Academic Press; 2008. p. 1573–1598.
21. Weiss MJ, Cole DEC, Ray K, Whyte MP, Lafferty MA, Mulivor RA, et al. A missense mutation in the human liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene causing a lethal form of hypophosphatasia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(20):7666–9.
22. Chodirker BN, Evans JA, Seargeant LE, Cheang MS, Greenberg CR. Hyperphosphatemia in infantile hypophosphatasia: Implications for carrier diagnosis and screening. *Am J Hum Genet*. 1990;46(2):280–5.
23. MacPherson RI, Kroeker M HC. Hypophosphatasia. *J Can Assoc Radiol*. 1972;23:16–26.
24. Conti F. Hypophosphatasia: clinical manifestation and burden of disease in adult patients. *Clin Cases Miner Bone Metab*. 2017;14(2):230.
25. Mornet E. Hypophosphatasia. *Metabolism*. 2018;82:142–55.
26. Mornet E, Stura E, Lia-Baldini AS, Stigbrand T, Ménez A, Le Du MH. Structural Evidence for a Functional Role of Human Tissue Nonspecific Alkaline Phosphatase in Bone Mineralization. *J Biol Chem*. 2001;276(33):31171–8.
27. Millán JL. Mammalian Alkaline Phosphatases: From Biology to Applications in Medicine and Biotechnology. *Mammalian Alkaline Phosphatases: From Biology to Applications in Medicine and Biotechnology*. Wiley-VCH; 2006. 1–322 p.
28. Anh DJ, Eden A, Farley JR. Quantitation of soluble and skeletal alkaline phosphatase, and insoluble alkaline phosphatase anchor-hydrolase activities in human serum. *Clin Chim Acta*. 2001 Sep 25;311(2):137–48.
29. Buchet R, Millán JL, Magne D. Multisystemic Functions of Alkaline Phosphatases. *Methods Mol Biol*. 2013;1053:27–51.
30. Sharma U, Pal D, Prasad R. Alkaline phosphatase: An overview. *Indian J Clin Biochem*. 2014;29(3):269–78.
31. Hoylaerts MF, Manes T, Millán JL. Mammalian alkaline phosphatases are allosteric enzymes. *J Biol Chem*. 1997;272(36):22781–7.
32. Ozono K, Yamagata M, Michigami T, Nakajima S, Sakai N, Cai G, et al. Identification of novel missense mutations (Phe310Leu and Gly439Arg) in a neonatal case of hypophosphatasia. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996 Dec;81(12):4458–61.
33. Morris DC, Masuhara K, Takaoka K, Ono K, Anderson HC. Immunolocalization of alkaline phosphatase in osteoblasts and matrix vesicles of human fetal bone. *Bone Miner*. 1992 Dec 1;19(3):287–98.
34. Hawrylak K, Stinson RA. The solubilization of tetrameric alkaline phosphatase from human liver and its conversion into various forms by phosphatidylinositol phospholipase C or proteolysis. *J Biol Chem*. 1988 Oct 5;263(28):14368–73.
35. Orimo H. Pathophysiology of hypophosphatasia and the potential role of asfotase alfa. *Ther Clin Risk Manag*. 2016;12:777–86.

36. Anderson HC. The role of matrix vesicles in physiological and pathological calcification. Vol. 18, *Current Opinion in Orthopaedics*. 2007. p. 428–33.
37. Mebarek S, Abousalham A, Magne D, Do LD, Bandorowicz-Pikula J, Pikula S, et al. Phospholipases of mineralization competent cells and matrix vesicles: Roles in physiological and pathological mineralizations. Vol. 14, *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2013. p. 5036–129.
38. Roberts S, Narisawa S, Harmey D, Millán JL, Farquharson C. Functional involvement of PHOSPHO1 in matrix vesicle-mediated skeletal mineralization. *J Bone Miner Res*. 2007 Apr;22(4):617–27.
39. Murshed M, Harmey D, Millán JL, McKee MD, Karsenty G. Unique coexpression in osteoblasts of broadly expressed genes accounts for the spatial restriction of ECM mineralization to bone. *Genes Dev*. 2005 May 1;19(9):1093–104.
40. Salles JP. Hypophosphatasia: Biological and Clinical Aspects, Avenues for Therapy. *Clin Biochem Rev*. 41(1):2020–33.
41. Anderson HC, Hsu HH, Morris DC, Fedde KN, Whyte MP. Matrix vesicles in osteomalacic hypophosphatasia bone contain apatite-like mineral crystals. *Am J Pathol*. 1997;151(6):1555.
42. Anderson HC, Sipe JB, Hessle L, Dharmyramaju R, Atti E, Camacho NP, et al. Impaired Calcification Around Matrix Vesicles of Growth Plate and Bone in Alkaline Phosphatase-Deficient Mice. *Am J Pathol*. 2004;164(3):841–7.
43. Johnson K, Goding J, Van Etten D, Sali A, Hu SI, Farley D, et al. Linked Deficiencies in Extracellular PPi and Osteopontin Mediate Pathologic Calcification Associated With Defective PC-1 and ANK Expression. *J Bone Miner Res*. 2003 Jun 1;18(6):994–1004.
44. Rutsch F, Ruf N, Vaingankar S, Toliat MR, Suk A, Höhne W, et al. Mutations in ENPP1 are associated with “idiopathic” infantile arterial calcification. *Nat Genet*. 2003 Aug 1;34(4):379–81.
45. Ho AM, Johnson MD, Kingsley DM. Role of the mouse ank gene in control of tissue calcification and arthritis. *Science* (80-). 2000 Jul 14;289(5477):265–70.
46. Harmey D, Hessle L, Narisawa S, Johnson KA, Terkeltaub R, Millán JL. Concerted Regulation of Inorganic Pyrophosphate and Osteopontin by Akp2, Enpp1, and Ank: An Integrated Model of the Pathogenesis of Mineralization Disorders. *Am J Pathol*. 2004;164(4):1199–209.
47. Whyte MP. Hypophosphatasia. Nature’s Window on Alkaline Phosphatase Function in Humans. In: *Principles of Bone Biology, Two-Volume Set*. Elsevier Inc.; 2008. p. 1573–98.
48. Foster BL, Nagatomo KJ, Tso HW, Tran AB, Nociti FH, Narisawa S, et al. Tooth root dentin mineralization defects in a mouse model of hypophosphatasia. *J Bone Miner Res*. 2013 Feb;28(2):271–82.
49. McKee MD, Nakano Y, Masica DL, Gray JJ, Lemire I, Heft R, et al. Enzyme replacement therapy prevents dental defects in a model of hypophosphatasia. In: *Journal of Dental*

- Research. 2011. p. 470–6.
50. Michigami T. Skeletal mineralization: Mechanisms and diseases. Vol. 24, *Annals of Pediatric Endocrinology and Metabolism*. Korean society of pediatric endocrinology; 2019. p. 213–9.
 51. Low MG, Saltiel AR. Structural and functional roles of glycosyl-phosphatidylinositol in membranes. Vol. 239, *Science*. 1988. p. 268–75.
 52. Gospe SM. Pyridoxine-dependent seizures: New genetic and biochemical clues to help with diagnosis and treatment. Vol. 19, *Current Opinion in Neurology*. 2006. p. 148–53.
 53. Waymire KG, Mahuren JD, Jaje JM, Guilarte TR, Coburn SP, MacGregor GR. Mice lacking tissue non-specific alkaline phosphatase die from seizures due to defective metabolism of vitamin B-6. *Nat Genet*. 1995;11(1):45–51.
 54. Fedde KN, Whyte MP. Alkaline phosphatase (tissue-nonspecific isoenzyme) is a phosphoethanolamine and pyridoxal-5'-phosphate ectophosphatase: Normal and hypophosphatasia fibroblast study. *Am J Hum Genet*. 1990;47(5):767–75.
 55. Guilarte TR. Regional changes in the concentrations of glutamate, glycine, taurine, and GABA in the vitamin B-6 deficient developing rat brain: Association with neonatal seizures. *Neurochem Res*. 1989 Sep;14(9):889–97.
 56. Narisawa S, Wennberg C, Millán JL. Abnormal vitamin B6 metabolism in alkaline phosphatase knock-out mice causes multiple abnormalities, but not the impaired bone mineralization. *J Pathol*. 2001;193(1):125–33.
 57. Whyte MP, Mahuren JD, Fedde KN, Cole FS, McCabe ERB, Coburn SP. Perinatal hypophosphatasia: Tissue levels of vitamin B6 are unremarkable despite markedly increased circulating concentrations of pyridoxal-5'-phosphate. Evidence for an ectoenzyme role for tissue-nonspecific alkaline phosphatase. *J Clin Invest*. 1988;81(4):1234.
 58. Baumgartner-Sigl S, Haberlandt E, Mumm S, Scholl-Bürgi S, Sergi C, Ryan L, et al. Pyridoxine-responsive seizures as the first symptom of infantile hypophosphatasia caused by two novel missense mutations (c.677T > C, p.M226T; c.1112C > T, p.T371I) of the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene. *Bone*. 2007 Jun;40(6):1655–61.
 59. Hatoff DE, Hardison WGM. Bile acids modify alkaline phosphatase induction and bile secretion pressure after bile duct obstruction in the rat. *Gastroenterology*. 1981 Apr 1;80(4):666–72.
 60. Hatoff DE, Hardison WGM. Bile Acid-Dependent Secretion of Alkaline Phosphatase in Rat Bile. *Hepatology*. 1982;2(4):433S-439S.
 61. Poelstra K, Bakker WW, Klok PA, Hardonk MJ, Meijer DKF. A physiologic function for alkaline phosphatase: Endotoxin detoxification. *Lab Investig*. 1997 Mar 1;76(3):319–27.
 62. Kanistanon D, Powell DA, Hajjar AM, Pelletier MR, Cohen IE, Way SS, et al. Role of francisella lipid A phosphate modification in virulence and long-term protective immune responses. *Infect Immun*. 2012 Mar;80(3):943–51.
 63. Bentala H, Verweij WR, Huizinga-Van Der Vlag A, Van Loenen-Weemaes AM, Meijer

