

TESIS DOCTORAL

HIPOFOSFATEMIA PERSISTENTE EN ADULTOS:
CAUSAS GENÉTICAS Y ADQUIRIDAS

PhD THESIS

PERSISTENT HYPOPHOSPHATEMIA IN ADULTS:
GENETIC AND ACQUIRED CAUSES

AUTORA

NURIA PUENTE RUIZ

DIRECTORES

JOSE ANTONIO RIANCHO MORAL

MARIA DEL CARMEN VALERO DÍAZ DE LAMADRID

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

Escuela de **Doctorado** de la Universidad de Cantabria

Santander 2024

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

**PROGRAMA DE DOCTORADO DE MEDICINA Y CIENCIAS DE
LA SALUD**



TESIS DOCTORAL

**HIPOFOSFATEMIA PERSISTENTE EN ADULTOS:
CAUSAS GENÉTICAS Y ADQUIRIDAS**

Presentada por: **Nuria Puente Ruiz**
Tesis presentada para aspirar al grado de Doctor, realizada
bajo la dirección de los Profesores
Carmen Valero Díaz de Lamadrid y
José Antonio Riancho Moral

Santander, Noviembre 2023

*La vida es breve, el arte es largo, la oportunidad fugaz,
la experiencia engañosa y el juicio difícil.*

Hipócrates(s.V)

AGRADECIMIENTOS

Muchas son las personas que se han cruzado en el largo camino y solo puedo mostrar mi gratitud a cada una de ellas. De todos he aprendido muchas cosas, pero la más importante es a ser constante y a luchar por lo que uno quiere.

En primer lugar, quiero agradecer a José Antonio Riancho por toda la confianza puesta en mí, por tu dedicación incansable e insaciable, por enseñarnos una visión de la medicina que muy poca gente es capaz de transmitir, por ser guía y ejemplo en este largo y a veces arduo camino que es la vida. A Carmen Valero, por tu apoyo, enseñanza y disposición a lo largo de todos estos años, por ser capaz de transmitir tu fuerza infinita y ser estímulo cuando las fuerzas flaquean.

A todas las personas implicadas en el proyecto, a la Dra. García Unzueta gracias por toda tu colaboración y disposición siempre. A Ana Isabel Vega por ayudarme a entender un poco mejor el complejo mundo de la genética. También a todo el equipo de las consultas de Medicina Interna, en especial a Joan gracias por tú disposición desinteresada con cada una de las extracciones de los pacientes.

A todos los pacientes que desinteresadamente se han ofrecido para el estudio con el objetivo de que la ciencia y la medicina avance.

A Pauli, Cris, Laura, Raúl, Jorge, Jaime, Paula, Zaida, Iñigo, Alba, lo que comenzó como compañeros de residencia, se ha convertido en grandes amigos de viajes, de planes, de vida. Gracias por ayudarme a crecer a nivel profesional y personal, por acompañarme, y aprender a disfrutar del día a día. Nada de esto hubiera sido igual sin vosotros. A mis amigas “de toda la vida”, a mis compañeros de residencia y de despacho, también va por vosotros.

A mi familia, imprescindibles en este trayecto. Gracias, papá y mamá por vuestro esfuerzo y dedicación, por acompañarme siempre en cada paso y también por aguantar mis momentos de frustración. Maru y Leti por darme siempre vuestro apoyo, por allanarme el camino y hacer que seamos 3 en 1. Sois los culpables de que sea la persona que soy hoy. A Adri y Enzo, algún día entenderéis el “no molestéis a Nuri que está estudiando”. A Guillermo, por tu apoyo incondicional, amor y confianza en mí. Contigo sé que podemos conseguir todas las metas que nos propongamos en la vida.

INDICE

1.INTRODUCCIÓN	1
1.1 HOMEOSTASIS DEL FÓSFORO.....	3
1.2 REGULACIÓN ENDOCRINA DE LA HOMEOSTÁSIS DEL FÓSFORO ...	7
1.2.1 Calcitriol.....	8
1.2.2 Hormona paratiroidea o paratohormona	10
1.2.3 Factor de crecimiento fibroblástico 23.....	11
1.2.4 Otras hormonas implicadas en la regulación deFósforo	15
1.3 PAPEL DEL FÓSFORO EN LA ESTRUCTURA Y EL FUNCIONAMIENTO CELULAR.....	15
1.4 PAPEL DEL FÓSFORO EN LA MINERALIZACIÓN ÓSEA.....	16
1.4.1 Función del fósforo en la mineralización a través de vesículas de membrana	17
1.4.2 Función del fósforo en la apoptosis de condrocitos.....	18
1.4.3 Función del fósforo como regulador de la expresión de genes implicados en el metabolismo óseo	19
1.5 CAUSAS DE HIPOFOSFATEMIA	22
1.5.1 Hipofosfatemias agudas	23
1.5.2 Hipofosfatemias crónicas.....	25
1.6 MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE HIPOFOSFATEMIA CRÓNICA	30
1.6.1 Alteraciones esqueléticas	31
1.6.2 Déficits dentales	32
1.6.3 Complicaciones articulares	32
1.6.4 Sistema muscular	32
1.6.5 Alteraciones auditivas	33
1.6.6 Sistema nervioso central.....	33
1.6.7 Sistema cardiopulmonar	33
1.6.8 Alteraciones hematológicas	33
1.7 HIPOFOSFATEMIAS GENÉTICAS	33
1.7.1 Diagnóstico de hipofosfatemias genéticas	34
1.7.2 Raquitismo hipofosfatémico ligado al cromosoma X.....	35
1.7.3 Raquitismo hipofosfatémico de herencia autosómica dominante	37
1.7.4 Raquitismo hipofosfatémico herencia autosómica recesiva	38
1.7.5 Raquitismo dependiente de vitamina D.....	39