- DKF, Poelstra K. Removal of phosphate from lipid a as a strategy to detoxify lipopolysaccharide. *Shock*. 2002 Dec;18(6):561–6.
64. Nouwen EJ, De Broe ME. Human intestinal versus tissue-nonspecific alkaline phosphatase as complementary urinary markers for the proximal tubule. In: *Kidney International, Supplement*. 1994.
65. Kapojos JJ, Poelstra K, Borghuis T, Van Den Berg A, Baelde HJ, Klok PA, et al. Induction of glomerular alkaline phosphatase after challenge with lipopolysaccharide. *Int J Exp Pathol*. 2003 Jun;84(3):135–44.
66. Baumann JM, Bisaz S, Felix R, Fleisch H, Ganz U, Russell RG. The role of inhibitors and other factors in the pathogenesis of recurrent calcium containing renal stones. *Clin Sci Mol Med*. 1977;53(2):141–8.
67. Laminski NA, Meyers AM, Sonnekus MI, Smyth AE. Prevalence of hypocitraturia and hypopyrophosphaturia in recurrent calcium stone formers: As isolated defects or associated with other metabolic abnormalities. *Nephron*. 1990;56(4):379–86.
68. Tyson KL, Reynolds JL, McNair R, Zhang Q, Weissberg PL, Shanahan CM. Osteo/chondrocytic transcription factors and their target genes exhibit distinct patterns of expression in human arterial calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003 Mar 1;23(3):489–94.
69. Ishimura E, Okuno S, Kitatani K, Kim M, Shoji T, Nakatani T, et al. Different risk factors for peripheral vascular calcification between diabetic and non-diabetic haemodialysis patients - Importance of glycaemic control. *Diabetologia*. 2002;45(10):1446–8.
70. Shanahan CM, Cary NRB, Salisbury JR, Proudfoot D, Weissberg PL, Edmonds ME. Medial localization of mineralization-regulating proteins in association with Monckeberg's sclerosis: Evidence for smooth muscle cell-mediated vascular calcification. *Circulation*. 1999 Nov 23;100(21):2168–76.
71. Stompór T, Pasowicz M, Sulowicz W, Dembińska-Kieć A, Janda K, Wójcik K, et al. An association between coronary artery calcification score, lipid profile, and selected markers of chronic inflammation in ESRD patients treated with peritoneal dialysis. *Am J Kidney Dis*. 2003 Jan 1;41(1):203–11.
72. Yahagi K, Kolodgie FD, Lutter C, Mori H, Romero ME, Finn A V., et al. Pathology of human coronary and carotid artery atherosclerosis and vascular calcification in diabetes mellitus. Vol. 37, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. Lippincott Williams and Wilkins; 2017. p. 191–204.
73. Li JJ, Zhu CG, Yu B, Liu YX, Yu MY. The role of inflammation in coronary artery calcification. Vol. 6, *Ageing Research Reviews*. Elsevier; 2007. p. 263–70.
74. Goldberg RF, Austen WG, Zhang X, Munene G, Mostafa G, Biswas S, et al. Intestinal alkaline phosphatase is a gut mucosal defense factor maintained by enteral nutrition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Mar 4;105(9):3551–6.

75. Malo MS, Nasrin Alam S, Mostafa G, Zeller SJ, Johnson P V., Mohammad N, et al. Intestinal alkaline phosphatase preserves the normal homeostasis of gut microbiota. *Gut*. 2010 Nov;59(11):1476–84.
76. Malo MS, Moaven O, Muhammad N, Biswas B, Alam SN, Economopoulos KP, et al. Intestinal alkaline phosphatase promotes gut bacterial growth by reducing the concentration of luminal nucleotide triphosphates. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol*. 2014 May 15;306(10).
77. Ramasamy S, Nguyen DD, Eston M, Alam N, Moss AK, Ebrahimi F, et al. Intestinal alkaline phosphatase has beneficial effects in mouse models of chronic colitis. 2011;17(2):532–42.
78. Bilski J, Mazur-Bialy A, Wojcik D, Zahradnik-Bilska J, Brzozowski B, Magierowski M, et al. The Role of Intestinal Alkaline Phosphatase in Inflammatory Disorders of Gastrointestinal Tract. *Mediators Inflamm*. 2017;2017.
79. Fawley J, Koehler S, Cabrera S, Lam V, Fredrich K, Hessner M, et al. Intestinal alkaline phosphatase deficiency leads to dysbiosis and bacterial translocation in the newborn intestine. *J Surg Res*. 2017;218:35–42.
80. Schromm AB, Brandenburg K, Loppnow H. The charge of endotoxin molecules influences their conformation and IL-6-inducing capacity. *J Immunol*. 1998;161:5464–71.
81. Díaz-Hernández M, Gómez-Ramos A, Rubio A, Gómez-Villafuertes R, Naranjo JR, Teresa Miras-Portugal M, et al. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase promotes the neurotoxicity effect of extracellular tau. *J Biol Chem*. 2010 Oct 15;285(42):32539–48.
82. Vardy ERLC, Kellett KAB, Cocklin SL, Hooper NM. Alkaline Phosphatase Is Increased in both Brain and Plasma in Alzheimer's Disease. *Neurodegener Dis*. 2011 Nov;9(1):31–7.
83. A. Demenis, Francisco A. Leone M. Kinetic Characteristics of ATP Hydrolysis by a Detergent-Solubilized Alkaline Phosphatase From Rat Osseous Plate. *IUBMB Life (International Union Biochem Mol Biol Life)*. 2000 Feb 1;49(2):113–9.
84. Pettengill M, Robson S, Tresenriter M, Millán JL, Usheva A, Bingham T, et al. Soluble ecto-5'-nucleotidase (5'-NT), alkaline phosphatase, and adenosine deaminase (ADA1) activities in neonatal blood favor elevated extracellular adenosine. *J Biol Chem*. 2013 Sep 20;288(38):27315–26.
85. Street SE, Kramer NJ, Walsh PL, Taylor-Blake B, Yadav MC, King IF, et al. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase acts redundantly with PAP and NT5E to generate adenosine in the dorsal spinal cord. *J Neurosci*. 2013;33(27):11314–22.
86. Carr SA, Huddleston MJ, Bean MF. Selective identification and differentiation of N- and O-linked oligosaccharides in glycoproteins by liquid chromatography-mass spectrometry. *Protein Sci*. 1993;2(2):183.
87. Ohtsubo K, Marth J. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell*. 2006 Sep 8;126(5):855–67.

88. Halling Linder C, Narisawa S, Millán JL, Magnusson P. Glycosylation differences contribute to distinct catalytic properties among bone alkaline phosphatase isoforms. *Bone*. 2009 Nov;45(5):987–93.
89. Nosjean O, Koyama I, Goseki M, Roux B, Komoda T. Human tissue non-specific alkaline phosphatases: Sugar-moiety-induced enzymic and antigenic modulations and genetic aspects. *Biochem J*. 1997 Jan 15;321(2):297–303.
90. Swolin-Eide D, Hansson S, Larsson L, Magnusson P. The novel bone alkaline phosphatase B1x isoform in children with kidney disease. *Pediatr Nephrol*. 2006 Nov;21(11):1723–9.
91. Magnusson P, Larsson L, Magnusson M, Davie MWJ, Sharp CA. Isoforms of Bone Alkaline Phosphatase: Characterization and Origin in Human Trabecular and Cortical Bone. *J Bone Miner Res*. 1999 Nov 1;14(11):1926–33.
92. Magnusson P, Löfman O, Larsson L. Methodological aspects on separation and reaction conditions of bone and liver alkaline phosphatase isoform analysis by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem*. 1993;211(1):156–63.
93. Kiledjian M, Kadesch T. Post-transcriptional regulation of the human liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene. *J Biol Chem*. 1991 Mar 5;266(7):4207–13.
94. Weiss MJ, Ray K, Henthorn PS, Lamb B, Kadesch T, Harris H. Structure of the human liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene. *J Biol Chem*. 1988;263(24):12002–10.
95. Whyte M, Zhang F, Wenkert D, McAlister W, Mack K, Benigno M, et al. Hypophosphatasia: validation and expansion of the clinical nosology for children from 25 years experience with 173 pediatric patients. *Bone*. 2015 Jun 1;75:229–39.
96. Fauvert D, Brun-Heath I, Lia-Baldini AS, Bellazi L, Taillandier A, Serre JL, et al. Mild forms of hypophosphatasia mostly result from dominant negative effect of severe alleles or from compound heterozygosity for severe and moderate alleles. *BMC Med Genet*. 2009 Jun 6;10.
97. Seefried L, Junker U, Jakob F. Efficacy of anti-sclerostin monoclonal antibody BPS804 in adult patients with hypophosphatasia The Journal of Clinical Investigation. *J Clin Invest*. 2017;127(6).
98. Herskowitz I. Functional inactivation of genes by dominant negative mutations. Vol. 329, *Nature*. Nature; 1987. p. 219–22.
99. Terao M, Studer M, Gianni M, Garattini E. Isolation and characterization of the mouse liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase gene. *Biochem J*. 1990;268(3):641–8.
100. Studer M, Terao M, Gianni M, Garattini E. Characterization of a second promoter for the mouse liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase gene: cell and tissue specific expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991;179(3):1352–60.
101. Zernik J, Thiede MA, Twarog K, Stover ML, Rodan GA, Upholt WB, et al. Cloning and Analysis of the 5' Region of the Rat Bone/Liver/Kidney/Placenta Alkaline Phosphatase Gene. A dual-function promoter. *Matrix*. 1990;10(1):38–47.
102. Johnson-Pais TL, Leach RJ. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and transforming growth factor- β

- act synergistically to override extinction of liver/bone/kidney alkaline phosphatase in osteosarcoma hybrid cells. *Exp Cell Res.* 1996;226(1):67–74.
103. Rodan SB, Wesolowski G, Yoon K, Rodan GA. Opposing effects of fibroblast growth factor and pertussis toxin on alkaline phosphatase, osteopontin, osteocalcin, and type I collagen mRNA levels in ROS 17/2.8 cells. *J Biol Chem.* 1989 Nov 25;264(33):19934–41.
 104. Sato K, Han DC, Fujii Y, Tsushima T, Shizume K. Thyroid hormone stimulates alkaline phosphatase activity in cultured rat osteoblastic cells (ros 17/2.8) through 3,5,3-triiodo-L-thyronine nuclear receptors. *Endocrinology.* 1987;120(5):1873–81.
 105. Uhler MD, Abou-Chebl A. Cellular concentrations of protein kinase A modulate prostaglandin and cAMP induction of alkaline phosphatase. *J Biol Chem.* 1992 Apr 25;267(12):8658–65.
 106. Le Du MH, Stigbrand T, Taussig MJ, Ménez A, Stura EA. Crystal structure of alkaline phosphatase from human placenta at 1.8 Å resolution: Implication for a substrate specificity. *J Biol Chem.* 2001 Mar 23;276(12):9158–65.
 107. Bortolato M, Besson F, Roux B. Role of metal ions on the secondary and quaternary structure of alkaline phosphatase from bovine intestinal mucosa. *Proteins Struct Funct Genet.* 1999 Nov 1;37(2):310–8.
 108. Mornet E. Molecular genetics of hypophosphatasia and phenotype-genotype correlations. *Subcell Biochem.* 2015;76:25–43.
 109. Zurutuza L, Muller F, Gibrat JF, Taillandier A, Simon-Bouy B, Serre JL, et al. Correlations of genotype and phenotype in hypophosphatasia. *Hum Mol Genet.* 1999;8(6):1039–46.
 110. Ciancaglini P, Yadav MC, Simão AMS, Narisawa S, Pizauro JM, Farquharson C, et al. Kinetic analysis of substrate utilization by native and TNAP-, NPP1-, or PHOSPHO1-deficient matrix vesicles. *J Bone Miner Res.* 2010 Apr;25(4):716–23.
 111. Lei W, Nguyen H, Brown N, Ni H, Kiffer-Moreira T, Reese J, et al. Alkaline phosphatases contribute to uterine receptivity, implantation, decidualization and defense against bacterial endotoxin in hamsters.
 112. Narisawa S, Yadav MC, Millán JL. In vivo overexpression of tissue-nonspecific alkaline phosphatase increases skeletal mineralization and affects the phosphorylation status of osteopontin. *J Bone Miner Res.* 2013 Jul;28(7):1587–98.
 113. Addison WN, Azari F, Sørensen ES, Kaartinen MT, McKee MD. Pyrophosphate inhibits mineralization of osteoblast cultures by binding to mineral, up-regulating osteopontin, and inhibiting alkaline phosphatase activity. *J Biol Chem.* 2007 May 25;282(21):15872–83.
 114. Thouverey C, Bechkoff G, Pikula S, Buchet R. Inorganic pyrophosphate as a regulator of hydroxyapatite or calcium pyrophosphate dihydrate mineral deposition by matrix vesicles. *Osteoarthr Cartil.* 2009 Jan;17(1):64–72.
 115. Whyte MP, Landt M, Ryan LM, Mulivor RA, Henthorn PS, Fedde KN, et al. Alkaline phosphatase: Placental and tissue-nonspecific isoenzymes hydrolyze phosphoethanolamine,

- inorganic pyrophosphate, and pyridoxal 5'-phosphate. Substrate accumulation in carriers of hypophosphatasia corrects during pregnancy. *J Clin Invest.* 1995;95(4):1440–5.
116. Fleshood HL, Pitot HC. The metabolism of O-phosphorylethanolamine in animal tissues. II. Metabolic regulation of O-phosphorylethanolamine phospholyase in vivo. *Arch Biochem Biophys.* 1970;141(2):423–9.
117. Christensen B, Nielsen MS, Haselmann KF, Petersen TE, Sørensen ES. Post-translationally modified residues of native human osteopontin are located in clusters: Identification of 36 phosphorylation and five O-glycosylation sites and their biological implications. *Biochem J.* 2005 Aug 15;390(1):285–92.
118. Goldberg HA, Warner KJ, Li MC, Hunter GK. Binding of bone sialoprotein, osteopontin and synthetic polypeptides to hydroxyapatite. *Connect Tissue Res.* 2001;42(1):25–37.
119. Jono S, Peinado C, Giachelli CM. Phosphorylation of osteopontin is required for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification. *J Biol Chem.* 2000 Jun 30;275(26):20197–203.
120. Hunter GK, Kyle CL, Goldberg HA. Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: Structural specificity of the osteopontin-mediated inhibition of hydroxyapatite formation. *Biochem J.* 1994;300(3):723–8.
121. Harmey D, Johnson KA, Zelken J, Camacho NP, Hoylaerts MF, Noda M, et al. Elevated skeletal osteopontin levels contribute to the hypophosphatasia phenotype in Akp2^{-/-} mice. *J Bone Miner Res.* 2006 Sep;21(9):1377–86.
122. Millán JL, Plotkin H. Hypophosphatasia - pathophysiology and treatment. *Actual osteol.* 2012 Sep 1;8(3):164–82.
123. Simon S, Resch H, Klaushofer K, Roschger P, Zwerina J, Kocijan R. Hypophosphatasia: From Diagnosis to Treatment. *Curr Rheumatol Rep.* 2018;20(11):18–24.
124. Guañabens N, Blanch J, Martínez-Díaz-Guerra G, Muñoz Torres M. Identification of hypophosphatasia in a clinical setting: Clinical manifestations and diagnostic recommendations in adult patients. *Med Clin (Barc).* 2018;150(2):75–9.
125. Colantonio DA, Kyriakopoulou L, Chan MK, Daly CH, Brinc D, Venner AA, et al. Closing the gaps in pediatric laboratory reference intervals: A caliper database of 40 biochemical markers in a healthy and multiethnic population of children. *Clin Chem.* 2012;58(5):854–68.
126. Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, Clerc-Renaud P, Ferrero CA, Féraud G, et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37°C. *Clin Chem Lab Med.* 2002;40(6):635–42.
127. Araújo PAT, Thomas D, Sadeghieh T, Bevilacqua V, Chan MK, Chen Y, et al. CLSI-based transference of the CALIPER database of pediatric reference intervals to Beckman Coulter Dx C biochemical assays. *Clin Biochem.* 2015;48(13–14):870–80.
128. Whyte MP. Hypophosphatasia: An overview For 2017. *Bone.* 2017;102(2016):15–25.
129. Zarjou A, Jeney V, Arosio P, Poli M, Zavaczki E, Balla G, et al. Ferritin ferroxidase activity: A potent inhibitor of osteogenesis. *J Bone Miner Res.* 2010 Jan 1;25(1):164–72.