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	48
3. METODOLOGÍA	52
3.1 ESTUDIO RETROSPECTIVO.....	54
3.2 ESTUDIO PROSPECTIVO	56
3.2.1 Protocolo de actuación	57
3.2.2 Variables analizadas	58
3.2.3 Recogida de muestras	60
3.2.4 Métodos bioquímicos	61
3.2.5 Técnicas genéticas	67
3.2.6 Interpretación de resultados genéticos	67
3.2.7 Análisis estadístico	68
4. RESULTADOS	70
4.1 Variables clínicas	74
4.2 Variables bioquímicas	78
4.3 Estudio genético	86
4.4 Estudios de segregación familiar	91
4.5 Resultados globales de pacientes con hipofosfatemia crónica	95
5.DISCUSIÓN	99
5.1 Identificación de 13 nuevas variantes de genes relacionadas con metabolismo del fósforo.....	101
5.2 Causas secundarias de hipofosfatemia crónica	108
5.3 Interpretación de los niveles séricos de FGF-23	111
6. CONCLUSIONES	114
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119
8. ANEXOS	146
9. PUBLICACIONES	158

INDEX

1.INTRODUCTION.....	1
1.1 PHOSPHORUS HOMEOSTASIS	3
1.2 ENDOCRINE REGULATION OF PHOSPHORUS HOMEOSTASIS	7
1.2.1 Calcitriol.....	8
1.2.2 Parathyroid hormone.	10
1.2.3 Fibroblast growth factor 23	11
1.2.4 Other hormones involved in the regulation of Phosphorus	15
1.3 ROLE OF PHOSPHORUS IN CELLULAR STRUCTURE AND FUNCTIONING.....	15
1.4 ROLE OF PHOSPHORUS IN BONE MINERALIZATION	16
1.4.1 Role of phosphorus in mineralization through membrane vesicles... ..	17
1.4.2 Function of phosphorus in chondrocyte apoptosis	18
1.4.3 Phosphorus as a regulator of the expression of genes involved in bone metabolism	19
1.5 CAUSES OF HYPOPHOSPHATEMIA	22
1.5.1 Acute hypophosphatemias.....	23
1.5.2 Chronic hypophosphatemias	25
1.6 CLINICAL MANIFESTATIONS OF CHRONIC HYPOPHOSPHATEMIA .	30
1.6.1 Skeletal alterations	31
1.6.2 Dental deficiencies.....	32
1.6.3 Joint complications	32
1.6.4 Muscle problems.....	32
1.6.5 Hearing disorders	33
1.6.6 Central nervous system	33
1.6.7 Cardiopulmonary system	33
1.6.8 Hematological alterations.....	33
1.7 GENETIC HYPOPHOSPHATAMIAS	33
1.7.1 Diagnosis of genetic hypophosphatemias	34
1.7.2 X-linked hypophosphatemic rickets	35
1.7.3 Hypophosphatemic rickets of autosomal dominant inheritance	37
1.7.4 Hypophosphatemic rickets autosomal recessive inheritance	38
1.7.5 Vitamin D-dependent rickets	39

2. HYPOTHESIS AND OBJECTIVES.....	48
3. METHODOLOGY.....	52
3.1 RETROSPECTIVE STUDY.....	54
3.2 PROSPECTIVE STUDY	56
3.2.1 Pre-action protocol.....	57
3.2.2 Variables analyzed.....	58
3.2.3 Sample collection.....	60
3.2.4. Biochemical methods.....	61
3.2.5 Genetic techniques	67
3.2.6 Interpretation of genetic results	67
3.2.7 Statistical analysis	68
4. RESULTS.....	70
4.1 Clinical variables	74
4.2 Biochemical tests	78
4.3 Genetic tests.....	86
4.4 Family segregation studies	91
4.5 Global results of patients with chronic hypophosphatemia	95
5.DISCUSSION.....	99
5.1 Identification of 13 novel variants of genes related to phosphate metabolism	101
5.2 Causes of secondary chronic hypophosphatemia	108
5.3 Serum FGF-23 levels interpretation	111
6. CONCLUSIONS.....	114
7. REFERENCES	119
8. ANNEXES	146
9. PUBLICATIONS	158

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Prevalencia descrita en la literatura de distintas series de pacientes con hipofosfatemia según la población estudiada	23
Tabla 2.1.Diagnóstico diferencial de raquitismos hipofosfatémicos FGF-23 dependiente.....	43
Tabla 2.2.Diagnóstico diferencial de raquitismos hipofosfatémicos FGF-23 independiente.....	44
Tabla 2.3. Diagnóstico diferencial de trastornos asociados a raquitismo hipofosfatémico dependiente de FGF-23.....	45
Tabla 3. Diagnóstico diferencial de raquitismos hipocalcémicos	46
Table 4. Medical history of patients evaluated in the clinics	74
Table 5. Mean P levels (mg/dL) according to personal history.....	79
Table 6. Mean values and standard deviation (SD) of various biochemical parameters.....	80
Table 7. Values of 25 hydroxyvitamin D (ng/mL), 1,25 hydroxyvitamin D (pg/mL) and FGF23 ELISA (pg/mL), FGF23 LIAISON (pg/mL), and cFGF23 (pg/mL) of patients with normal levels of P and low levels at the study visit.....	81
Table 8. Correlation between P levels and different biochemical parameters ...	82
Table 9. Comparison among intact FGF23 ELISA, intact FGF23 LIAISON, and cFGF23 in patients with serum P \leq 2.3 mg/DL, serum P $>$ 2.3 mg/dL, and controls	83
Table 10. Index patients with genetic variants.....	89
Table 11: Biochemical parameters of patients with a positive genetic test, in comparison with those with a negative genetic study, and with the remaining patients studied	90
Table 12. Index patients and relatives with mutations.....	91
Table 13.Individuals with gene variants and family members studied.....	93
Table 14. Causes of secondary hypophosphatemia detected pre-assessment and post-assessment.....	96

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Adaptación de los mecanismos de absorción de fosfato a nivel intestinal en respuesta a la concentración de P (10).	5
Figura 2. Cotransportadores NaPilla y NaPillc en túbulo proximal.	6
Figura 3. Fisiología general de la homeostasis del fosfato con la implicación de FGF-23, calcitriol y PTH (2).....	8
Figura 4. Complejo FGF23-Klotho con receptor de FGF23.	12
Figura 5. Glicoproteína FGF23.....	12
Figura 6. Papel del Pi en la iniciación de la mineralización ósea en las vesículas de matriz	18
Figura 7. Pi extracelular actúa como inductor de transducción de señal en osteoblastos y condrocitos mediante la activación de la vía Raf/MEK/ERK para la regulación de la expresión génica.	21
Figura 8. Selección de pacientes seleccionados para la valoración clínica y analítica en consultas de Medicina Interna.....	57
Figure 9. Percentages of patients receiving drug therapy.....	75
Figure 10: Bar graph representing the number of patients with different types of treatments.....	76
Figure 11. Ligamentous hypermobility assessed using the Beighton scale.....	77
Figure 12. Serum FGF23 analysed with different methods in patients with hypophosphatemia at study visit, normal serum P at the study visit and in controls	84
Figure 13. Correlation analysis between P and TRP and between serum P levels and Tmp/GFR.....	85
Figure 14. Flow diagram of the 109 individuals examined	86
Figure 15. Pedigrees of patients with genetic variants.....	92

ABREVIATURAS

P – fósforo

PO_4^{3-} fosfato

ATP- adenosin trifosfato

HPO_4^{2-} fosfato de hidrogeno

H_2PO_4^- fosfato de dihidrógeno

Pi- fosfato inorgánico

PPi- pirofosfato inorgánico

PTH- hormona paratiroidea

PTHrp- hormona paratiroidea *related protein*

1,25(OH)2D – 1,25-dihidroxitamina D, 1,25-dihidroxicolecalciferol, calcitriol

1 α - 1 α -hidroxilasa

25 (OH)2D- 25 hidroxivitamina D, calcifediol

FGF23- factor de crecimiento fibroblástico 23.

sFRP-4- proteína 4 secretada relacionada con el frizzled

EGF- factor de crecimiento epidérmico

IGF-1- factor de crecimiento insulínico tipo 1

MEPE- fosfoglucoproteína extracelular de matriz

FGF7- factor de crecimiento fibroblástico 7.

Na – sodio

Ca- calcio

ROS - reactive oxygen species

CaSR- Receptor sensor de calcio

1. INTRODUCCIÓN

1.1 HOMEOSTASIS DEL FÓSFORO

El fósforo (P) es el elemento químico que, junto con cuatro átomos de oxígeno, en forma tetraédrica forma los complejos fosfato (PO_4^{3-}) (1). El fosfato es el anión más abundante en el cuerpo humano, y supone 1% del total del peso corporal. Hasta un 85% se encuentra en los huesos y los dientes en forma de hidroxiapatita cálcica y, un 14% en el espacio intracelular, formando parte del ATP, membranas fosfolipídicas y ácidos nucleicos. Solo el 1% del P corporal total se encuentra en el líquido extracelular. El 30% del P extracelular se encuentra en forma inorgánica (Pi) unido a proteínas, formando complejos junto a otros cationes o en forma libre como fosfato de hidrogeno (HPO_4^{2-}) o de dihidrógeno (H_2PO_4^-) (2).

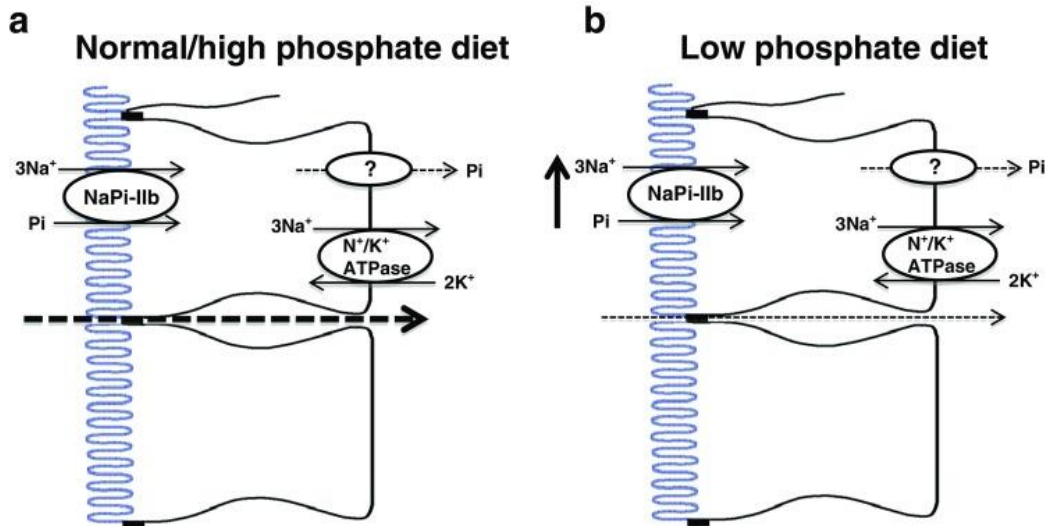
La concentración de fosfato sérico varía con la edad, los niveles son mayores en el periodo neonatal (5,8–7,4 mg/d), pero disminuyen rápidamente en los primeros meses de vida y posteriormente de manera más lenta hasta alcanzar los niveles de la infancia (4,5-5,6 mg/d). Las concentraciones se mantienen después relativamente constantes hasta la adolescencia, cuando los valores caen hasta llegar a los propios del adulto (2,5-4,5 mg/dL) (2,3).