130. Wright GD, Doherty M. Calcium pyrophosphate crystal deposition is not always “wear and tear” or aging. *Ann Rheum Dis.* 1997;56(10):586–8.
131. Unger S, Mornet E, Mundlos S, Blaser S, Cole DEC. Severe cleidocranial dysplasia can mimic hypophosphatasia. *Eur J Pediatr.* 2002;161(11):623–6.
132. Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, et al. *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell.* 1997 May 30;89(5):765–71.
133. Sriver CR, Cameron D. Pseudohypophosphatasia. *N Engl J Med.* 1969 Sep 11;281(11):604–6.
134. Heaton BW, McClendon JL. Childhood pseudohypophosphatasia. Clinical and laboratory study of two cases. *Tex Dent J.* 1986 Sep;103(9):4–8.
135. Sarkar AK, Ghosh SK, Mitra P, Mandal S, Mukhopadhyay S, Mathew J. Pseudohypophosphatasia. *Indian J Pediatr.* 1997;64(2):256–61.
136. Alonso G, Varsavsky M, Muñoz-Torres M. Hipofosfatasa: nuevas perspectivas terapéuticas. *Med Clin (Barc).* 2009;132(3):108–11.
137. Genest F, Claußen L, Rak D, Seefried L. Bone mineral density and fracture risk in adult patients with hypophosphatasia. *Osteoporos Int.* 2021 Feb 1;32(2):377–85.
138. Bloch-Zupan A. Hypophosphatasia: diagnosis and clinical signs - a dental surgeon perspective. *Int J Paediatr Dent.* 2016 Nov 1;26(6):426–38.
139. Yadav MC, Simão AMS, Narisawa S, Huesa C, McKee MD, Farquharson C, et al. Loss of skeletal mineralization by the simultaneous ablation of PHOSPHO1 and alkaline phosphatase function: A unified model of the mechanisms of initiation of skeletal calcification. *J Bone Miner Res.* 2011 Feb;26(2):286–97.
140. Mentrup B, Girschick H, Jakob F, Hofmann C. A homozygous intronic branch-point deletion in the *ALPL* gene causes infantile hypophosphatasia. *Bone.* 2017 Jan 1;94:75–83.
141. Wenkert D, McAlister WH, Coburn SP, Zerega JA, Ryan LM, Ericson KL, et al. Hypophosphatasia: Nonlethal disease despite skeletal presentation in utero (17 new cases and literature review). *J Bone Miner Res.* 2011 Oct 1;26(10):2389–98.
142. Di Mauro S, Manes T, Hesse L, Kozlenkov A, Pizauro JM, Hoylaerts MF, et al. Kinetic Characterization of Hypophosphatasia Mutations With Physiological Substrates. *J Bone Miner Res.* 2002;17(8):1383–91.
143. Jandl NM, Schmidt T, Rolvien T, Stürznickel J, Chrysostomou K, von Vopelius E, et al. Genotype–Phenotype Associations in 72 Adults with Suspected *ALPL*-Associated Hypophosphatasia. *Calcif Tissue Int.* 2020 Nov 15;1:3.
144. Lia-Baldini AS, Muller F, Taillandier A, Gibrat JF, Mouchard M, Robin B, et al. A molecular approach to dominance in hypophosphatasia. *Hum Genet.* 2001;109(1):99–108.
145. Schmidt T, Mussawy H, Rolvien T, Hawellek T, Hubert J, Rütther W, et al. Clinical, radiographic and biochemical characteristics of adult hypophosphatasia. *Osteoporos Int.*

- 2017 Sep 1;28(9):2653–62.
146. Henthorn PS, Raducha M, Fedde KN, Lafferty MA, Whyte MP. Different missense mutations at the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene locus in autosomal recessively inherited forms of mild and severe hypophosphatasia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(20):9924–8.
 147. Whyte MP. Hypophosphatasia and the Role of Alkaline Phosphatase in Skeletal Mineralization. *Endocr Rev*. 1994 Aug 1;15(4):439–61.
 148. Mornet E, Taillandier A, Domingues C, Dufour A, Benaloun E, Lavaud N, et al. Hypophosphatasia: a genetic-based nosology and new insights in genotype-phenotype correlation. *Eur J Hum Genet*. 2021 Feb 1;29(2):289–99.
 149. Castells L, Cassanello P, Muñoz F, De Castro MJ, Couce ML. Neonatal lethal hypophosphatasia A case report and review of literature. *Med (United States)*. 2018 Nov 1;97(48).
 150. Colazo JM, Hu JR, Dahir KM, Simmons JH. Neurological symptoms in Hypophosphatasia. *Osteoporos Int*. 2019 Feb 5;30(2):469–80.
 151. Collmann H, Mornet E, Gattenlöhner S, Beck C, Girschick H. Neurosurgical aspects of childhood hypophosphatasia. *Child's Nerv Syst*. 2009;25(2):217–23.
 152. Taketani T. Neurological symptoms of hypophosphatasia. *Subcell Biochem*. 2015;76:309–22.
 153. Whyte MP, Leung E, Wilcox WR, Liese J, Argente J, Martos-Moreno G, et al. Natural History of Perinatal and Infantile Hypophosphatasia: A Retrospective Study. *J Pediatr*. 2019 Jun 1;209:116-124.e4.
 154. Zhang Z, Nam HK, Crouch S, Hatch NE. Tissue nonspecific alkaline phosphatase function in bone and muscle progenitor cells: Control of mitochondrial respiration and ATP production. *Int J Mol Sci*. 2021 Feb 1;22(3):1–20.
 155. Berkseth KE, Tebben PJ, Drake MT, Hefferan TE, Jewison DE, Wermers RA. Clinical spectrum of hypophosphatasia diagnosed in adults. *Bone*. 2013 May;54(1):21–7.
 156. McKiernan FE, Berg RL, Fuehrer J. Clinical and radiographic findings in adults with persistent hypophosphatasemia. *J Bone Miner Res*. 2014;29(7):1651–60.
 157. López-Delgado L, Riancho-Zarrabeitia L, García-Unzueta MT, Tenorio JA, García-Hoyos M, Lapunzina P, et al. Abnormal bone turnover in individuals with low serum alkaline phosphatase. *Osteoporos Int*. 2018 Sep 1;29(9):2147–50.
 158. Whyte MP. Hypophosphatasia. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. 7th ed. New York: McGraw-Hill; 1995. p. 4095–4112.
 159. Yu F, Wang J, Xu X. Lethal perinatal hypophosphatasia caused by a novel compound heterozygous mutation: a case report. *BMC Pediatr*. 2019 Apr 13;19(1):1–5.
 160. Sinico M, Levaillant JM, Vergnaud A, Blondeau JR, Encha-Razavi F, Mornet E, et al.