El balance del P está determinado principalmente por procesos que regulan la eficiencia de la absorción intestinal y la reabsorción renal, con la implicación de la paratohormona (PTH), la 1α -hidroxilasa, la 1,25-dihidroxitamina D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}$), las fosfatoninas (FGF23, MEPE, FGF7) y la proteína 4 secretada relacionada con el frizzled (sFRP-4). También interfieren en la absorción de P el factor de crecimiento epidérmico (EGF), los glucocorticoides, los estrógenos o los estados de acidosis metabólica (2, 4-6).

El fosfato está presente en numerosos alimentos naturales de la dieta occidental, la cual aporta aproximadamente entre 1000 y 1600 mg/día (20 mg/kg/día) de fósforo. El 80% se absorbe en el intestino proximal, en el yeyuno principalmente, por dos mecanismos. En condiciones de ingesta normal o alta de fosfato, el gradiente luminal de fosfato favorece la vía paracelular, a través de un proceso de difusión no saturable que predomina sobre la transcelular (7,8,9,10). Sin embargo, en condiciones de restricción de P en la dieta, predomina la vía transcelular, gracias a la existencia en la membrana luminal de los enterocitos de unos cotransportadores de fosfato dependientes de sodio tipo II (NaPiIIb) codificados por el gen SCLC34A2. En situaciones de disminución de ingesta de P, la expresión de los cotransportadores NaPiIIb se ve aumentada, lo que proporciona un mecanismo protector frente al hueso (10,11). La regulación de P a nivel de este cotransportador está estimulada por la 1,25(OH)₂D y limitada por cationes como el calcio, magnesio o aluminio (2).

Los cotransportadores NaPiIIb representan el 90% del transporte transcelular del P. Recientemente se ha descrito la presencia de proteínas SLC20 en la membrana del borde en cepillo de los enterocitos, que actúan como cotransportadores dependientes de sodio (NaPiIII: Pit-1 y Pit-2) por un mecanismo fisiológico poco conocido (10,12).

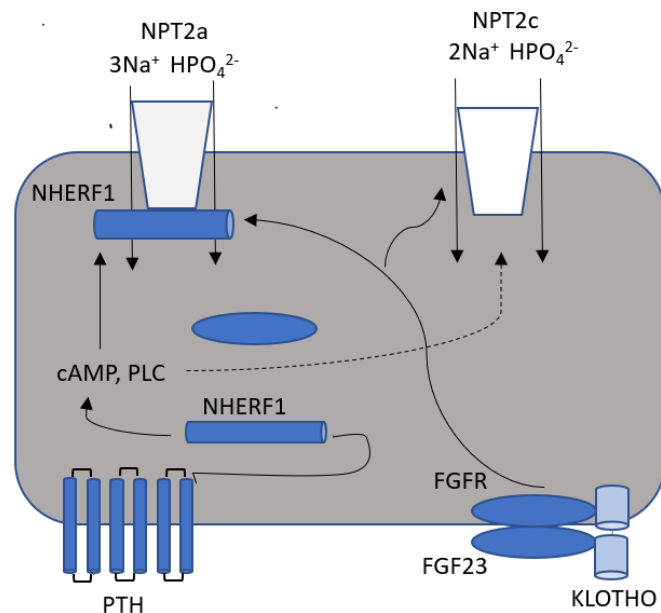
Figura 1. Adaptación de los mecanismos de absorción de fosfato a nivel intestinal en respuesta a la concentración de P (10).



La excreción de P depende de la filtración glomerular y de la mayor o menor reabsorción tubular. El 80% de la reabsorción del Pi se produce a nivel del túbulo proximal, gracias a dos cotransportadores fosfato-sodio dependiente, el NaPiIIa y el NaPiIIc, cuya expresión viene codificada por los genes SLC34A1 y SLC34A3, respectivamente. Se ha demostrado que NaPiIIa se localiza en todo el túbulo proximal (2). En concreto, NaPiIIa y NaPiIIc se localizan en la membrana luminal de la célula. Los pasos limitantes de la reabsorción de P son la funcionalidad de estos cotransportadores sodio-fosfato dependientes y el gradiente de Na (mantenido a través de la membrana luminal por la bomba intercambiadora de Na dependiente de ATP situada en la membrana basolateral). El manejo renal del fosfato está regulado por una variedad de factores hormonales y no hormonales a lo largo del túbulo contorneado proximal del riñón: PTH, calcio, $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, bicarbonato, reabsorción de sodio, hipercapnia, hipocapnia, dopamina o serotonina. Los principales reguladores de

la expresión de NaPiIIa y NaPiIIc son la PTH, el FGF23 y el fosfato de la dieta (13,14). La expresión de NaPiIIa en la membrana apical se reduce en respuesta al estímulo de la PTH en cuestión de minutos y, en respuesta al fosfato de la dieta al cabo de 2 horas, gracias a mecanismos moleculares de endocitosis y exocitosis (2). También se han descrito la presencia de otros transportadores de fosfato tipo III (NaPiIII: proteína PiT2, de la familia SLC20) capaces de mantener algo de reabsorción de fosfato. Se han localizado en la membrana luminal de la célula tubular proximal y están regulados por la cantidad de fosfato de la dieta y del pH, aunque estas adaptaciones se producen de una forma más lenta que en los transportadores tipo II (2).

Figura 2. Cotransportadores NaPiIIa y NaPiIIc en túbulo proximal.