- Specific osseous spurs in a lethal form of hypophosphatasia correlated with 3D prenatal ultrasonographic images. *Prenat Diagn.* 2007 Mar;27(3):222–7.
161. Yokoi K, Nakajima Y, Shinkai Y, Sano Y, Imamura M, Akiyama T, et al. Clinical and genetic aspects of mild hypophosphatasia in Japanese patients. *Mol Genet Metab Reports.* 2019 Dec 1;21.
 162. De Roo MGA, Abeling NGGM, Majoie CB, Bosch AM, Koelman JHTM, Cobben JM, et al. Infantile hypophosphatasia without bone deformities presenting with severe pyridoxine-resistant seizures. *Mol Genet Metab.* 2014 Mar;111(3):404–7.
 163. Shohat M, Rimoin DL, Gruber HE, Lachman RS. Perinatal lethal hypophosphatasia; Clinical, radiologic and morphologic findings. *Pediatr Radiol.* 1991 Oct;21(6):421–7.
 164. Whyte MP. Physiological role of alkaline phosphatase explored in hypophosphatasia. In: *Annals of the New York Academy of Sciences.* Blackwell Publishing Inc.; 2010. p. 190–200.
 165. Jaruratanasirikul S, Chanvitan P. Hypophosphatasia: the importance of alkaline phosphatase in bone mineralization. *J Med Assoc Thail.* 1999;82(12):1268–72.
 166. Matsushita M, Kitoh H, Michigami T, Tachikawa K, Ishiguro N. Benign prenatal hypophosphatasia: A treatable disease not to be missed. *Pediatr Radiol.* 2014;44(3):340–3.
 167. Whyte MP. Hypophosphatasia. In: Thakker RV et al., editor. *Genetics of Bone Biology and Skeletal Disease.* 1st ed. Academic Press; 2013. p. 337–360.
 168. Whyte MP, Greenberg CR, Salman NJ, Bober MB, McAlister WH, Wenkert D, et al. Enzyme-replacement therapy in life-threatening hypophosphatasia. *N Engl J Med.* 2012 Mar 8;366(10):904–13.
 169. Whyte MP, Magill HL, Fallon MD, Herrod HG. Infantile hypophosphatasia: Normalization of circulating bone alkaline phosphatase activity followed by skeletal remineralization. Evidence for an intact structural gene for tissue nonspecific alkaline phosphatase. *J Pediatr.* 1986;108(1):82–8.
 170. Reibel A, Manière MC, Clauss F, Droz D, Alembik Y, Mornet E, et al. Oro-dental phenotype and genotype findings in all subtypes of hypophosphatasia. *Orphanet J Rare Dis.* 2009;4(1).
 171. Van Den Bos T, Handoko G, Niehof A, Ryan LM, Coburn SP, Whyte MP, et al. Cementum and dentin in hypophosphatasia. *J Dent Res.* 2005 Nov;84(11):1021–5.
 172. Whyte MP, Wenkert D, Zhang F. Hypophosphatasia: Natural history study of 101 affected children investigated at one research center. *Bone.* 2016 Dec 1;93:125–38.
 173. Girschick HJ, Mornet E, Beer M, Warmuth-Metz M, Schneider P. Chronic multifocal non-bacterial osteomyelitis in hypophosphatasia mimicking malignancy. *BMC Pediatr.* 2007;7.
 174. Whyte MP, Wenkert D, McAlister WH, Mughal MZ, Freemont AJ, Whitehouse R, et al. Chronic recurrent multifocal osteomyelitis mimicked in childhood hypophosphatasia. In: *Journal of Bone and Mineral Research.* 2009. p. 1493–505.
 175. Girschick HJ, Schneider P, Haubitz I, Hiort O, Collmann H, Beer M, et al. Effective

- NSAID treatment indicates that hyperprostaglandinism is affecting the clinical severity of childhood hypophosphatasia. *Orphanet J Rare Dis.* 2006;1(1).
176. Whyte MP, Teitelbaum SL, Murphy WA, Bergfeld MA, Avioli L V. Adult hypophosphatasia: Clinical, laboratory, and genetic investigation of a large kindred with review of the literature. *Med (United States).* 1979;58(5):329–47.
 177. Sutton RAL, Mumm S, Coburn SP, Ericson KL, Whyte MP. “Atypical femoral fractures” during bisphosphonate exposure in adult hypophosphatasia. *J Bone Miner Res.* 2012 May;27(5):987–94.
 178. Whyte MP, Murphy WA, Fallon MD. Adult hypophosphatasia with chondrocalcinosis and arthropathy. Variable penetrance of hypophosphatasemia in a large Oklahoma kindred. *Am J Med.* 1982;72(4):631–41.
 179. Coe JD, Murphy WA, Whyte MP. Management of femoral fractures and pseudofractures in adult hypophosphatasia. *J Bone Jt Surg - Ser A.* 1986;68(7):981–90.
 180. Whyte MP. Atypical femoral fractures, bisphosphonates, and adult hypophosphatasia. *J Bone Miner Res.* 2009 Jun;24(6):1132–4.
 181. Whyte MP, Leelawattana R, Reinus WR, Yang C, Mumm S, Novack D V. Acute severe hypercalcemia after traumatic fractures and immobilization in hypophosphatasia complicated by chronic renal failure. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013 Dec;98(12):4606–12.
 182. Lynch CD, Ziada HM, Buckley LA, O’Sullivan VR, Aherne T, Aherne S. Prosthodontic rehabilitation of hypophosphatasia using dental implants: a review of the literature and two case reports. *J Oral Rehabil.* 2009 Jun 1;36(6):462–8.
 183. Foster BL, Nagatomo KJ, Nociti FH, Fong H, Dunn D, Tran AB, et al. Central role of pyrophosphate in acellular cementum formation. *PLoS One.* 2012 Jun 4;7(6).
 184. Lundgren T, Westphal O, Bolme P, Modéer T, Norén JG. Retrospective study of children with hypophosphatasia with reference to dental changes. *Eur J Oral Sci.* 1991;99(5):357–64.
 185. Pauli RM, Modaff P, Sipes SL, Whyte MP. Mild hypophosphatasia mimicking severe osteogenesis imperfecta in utero: bent but not broken. *Am J Med Genet.* 1999 Oct;86(5):434–8.
 186. Cahill RA, Wenkert D, Perlman SA, Steele A, Coburn SP, McAlister WH, et al. Infantile hypophosphatasia: Transplantation therapy trial using bone fragments and cultured osteoblasts. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(8):2923–30.
 187. Taketani T, Oyama C, Mihara A, Tanabe Y, Abe M, Hirade T, et al. Ex vivo expanded allogeneic mesenchymal stem cells with bone marrow transplantation improved osteogenesis in infants with severe hypophosphatasia. *Cell Transplant.* 2015 Oct 13;24(10):1931–43.
 188. Moulin P, Sales de Gauzy J, Vaysse F, Mornet E, Salles JP. Growth hormone increases growth velocity and alkaline phosphatase level in children with hypophosphatasia. *Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol.* 2012;51(1):e40.

189. Korpál-Szczyrska M, Balcerska A. The effect of growth hormone treatment on serum bone alkaline phosphatase in growth hormone deficient children. *Pediatr Endocrinol Diabetes Metab.* 2008 Jan 1;14(4):211–4.
190. Genest F, Seefried L. Subtrochanteric and diaphyseal femoral fractures in hypophosphatasia—not atypical at all. *Osteoporos Int.* 2018 Aug 1;29(8):1815–25.
191. Peris P, González-Roca E, Rodríguez-García SC, del Mar López-Cobo M, Monegal A, Guañabens N. Incidence of Mutations in the ALPL , GGPS1 , and CYP1A1 Genes in Patients With Atypical Femoral Fractures. *JBMR Plus.* 2019 Jan;3(1):29–36.
192. Whyte MP. Hypophosphatasia: Enzyme Replacement Therapy Brings New Opportunities and New Challenges. *J Bone Miner Res.* 2017;32(4):667–75.
193. Whyte MP, Mumm S, Deal C. Adult Hypophosphatasia Treated with Teriparatide. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 Apr 1;92(4):1203–8.
194. Schmidt T, Rolvien T, Linke C, Jandl NM, Oheim R, Amling M, et al. Outcome of Teriparatide Treatment on Fracture Healing Complications and Symptomatic Bone Marrow Edema in Four Adult Patients With Hypophosphatasia. *JBMR Plus.* 2019 Aug;3(8).
195. Laroche M. Failure of teriparatide in treatment of bone complications of adult hypophosphatasia. Vol. 90, *Calcified Tissue International*. *Calcif Tissue Int*; 2012. p. 250.
196. Gagnon C, Sims NA, Mumm S, McAuley SA, Jung C, Poulton IJ, et al. Lack of sustained response to teriparatide in a patient with adult hypophosphatasia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(3):1007–12.
197. Camacho PM, Painter S, Kadanoff R. Treatment of adult hypophosphatasia with teriparatide. *Endocr Pract.* 2008;14(2):204–8.
198. Asfotase alfa: Uses, Interactions, Mechanism of Action | DrugBank Online [Internet]. [cited 2021 Aug 17]. Available from: <https://go.drugbank.com/drugs/DB09105>
199. Whyte MP, Rockman-Greenberg C, Ozono K, Riese R, Moseley S, Melian A, et al. Asfotase alfa treatment improves survival for perinatal and infantile hypophosphatasia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016;101(1):334–42.
200. Whyte MP, Madson KL, Phillips D, Reeves AL, McAlister WH, Yakimoski A, et al. Asfotase alfa therapy for children with hypophosphatasia. *JCI Insight.* 2016 Jun 16;1(9):85971.
201. Stürznickel J, Schmidt FN, von Vopelius E, Delsmann MM, Schmidt C, Jandl NM, et al. Bone healing and reactivation of remodeling under asfotase alfa therapy in adult patients with pediatric-onset hypophosphatasia. *Bone.* 2021 Feb 1;143.
202. Genest F, Rak D, Petryk A, Seefried L. Physical Function and Health-Related Quality of Life in Adults Treated With Asfotase Alfa for Pediatric-Onset Hypophosphatasia. *JBMR Plus.* 2020 Sep 4;4(9):e10395.
203. Kishnani PS, Rockman-Greenberg C, Rauch F, Bhatti MT, Moseley S, Denker AE, et al. Five-year efficacy and safety of asfotase alfa therapy for adults and adolescents with