Los cambios en la absorción intestinal de fosfato pueden afectar al manejo renal del fosfato, indirectamente a través de alteraciones en la concentración sérica de fosfato, o también a través de la posible producción de péptidos circulantes derivados del intestino, o por FGF23 u otras fosfatoninas (15). El

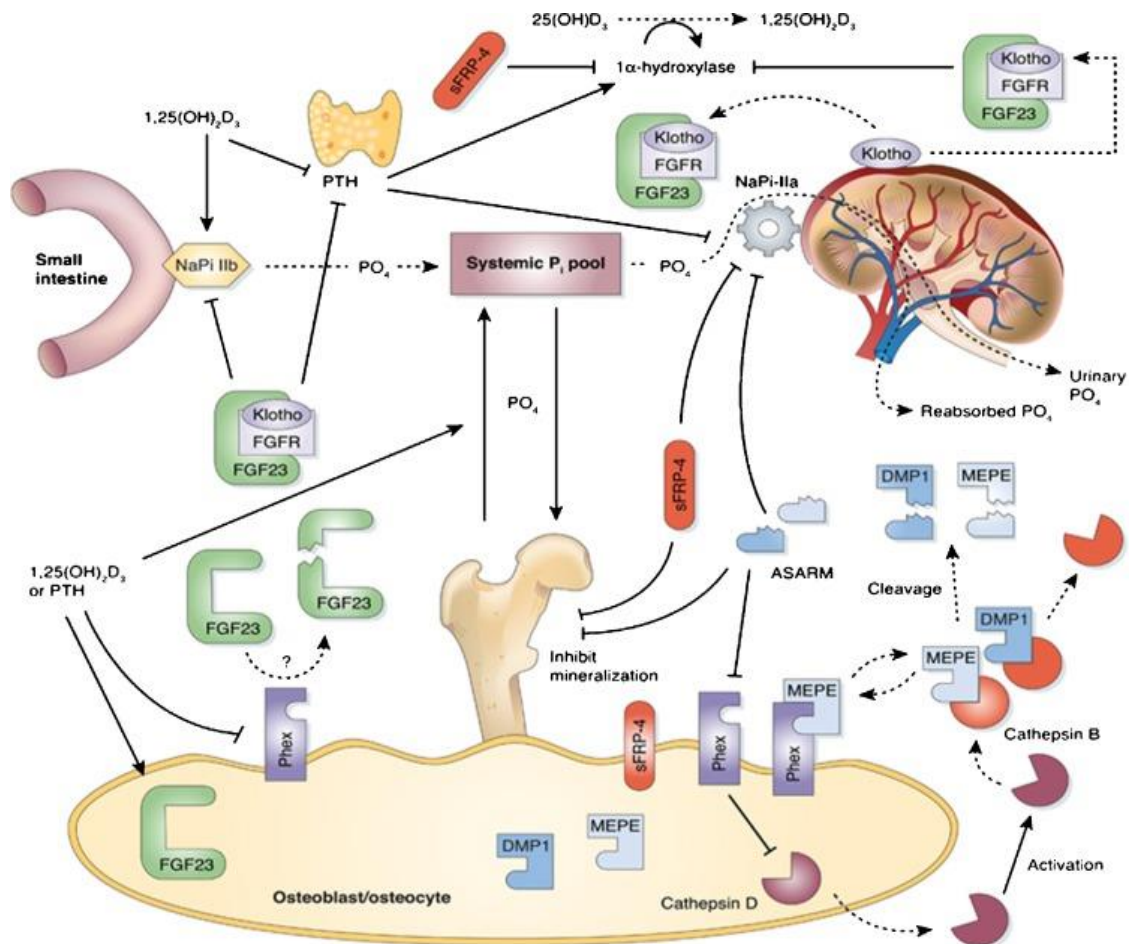
fosfato tiene una baja afinidad por el NaPiIIb, de hecho, se ha visto que humanos portadores de una mutación inactivadora de NaPiIIb no desarrollan hipofosfatemia. Esto es debido a que la inactivación de NaPiIIb produce un aumento de la expresión de NaPiIIa en el túbulo renal proximal, con el aumento de la absorción de Pi y el mantenimiento en rango de normalidad de los niveles de P sérico (2).

1.2 REGULACIÓN ENDOCRINA DE LA HOMEOSTÁSIS DEL FÓSFORO

Los niveles de fosfato sérico están regulados por bucles de retroalimentación negativa (16, 17). Las interacciones entre FGF23, calcitriol y PTH son bastante complejas. El FGF23 suprime la producción de calcitriol y PTH; el calcitriol estimula el FGF23 y suprime la PTH y, por último, la PTH estimula producción de calcitriol. No está del todo claro si la PTH estimula directamente la producción de FGF23 o si, lo que parece más probable, lo hace indirectamente por el aumento de la producción de calcitriol.

La 1,25(OH)₂D o calcitriol es hiperfosfatémica. La PTH y el FGF23 son hipofosfatémicas, parece que el efecto de la PTH es inmediato, mientras que el del FGF23 requiere más tiempo, probablemente varias horas. Además, el fosfato sérico puede regular la producción de PTH, 1,25(OH)₂D y FGF23.

Figura 3. Fisiología general de la homeostasis del fósforo con la implicación de FGF-23, calcitriol y PTH (2).



1.2.1 Calcitriol

El calcitriol o 1-alfa,25-dihidroxicolecalciferol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}$) es la forma biológicamente activa de la vitamina D. La síntesis de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ es llevada a cabo de manera endógena en el riñón a partir de su precursor calcifediol o $25(\text{OH})_2\text{D}$ y gracias a la acción de la 1α -hidroxilasa renal. La vitamina D es soluble en grasas y se puede sintetizar en la piel por la transformación del colesterol o del ergosterol con la exposición de la radiación ultravioleta, o bien obtenerse en menores cantidades a través de ciertos alimentos (leche, pescado, huevo) (18).