- hypophosphatasia. *Bone*. 2019 Apr 1;121:149–62.
204. Riancho-Zarrabeitia L, García-Unzueta M, Tenorio JA, Gómez-Gerique JA, Ruiz Pérez VL, Heath KE, et al. Clinical, biochemical and genetic spectrum of low alkaline phosphatase levels in adults. *Eur J Intern Med*. 2016 Apr 1;29:40–5.
205. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*. 2004 Oct;25(13):1605–12.
206. Mornet E. Genetics of hypophosphatasia. *Arch Pediatr*. 2017 May 1;24(5):5S51–6.
207. Hoylaerts MF, Manes T, Millan JL. Molecular mechanism of uncompetitive inhibition of human placental and germ-cell alkaline phosphatase. *Biochem J*. 1992;286(1):23–30.
208. Khandwala H, Mumm S, Whyte S. Low serum alkaline phosphatase activity and pathologic fracture: case report and brief review of hypophosphatasia diagnosed in adulthood. *Endocr Pract*. 2006;12(6):676–81.
209. Mornet E. The tissue nonspecific alkaline phosphatase gene mutations database (ALPL; NM_000478.5). Universidad de Versailles-Saint Quentin, Yvelines, Francia. 2004. p. http://www.sesep.uvsq.fr/03_hypo_mutations.php/.
210. Taillandier A, Lia-Baldini AS, Mouchard M, Robin B, Muller F, Simon-Bouy B, et al. Twelve novel mutations in the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene (ALPL) in patients with various forms of hypophosphatasia. *Hum Mutat*. 2001;18(1):83–4.
211. Tenorio J, Álvarez I, Riancho-Zarrabeitia L, Martos-Moreno G, Mandrile G, de la Flor Crespo M, et al. Molecular and clinical analysis of ALPL in a cohort of patients with suspicion of Hypophosphatasia. *Am J Med Genet A*. 2017 Mar 1;173(3):601–10.
212. del Angel G, Reynders J, Negron C, Steinbrecher T, Mornet E. Large-scale in vitro functional testing and novel variant scoring via protein modeling provide insights into alkaline phosphatase activity in hypophosphatasia. *Hum Mutat*. 2020 Jul 1;41(7):1250–62.
213. García-Fontana C, Villa-Suárez JM, Andújar-Vera F, González-Salvatierra S, Martínez-Navajas G, Real PJ, et al. Epidemiological, Clinical and Genetic Study of Hypophosphatasia in A Spanish Population: Identification of Two Novel Mutations in The Alpl Gene. *Sci Rep*. 2019 Jul;9(1):9569.
214. Hofmann C, Girschick H, Mornet E, Schneider D, Jakob F, Mentrup B. Unexpected high intrafamilial phenotypic variability observed in hypophosphatasia. *Eur J Hum Genet*. 2014 Oct 11;22(10):1160–4.
215. Taillandier A, Cozien E, Muller F, Merrien Y, Bonnin E, Fribourg C, et al. Fifteen new mutations (-195C>T, L-12X, 298-2A>G, T117N, A159T, R229S, 997+2T>A, E274X, A331T, H364R, D389G, 1256delC, R433H, N461I, C472S) in the tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNSALP) gene in patients with hypophosphatasia. *Hum Mutat*. 2000 Mar 1;15(3):293–293.
216. Braunstein N. Multiple fractures, pain, and severe disability in a patient with adult-onset

- hypophosphatasia. Bone reports. 2015 Jun 1;4:1–4.
217. Brun-Heath I, Taillandier A, Serre JL, Mornet E. Characterization of 11 novel mutations in the tissue non-specific alkaline phosphatase gene responsible for hypophosphatasia and genotype–phenotype correlations. *Mol Genet Metab.* 2005 Mar 1;84(3):273–7.
 218. Chang K-C, Lin P-H, Su Y-N, Steven •, Peng S-F, Lee N-C, et al. Novel heterozygous tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP) gene mutations causing lethal perinatal hypophosphatasia.
 219. Komaru K, Ishida-Okumura Y, Numa-Kinjoh N, Hasegawa T, Oda K. Molecular and cellular basis of hypophosphatasia. *J oral Biosci.* 2019 Sep 1;61(3):141–8.
 220. Taillandier A, Domingues C, De Cazanove C, Porquet-Bordes V, Monnot S, Kiffer-Moreira T, et al. Molecular diagnosis of hypophosphatasia and differential diagnosis by targeted Next Generation Sequencing HHS Public Access. *Mol Genet Metab.* 2015;116(3):215–20.
 221. Chan AWH, Chan SL, Mo FKF, Wong GLH, Wong VWS, Cheung YS, et al. Albumin-to-alkaline phosphatase ratio: A novel prognostic index for hepatocellular carcinoma. *Dis Markers.* 2015;2015.
 222. Holstege A. Erhöhte Leberwerte. *DMW - Dtsch Medizinische Wochenschrift.* 2016 Nov 4;141(22):1640–6.

9. RESUMEN

La hipofosfatasa (HPP) es una enfermedad genética clasificada como ultra-rara causada por una o varias mutaciones con pérdida de función en el gen *ALPL* codificante de la fosfatasa alcalina no específica de tejido (TNSALP) (1–3). La HPP presenta una alta variabilidad clínica asociada principalmente a la acumulación de los sustratos de la enzima (PPi y PLP) (4), dando lugar a un deterioro progresivo de numerosos órganos vitales. Las principales manifestaciones clínicas de HPP incluyen defectos en la mineralización de huesos y dientes, dolor, debilidad muscular profunda, insuficiencia respiratoria, convulsiones o trastornos renales (5).

La prevalencia estimada de HPP en la población europea es de 1/300.000 para las formas clínicas más graves (6) y de 1/2.430 para las formas clínicas moderadas (7), mientras que en España la prevalencia es desconocida. Sin embargo, los datos de nuestros estudios muestran que la HPP podría tener una mayor prevalencia que la descrita previamente, debido al infradiagnóstico de la misma por el solapamiento clínico de su sintomatología con la de otras patologías más prevalentes (osteoporosis, raquitismo, osteogénesis imperfecta o enfermedad periodontal) (8).

En este contexto, este trabajo de investigación se centra por un lado en la implementación de un algoritmo diagnóstico adecuado para dar solución al problema de infradiagnóstico de HPP y por otro en la estimación de la prevalencia de esta enfermedad en España.

En primer lugar, se realizó un estudio retrospectivo en el que se revisaron las analíticas disponibles con determinaciones de ALP durante el año 2016 en la UGCL del Hospital Universitario Clínico San Cecilio de Granada siguiendo el algoritmo planteado. Se determinaron los niveles séricos de PLP a aquellos pacientes con niveles persistentemente disminuidos de ALP tras descartar otras situaciones clínicas de hipofosfatemia, además de realizar estudios de secuenciación del gen *ALPL* con el objetivo de identificar posibles mutaciones causantes de HPP. Los datos del estudio retrospectivo mostraron que siete de los dieciséis adultos participantes presentaron alguna mutación en el gen *ALPL* sin disponer de un diagnóstico previo de HPP. La extrapolación de los datos derivados de este estudio a la población española permitió estimar una prevalencia de HPP leve en nuestro país de 1/3.100 de forma similar a las estimaciones previamente reportadas en el estudio de Mornet, *et al* (1/2.430)(148).

Tras realizar algunas modificaciones en el algoritmo inicial en cuanto a los valores de referencia de ALP total se realizó un estudio prospectivo entre 2018 y 2019 con el objetivo de diagnosticar de forma activa cualquier caso potencial de HPP evitando así el infradiagnóstico de esta enfermedad en la práctica clínica.

Los datos del estudio prospectivo mostraron una incidencia de HPP en el 62.5% de los pacientes con niveles de ALP por debajo del rango de normalidad. Estos datos sugieren que la prevalencia de HPP leve en la población española podría casi duplicar las estimaciones previamente realizadas tanto por Mornet como en nuestro estudio retrospectivo, estimando una prevalencia de 1/1.692.

Por otro lado, se llevaron a cabo estudios de caracterización funcional y estructural tanto de las nuevas variantes del gen *ALPL* no descritas previamente identificadas en el estudio retrospectivo, como de aquellas variantes de significado incierto identificadas en el estudio prospectivo, con el objeto de poder realizar una vinculación geno-fenotípica de cada variante para ofrecer un diagnóstico individualizado y establecer las medidas preventivas y terapéuticas más apropiadas para cada paciente. Para ello se llevó a cabo la transfección de células humanas embrionarias de riñón (HEK293T) con el vector pcDNA 3.1 conteniendo las distintas secuencias codificantes para cada una de las variantes del gen *ALPL* a estudiar, incluyendo la secuencia WT de *ALPL*.