La 1,25(OH)₂D es regulada por el fosfato sérico, de manera que una disminución en la concentración de este último lleva a un aumento en la síntesis de la hormona. A su vez, la 1,25(OH)₂D de forma directa aumenta la absorción intestinal de P ingerido con la dieta, mediante la regulación de la expresión del cotransportador NaPiIIb. La PTH es uno de los principales estimuladores de la producción de 1,25(OH)₂D: a la inversa, cuando la 1,25(OH)₂D aumenta se suprime la secreción de PTH, con el consiguiente aumento de la reabsorción tubular de P y también la inhibición de la resorción ósea (2).

A nivel celular, la 1,25(OH)₂D se une al receptor de vitamina D (VDR) y regula la expresión de VDR y de muchos genes diana. VDR es un receptor nuclear que actúa como regulador transcripcional, modulando la expresión de más de 900 genes. Entre ellos, genes involucrados en procesos biológicos esenciales, incluyendo metabolismo del calcio y del fosfato, ciclo celular, desarrollo de órganos e inmunidad. Por lo tanto, la deficiencia de 1,25(OH)₂D puede estar implicada en el desarrollo del cáncer, la inmunidad y las enfermedades infecciosas, aunque la relevancia real de la vitamina D en esos procesos es una cuestión debatida (19). La 1,25(OH)₂D induce la expresión de FGF23 en osteoblastos y osteocitos, a través de la unión a VDR y la activación del receptor nuclear retinoide X, lo que conduce a un aumento de la expresión de FGF23 en las células óseas (2,20). Los efectos opuestos de la PTH y la vitamina D en el riñón y el intestino, asociados a la regulación por parte del FGF23, equilibran los niveles de fosfato y conservan la homeostasis fosfocálcica (2).

1.2.2 Hormona paratiroidea o paratohormona

La hormona paratiroidea o paratohormona es una cadena polipeptídica de 84 aminoácidos, con un fragmento esencial, que comprende los aminoácidos 1-27 para su unión al receptor de la PTH. La función principal de la PTH es regular la homeostasis del calcio. En situaciones de hipocalcemia, se produce un aumento de secreción de PTH en las glándulas paratiroideas y un aumento de la reabsorción de Ca a nivel renal, gracias a la presencia de unos sensores, como el receptor sensor del calcio (CaSR) expresados en ambos órganos (21). Recientemente, se ha demostrado que el fosfato podría tener un efecto inhibitorio sobre el CaSR independiente del calcio, produciéndose un aumento de la secreción de PTH en situaciones de hiperfosfatemia (19).

A nivel renal, la PTH aumenta la actividad de 1α -hidroxilasa en las células del túbulo proximal, lo que conduce a un incremento del $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, que estimula la absorción de P a nivel de intestino delgado. Además, la PTH aumenta la absorción de Ca en el túbulo contorneado distal (22). La PTH también produce una disminución de la expresión de NaPiIIa y NaPiIIc en la membrana luminal del túbulo proximal, con una menor reabsorción de P, por lo que en condiciones de niveles permanentemente elevados de PTH los niveles de P sérico disminuyen, lo que contribuye a la patogenia de enfermedades como el raquitismo o la osteomalacia (2,23).

A nivel óseo, la liberación continua de PTH incrementa la liberación de Ca en el líquido extracelular por la activación de los osteoclastos que favorecen la resorción ósea (2).

1.2.3 Factor de crecimiento fibroblástico 23

Las fosfatoninas (FGF23, FGF7, sFRP-4 y MEPE) son un grupo de proteínas que intervienen en la homeostasis del fosfato. El Factor de Crecimiento Fibroblástico 23 (FGF23) es una hormona fosfatúrica predominantemente secretada por osteocitos y, en menor medida por osteoblastos en condiciones fisiológicas, que regula el metabolismo del fosfato y de la vitamina D al unirse al complejo Klotho – receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR) (16,24). También se ha visto que, en ciertas condiciones no fisiológicas, el FGF23 puede ser secretado por cardiomiocitos y por células inmunitarias (células dendríticas y macrófagos) (25).

Los receptores de FGF23 están presentes en muchos tejidos, pero la activación de la señalización se ha detectado en un número muy restringido de ellos: los túbulos contorneados distales, las glándulas paratiroides y el cerebro (el epitelio del plexo coroideo) (26). Esto es debido a que es necesaria la presencia del cofactor esencial Klotho, altamente expresado en riñón y, en menor medida, en glándulas paratiroides y cerebro, para incrementar la afinidad del FGF23 por su receptor (FGFR). Se trata de un correceptor obligado del FGFR, tal es así que en algunos estudios en animales se han demostrado que defectos en Klotho tienen el mismo efecto que si el animal fuera deficiente en FGF23 (27).

El FGF23 es una glicoproteína compuesta por 251 aminoácidos. De ellos, los 24 del extremo N-terminal son un péptido señal y 227 aminoácidos constituyen la forma activa segregada o intacta (iFGF23) (28).

Figura 4. Complejo FGF23-Klotho con receptor de FGF23.