Los estudios de caracterización funcional y estructural realizados en el estudio retrospectivo sobre las dos nuevas mutaciones del gen *ALPL* no descritas previamente, mostraron una drástica disminución de la actividad de TNSALP en ambas variantes genéticas, así como modificaciones importantes en la estructura de la proteína que permiten asociar estas variantes con un fenotipo patogénico de HPP. Los estudios de caracterización funcional y estructural de las tres variantes genéticas clasificadas como variantes de significado incierto de forma inicial en nuestro estudio prospectivo sugirieron un fenotipo patogénico en todas ellas, aunque una de ellas mostró un efecto más leve tanto a nivel estructural como funcional. La reevaluación de estas tres variantes a través de la web de Varsome (<https://varsome.com>), clasificó a dos de ellas como probablemente patogénicas en concordancia con los resultados de nuestro estudio.

En nuestros estudios identificamos pacientes con características bioquímicas y clínicas compatibles con HPP, pero sin mutación en el gen *ALPL*. La ausencia de un diagnóstico genético negativo no implica el descarte de un diagnóstico de HPP en estos pacientes, siendo necesarios estudios adicionales que permitan realizar un diagnóstico certero.

En resumen, nuestro estudio ha puesto de manifiesto la existencia de una elevada tasa de casos de HPP infradiagnosticados en la práctica clínica habitual, mostrando la importancia de la implantación de un algoritmo diagnóstico de HPP que permitiría disminuir el infradiagnóstico de esta patología. Además, la caracterización funcional y estructural de

nuevas variantes identificadas no descritas previamente, así como aquellas clasificadas como variantes de significado incierto por falta de datos disponibles, permite en algunos casos realizar una vinculación geno-fenotípica de cada variante con el objeto de ofrecer un diagnóstico preciso que permita adoptar medidas preventivas y terapéuticas más apropiadas y adaptadas a cada paciente.

ANEXO 1: Cuestionario de calidad de vida, modelo EQ-5D

Figure 1: EQ-5D-Y (UK English sample version)

Describing your health

Under each heading, please tick the ONE box that best describes your health TODAY

Mobility (*walking about*)

- I have no problems walking about
- I have some problems walking about
- I have a lot of problems walking about

Looking after myself

- I have no problems washing or dressing myself
- I have some problems washing or dressing myself
- I have a lot of problems washing or dressing myself

Doing usual activities (*for example, going to school, hobbies, sports, playing, doing things with family or friends*)

- I have no problems doing my usual activities
- I have some problems doing my usual activities
- I have a lot of problems doing my usual activities

Having pain or discomfort

- I have no pain or discomfort
- I have some pain or discomfort
- I have a lot of pain or discomfort

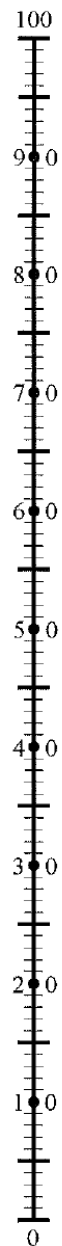
Feeling worried, sad or unhappy

- I am not worried, sad or unhappy
- I am a bit worried, sad or unhappy
- I am very worried, sad or unhappy

How good is your health TODAY

- We would like to know how good or bad your health is TODAY.
- This line is numbered from 0 to 100.
- 100 means the best health you can imagine.
0 means the worst health you can imagine.
- Please mark an X on the line that shows how good or bad your health is TODAY.

The best health
you can imagine



The worst health
you can imagine

ANEXO 2: Formulario de información y consentimiento informado escrito para la participación en el estudio de investigación:



FORMULARIO DE INFORMACION Y CONSENTIMIENTO INFORMADO ESCRITO para la participación en el estudio de investigación:

Papel del Laboratorio Clínico en el Diagnóstico de Hipofosfatasa: evaluación de un algoritmo diagnóstico y búsqueda prospectiva de posibles casos no diagnosticados

**Centro Sanitario: Hospital Universitario Clínico San Cecilio
Unidad de Gestión Clínica de Laboratorios**

OBJETIVOS DEL ESTUDIO

El objetivo de este estudio de investigación es la búsqueda de casos no diagnosticados de una rara enfermedad metabólica llamada HIPOFOSFATASIA. La hipofosfatasa es una enfermedad genética que se manifiesta clínicamente con problemas de mineralización ósea y/o complicaciones dentarias. Esta enfermedad se caracteriza bioquímicamente por la presencia de niveles bajos de actividad de una enzima presente en suero llamada fosfatasa alcalina. Los profesionales de laboratorio están seleccionando a pacientes que cumplen criterios de sospecha de esta enfermedad (niveles bajos de fosfatasa alcalina en suero sin motivo clínico que explique dicha situación) para ofertarles un estudio diagnóstico que confirme o descarte la presencia de hipofosfatasa.

EN QUE CONSISTE

Se extraerá una muestra de plasma del paciente para medir la concentración de una vitamina llamada piridoxal-5'-fosfato (PLP). La mayoría de los pacientes con hipofosfatasa presentan niveles elevados de esta vitamina en suero. Se realizará el análisis de fosfatasa alcalina en suero o plasma en el supuesto caso que el participante del estudio no tenga ninguna determinación en su historia clínica o si fuera necesario repetir para comprobar un resultado bajo.

Además, realizaremos la extracción de una muestra de suero para la determinación de los niveles de esclerostina en pacientes con niveles bajos de ALP y altos de PLP. La esclerostina es una proteína secretada por el hueso que limita la su formación en exceso. Queremos estudiar si existe una relación entre esta proteína y la Hipofosfatasa.

De manera simultánea o secuencial se extraerá una muestra de sangre del paciente para extraer ADN y realizar un análisis genético del gen alterado en la Hipofosfatasa llamado *ALPL*. Los pacientes con hipofosfatasa pueden presentar una mutación en este gen si el patrón de herencia es dominante o bien dos mutaciones si el patrón de herencia es recesivo. El análisis genético no es indispensable para confirmar el diagnóstico, pero puede ayudar en casos en los que el diagnóstico de hipofosfatasa no esté muy claro y puede facilitar el consejo genético al paciente y sus familiares. En caso de que no sea necesario realizar el estudio genético y ya se haya extraído la muestra de sangre para dicho estudio, esta muestra se destruirá.

EN QUE LE BENEFICIARÁ

La información obtenida de esta prueba puede ser útil al paciente que padezca hipofosfatasa y que aún no esté diagnosticado, tanto desde el punto de vista clínico como terapéutico, permitiendo en los casos en los que estuviese indicado, instaurar una terapia más específica y efectiva. También contribuirá a un mejor conocimiento de esta enfermedad y al consejo genético en los pacientes afectados y sus familiares. Como contrapartida, en los casos que no padezcan hipofosfatasa supone la molestia de realizar más extracciones sanguíneas y el riesgo de encontrar hallazgos inesperados.



Médico que informa

Paciente/Donante de la muestra D/Dª.....,
De.....años, con DNI....., y domicilio en.....,
calle....., núm.....

En el supuesto de menores o incapaces, nombre del representante legal (padres, tutor, etc.)
D./Dª.....
Relación con el Paciente/Donante.....DNI.....

Declaro estar informado de la finalidad de este estudio y haber comprendido la finalidad de los análisis que se van a realizar.

La donación de la muestra es gratuita e implica la renuncia a cualquier derecho de naturaleza económica, patrimonial o potestativa del donante sobre los resultados.

De acuerdo a la Ley 14/2007, recibo información, y se me advierte expresamente, sobre los siguientes aspectos:

- El estudio bioquímico para medir niveles de PLP se llevará a cabo en el Laboratorio Clínico del Hospital Infantil Universitario Niño Jesús de Madrid, la determinación de esclerostina se realizará en el laboratorio de investigación del IBS Granada y la secuenciación del gen *ALPL* en ADN de sangre periférica se realizará en el Centro de Diagnóstico Biomédico (CDB) del Hospital Clínic de Barcelona.
 - Si fuera necesaria la determinación de ALP, esta será realizada en el Laboratorio Clínico del Hospital Universitario Clínico San Cecilio.
 - Que las únicas personas que tendrán acceso a los resultados de los análisis serán los integrantes del equipo de investigación (Laboratorio Clínico del Hospital Universitario Clínico San Cecilio). Se me garantiza por tanto la confidencialidad de la información obtenida.
 - La posibilidad de descubrimientos inesperados en el proceso de análisis de la muestra, no relacionados con la patología de diagnóstico, y respecto a los mismos manifiestos:
- a) Querer conocerlos b) No querer conocerlos c) Delegar en el médico esta decisión.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- Cuando quiera
- Sin tener que dar explicaciones
- Sin que esto repercuta en el cuidado o atención sanitaria

Manifiesto que estoy satisfecho/a con la información recibida, que se me ha informado verbalmente del procedimiento de análisis bioquímico y/o genético al que el paciente/donante va a ser sometido, que he podido hacer las preguntas que he estimado conveniente y que comprendo el alcance del procedimiento, por lo que, en tales condiciones, otorgo libre y voluntariamente mi consentimiento.