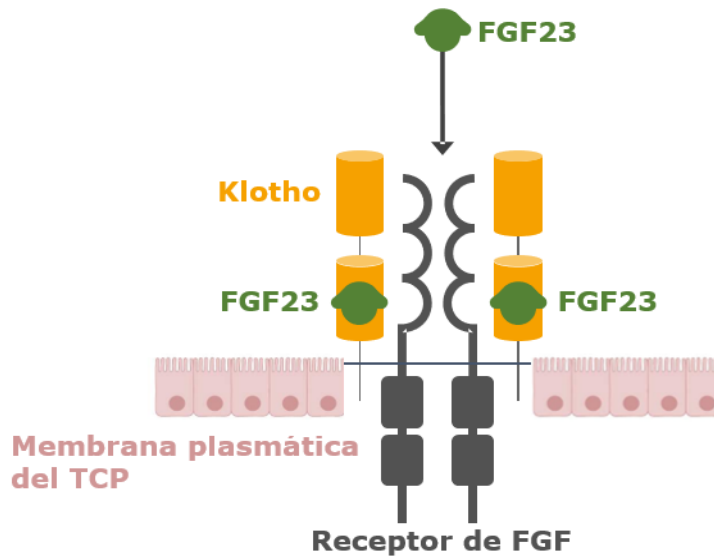
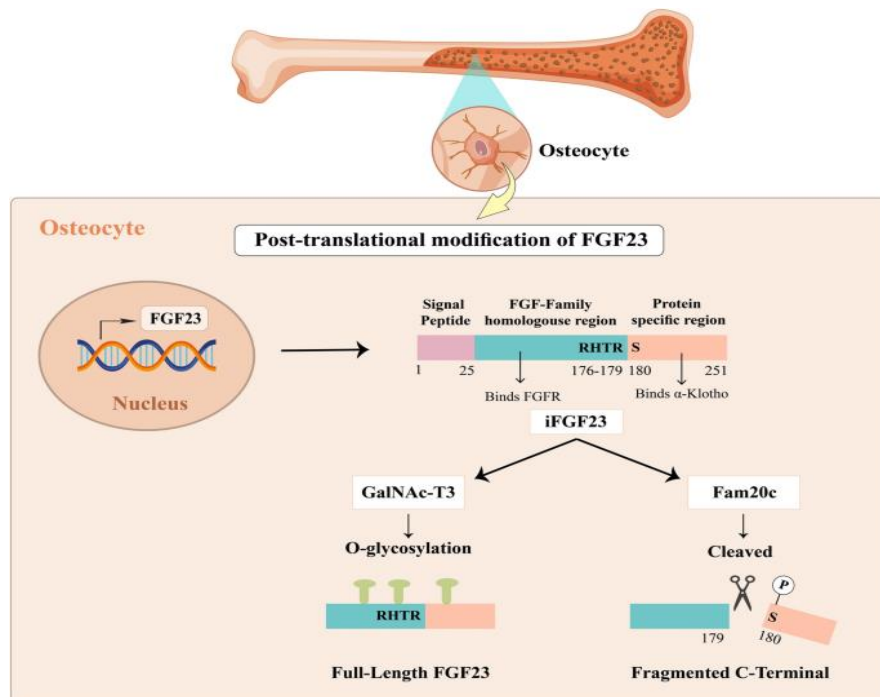


Figura 5. Glicoproteína FGF23. Una parte de las moléculas se escinden entre Arg179 -Ser180 en fragmentos N-terminal y C-terminal inactivos, durante el proceso de secreción. Dos enzimas de los osteocitos determinan el destino de FGF23. GalNAC-T3 desempeña un papel protector e inhibe la rápida degradación de FGF23, mientras que FAM20C favorece la escisión. *FGF23*: fibroblast growth factor 23, *iFGF23*: intact FGF23, *GalNAC-T3*; N-acetylgalactosaminyltransferase-3, *FAM20C*; Family with sequence similarity 20, member C (25).



La expresión de FGF23 está regulada predominantemente por el fosfato y el calcitriol. Otros mediadores moleculares que se han asociado con la expresión de FGF23 incluyen FAM20C, ENPP, y DMP1, así como la presencia de péptidos ASARM (acidic serine aspartate-rich motif). Recientemente, se han añadido a la lista de posibles factores reguladores de la expresión del FGF23: reorganización del citoesqueleto de actina, la señalización de NFκB, la aldosterona, cambios en las concentraciones de calcio, deficiencia de hierro, sistema de renina-angiotensina activado, Klotho y la conversión osteoblástica local de 25(OH)₂D a calcitriol (24,25).

Los niveles plasmáticos de FGF23 siguen un ritmo circadiano, cuya variación diurna se debe a la alimentación y al nivel sérico de Pi, aunque los mecanismos no son del todo conocidos, por lo que no se puede decir con certeza que la síntesis y la secreción de FGF23 en el hueso se vea afectada por el eje hipotálamo-hipófisis, al igual que ocurre en otros tejidos endocrinos (25, 29).

Los mecanismos exactos que regulan la secreción de FGF23 por los osteocitos y los efectos del FGF23 a nivel del hueso no se conocen por completo, aunque parece que el FGF23 regula directamente la diferenciación de los osteoblastos. Se sabe que las proteínas requeridas para la mineralización (osteocalcina, sialoproteína ósea, vitronectina y proteína de matriz de dentina 1 (DMP-1)) están en equilibrio dinámico con los péptidos inhibidores de la mineralización ASARM. Algunos estudios realizados in vitro muestran que la fosfogluco proteína extracelular de matriz (MEPE) se encuentra secuestrada por PHEX, que es una metaloproteínasa zinc M13 unida a membrana codificada por el gen PHEX. MEPE libre es vulnerable a la escisión por proteasas de la matriz extracelular como la catepsina B. La escisión de MEPE daría como resultado la

liberación de ASARM, con la alteración sobre la expresión de FGF23 por mecanismos poco conocidos (24,25).

A nivel renal, el FGF23 aumenta la excreción de fosfato, mediante la reducción de la expresión de los cotransportadores NaPiIIa y NaPiIIc en el túbulo proximal. Al igual que el sFRP4, el FGF23 disminuye los niveles circulantes de 1,25(OH)₂D, ya que ejerce un efecto inhibitorio sobre la 1 α -hidroxilasa y aumenta la expresión de la 24-hidroxilasa (encargada de degradar 1,25(OH)₂D en sus metabolitos inactivos) (30,31). Por tanto, a nivel intestinal a niveles más altos de FGF23, disminuye la absorción de fosfato, en relación con la reducción de la producción de 1,25(OH)₂D. Por otro lado, la restricción de fosfato en la dieta resultará en una disminución de los niveles sanguíneos de FGF23 por un mecanismo desconocido, aunque se ha propuesto la implicación de la producción de ROS (reactive oxygen species) inducidos por nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) y la vía de las quinasas reguladas por señales extracelulares de la proteína quinasa activada por mitógeno (MEK-ERK) (24,25).