En a de de 2021

Médico responsable

Paciente/Donante y/o representante legal

ANEXO 3: Consentimiento informado del CDB del Hospital Clínic de Barcelona

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA UTILIZACIÓN DE DATOS CLÍNICOS Y MATERIAL BIOLÓGICO DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN Y EXCEDENTE DEL PROCESO ASISTENCIAL PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN **ENFERMEDADES CONGÉNITAS DEL SISTEMA MÚSCULO-ESQUELÉTICO Y DE ENFERMEDADES METABÓLICAS** Y SU CONSERVACIÓN EN LA COLECCIÓN DE MUESTRAS **“ENFERMEDADES CONGÉNITAS DEL SISTEMA MÚSCULO-ESQUELÉTICO Y DE ENFERMEDADES METABÓLICAS”**



En el Hospital Clínic de Barcelona (HCB), además de la labor asistencial, se realiza investigación biomédica, que permite progresar en el conocimiento de la Medicina. En este sentido, las muestras biológicas obtenidas para el diagnóstico o control de las enfermedades, una vez utilizadas con esta finalidad, resultan también útiles y necesarias para la investigación.

De acuerdo con la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica, solicitamos su autorización para guardar y disponer de la información clínica y material biológico sobrante de las pruebas que se le han realizado o se le van a realizar en el **Servicio de Inmunología** del HCB, como parte del proceso asistencial normal y de **proyectos de investigación**. La finalidad es crear una colección de muestras biológicas que nos permita investigar las alteraciones moleculares o genéticas de las enfermedades **CONGÉNITAS DEL SISTEMA MÚSCULO-ESQUELÉTICO Y ENFERMEDADES METABÓLICAS**, con el objetivo de progresar en el conocimiento de la prevención, el diagnóstico, el pronóstico y/o el tratamiento de estas enfermedades. Si está de acuerdo, estos estudios genéticos podrían referirse a la secuenciación completa de su genoma.

El material biológico estará debidamente almacenado en el HCB hasta que se agote, integrado en la **Colección “Enfermedades congénitas del sistema músculo-esquelético y enfermedades metabólicas”**, registrada en el Biobanc del Hospital Clínic-IDIBAPS y en el Registro Nacional de Biobancos con la referencia R140414-153. Si hiciera falta alguna muestra adicional, el HCB se podría poner en contacto con usted para solicitarle nuevamente su colaboración.

Los proyectos, que previamente tendrán que ser aprobados por el Comité de Ética de Investigación Clínica del HCB (CEIC-HCB), serán realizados por investigadores en el servicio de Inmunología del HCB - IDIBAPS (Hospital Clínic de Barcelona – Institut d’Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer), integrantes de los equipos de investigación **Inmunogenética en la respuesta autoinflamatoria** y colaboradores.

Las muestras y los datos asociados, serán sometidos a un proceso de codificación. Los datos personales pasarán a formar parte del Fichero Investigaciones del que es responsable el HCB. Únicamente el personal autorizado del HCB podrá relacionar su identidad con los citados códigos. Se cumplirán en todo momento el deber de confidencialidad y las medidas de seguridad, de acuerdo con la legislación vigente en materia de protección de datos de carácter personal (Ley 15/1999). Aunque los resultados obtenidos de la investigación realizada con sus muestras se publiquen en ámbitos científicos, su identidad no será facilitada. Usted podrá ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición, así como obtener información acerca del uso de sus muestras dirigiéndose al responsable de la Colección que se indica a pie de página.

La donación de muestras biológicas que usted realiza a la Colección **“Enfermedades congénitas del sistema músculo-esquelético y enfermedades metabólicas”** es voluntaria, gratuita y altruista. Usted no obtendrá ningún beneficio económico directo por su participación en los estudios de investigación, ni tendrá derechos sobre posibles beneficios comerciales de los descubrimientos que puedan conseguirse como resultado de la investigación biomédica.

Su participación es totalmente voluntaria. Puede negarse a participar o retirar su consentimiento en cualquier momento sin tener que explicar los motivos y esto no repercutirá negativamente en su asistencia médica presente o futura. Si lo hace, sus muestras biológicas y los datos asociados a las mismas serán retirados de la colección, excepto los datos que se hubieran obtenido previamente a la cancelación. Si deseara anular su consentimiento, debería solicitarlo mediante el formulario para revocación que consta en la hoja de consentimiento, dirigiéndose a la Unidad de atención al cliente del HCB.

En el caso de que usted lo solicite expresamente, el responsable de la colección le proporcionará información acerca de cuáles son las investigaciones en las que se han utilizado sus muestras y los resultados de dichas investigaciones. Si se obtuviera información relevante que pudiera afectar a su salud o a la de su familia, el responsable de la colección contactará con usted para ofrecerle la posibilidad de conocer dicha información, así como para aconsejarle sobre la conveniencia de transmitir esta información a sus familiares en caso necesario. A efectos de un eventual contacto se utilizarán los datos que figuren en su historial clínico. No obstante, se respetará su derecho a que no se le comuniquen los resultados de la investigación.

Si tiene cualquier duda, ahora o en el futuro, en relación con este consentimiento, pregunte al personal sanitario que le ha proporcionado esta información o al responsable de colección que se indica a pie de página.

Muchas gracias por su colaboración.

Responsable de la Colección: **Eva González Roca**

Servicio de Inmunología. Escalera 4 Piso 0. Hospital Clínic. C/Villarroel 170, 08036 Barcelona

Tel.: **93 2275400 ext 4460**

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA UTILIZACIÓN DE DATOS CLÍNICOS Y MATERIAL BIOLÓGICO DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN Y EXCEDENTE DEL PROCESO ASISTENCIAL PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN ENFERMEDADES CONGÉNITAS DEL SISTEMA MÚSCULO-ESQUELÉTICO Y DE ENFERMEDADES METABÓLICAS Y SU CONSERVACIÓN EN LA COLECCIÓN



Nombre del paciente / NHC

Si ha comprendido la información que se le ha proporcionado, ha resuelto cualquier duda que pudiese tener y decide colaborar con el Hospital Clínic-IDIBAPS en los términos antes explicados, por favor, lea y firme a continuación esta hoja:

Confirmando que:

Autorizo a la Colección de **ENFERMEDADES CONGÉNITAS DEL SISTEMA MÚSCULO-ESQUELÉTICO Y DE ENFERMEDADES METABÓLICAS**, registrada en el Biobanc del HCB-IDIBAPS y en el Registro Nacional de Biobancos, a almacenar y utilizar científicamente tanto la información clínico-asistencial de su historial médico, como el material biológico sobrante de las pruebas que se le han realizado o se le van a realizar en el Servicio de Inmunología, con la finalidad de llevar a cabo proyectos de investigación biomédica relacionados con las enfermedades "Congénitas del sistema músculo-esquelético y enfermedades metabólicas" por investigadores en el grupo **Inmunogenética en la respuesta autoinflamatoria** y colaboradores del HCB/IDIBAPS, siempre que éstos cuenten con la obligada aprobación del Comité de Ética de Investigación Clínica competente. Esta autorización la concede tras haber leído la información adjunta sobre el consentimiento informado y tras haberlo comentado con el profesional sanitario responsable.

SI NO

Deseo que se me comunique la información derivada de la investigación que realmente sea relevante y aplicable para mi salud:

SI NO

Estoy de acuerdo en ser contactado en el caso de necesitar más información o muestras biológicas adicionales (mediante teléfono, dirección postal o E-mail de contacto que consta en la historia clínica):

SI NO

Autorizo el uso de estas muestras en proyectos que incluyan el estudio completo del genoma

SI NO

Llegada la mayoría de edad, el donante tiene derecho a revocación del consentimiento. En caso de que no la ejerza, se considerará que el actual documento de consentimiento informado sigue vigente.

Firma del paciente (si tiene más de 12 años)

Sr./Sra.....

DNI.....

Personal autorizado:

Sr./Sra.....

DNI.....

Firma del tutor o representante legal

Sr./Sra.....

DNI.....

En....., a..... de..... de.....

APARTADO PARA LA REVOCACIÓN de este consentimiento

El que suscribe (..... nombre y apellidos) revoca su consentimiento para guardar el material biológico en la **Colección de ENFERMEDADES CONGÉNITAS DEL SISTEMA MÚSCULO-ESQUELÉTICO Y DE ENFERMEDADES METABÓLICAS** y utilizarlo para investigación biomédica, según el derecho que le asiste y tal como estaba previsto en la información facilitada antes de la firma de dicho consentimiento, y solicita la eliminación de las muestras y la información asociada a las mismas.

Se adjunta:

- Fotocopia del DNI u otro documento válido que lo identifique
- Dirección a efectos de notificaciones

Fecha y firma

Juan Miguel Villa Suárez
Tesis Doctoral
Granada, 2021