En la glándula paratiroides, el FGF23 reduce los niveles séricos de la PTH al actuar sobre el complejo receptor y disminuir la expresión del gen PTH a través de la activación de la vía MAPK (2). Además, entre sus otras funciones, el FGF23 protege a las células de los niveles de altos de P que producen muerte celular (apoptosis) y daño vascular (2,25).

1.2.4 Otras hormonas implicadas en la regulación del P

La insulina y las hormonas tiroideas aumentan la reabsorción del fosfato en el túbulo proximal al estimular el cotransportador Na-Pi de la membrana del borde en cepillo. Además, la insulina impide la acción fosfatúrica de la PTH (2, 32). La hormona del crecimiento también estimula el co-transporte Na-Pi del túbulo proximal, un efecto parcialmente mediado por el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1) (2). A su vez, la insulina y los IGF-1 son conocidos como reguladores negativos en la expresión y síntesis de FGF23 (25). La calcitonina y los glucocorticoides inhiben la reabsorción de P a nivel de la membrana en cepillo del túbulo proximal (2).

1.3 PAPEL DEL FÓSFORO EN LA ESTRUCTURA Y EL FUNCIONAMIENTO CELULAR

El fosfato es esencial en mantener la estructura de la célula y está implicado en múltiples funciones celulares. El fosfato, unido a otras moléculas mediante un enlace fosfodiéster, forma la bicapa fosfolipídica de las membranas plasmáticas, contribuyendo a mantener la integridad, flexibilidad y fuerza de la pared celular (33). El fosfato proporciona soporte estructural a la doble hélice de ADN. Cada hélice de ADN está formada por un esqueleto de una desoxirribosa y un grupo fosfato unidos a una de las bases nitrogenadas (adenina, citosina, guanina o timina). El fosfato tiene una función doble: proporciona gran estabilidad a los enlaces covalentes de la unión a los nucleótidos adyacentes y, además, la molécula de ATP empleada en la síntesis de ADN proviene de la propia molécula de fosfato que forma parte del esqueleto de la hélice de ADN

(34). Cerca del 20% del fosfato intracelular se encuentra en la mitocondria, donde está implicado en importantes funciones celulares, como la fosforilación oxidativa, crítica para la formación de ATP. Un 30% es almacenado en el retículo endoplásmico y está implicado en la fosforilación de muchas proteínas, para las que la adición de un grupo fosfato suele ser un sistema de activación. El resto del fosfato intracelular se encuentra distribuido en aparato de Golgi, lisosomas y núcleo (35). El exceso de fosfato inorgánico se ha relacionado con procesos de envejecimiento celular. En condiciones de hiperfosfatemia, se produce un aumento de producción de ROS a nivel de la mitocondria y alteraciones en la permeabilidad de la membrana interna mitocondrial, permitiendo el paso no selectivo de solutos pequeños, con la consecuente alteración de la funcionalidad mitocondrial (36).

1.4 PAPEL DEL FÓSFORO EN LA MINERALIZACIÓN ÓSEA

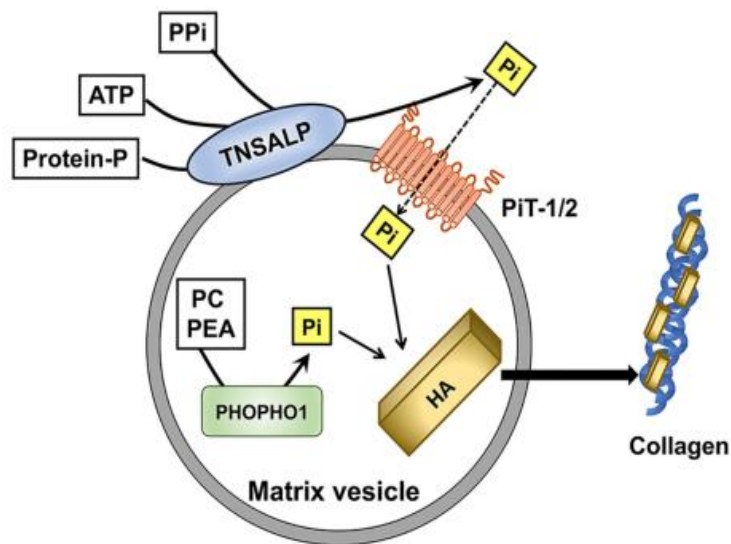
La tasa de remodelación ósea influye en la concentración de fósforo plasmático; el aumento de la resorción ósea conduce a un aumento de P plasmático, mientras que un aumento en la mineralización disminuye los niveles de P plasmático (2). A la inversa, mantener el equilibrio fisiológico del fosfato es crucial para los osteoblastos y osteocitos en el proceso de la mineralización ósea. El fosfato inorgánico es un componente esencial en la formación de hidroxiapatita cálcica, que es el principal componente de la fase mineral de la matriz ósea (2, 37).

1.4.1 Función del fósforo en la mineralización a través de vesículas de membrana

En el proceso de mineralización esquelética están implicadas unas vesículas de matriz de unos 50 a 200nm, procedentes de la membrana plasmática de osteoblastos y condrocitos a través de un proceso de gemación, que sirven como depósito inicial de los iones de calcio y P para formar cristales de hidroxiapatita. Las señales para la liberación de estas vesículas no se conocen por completo. Las vesículas con la hidroxiapatita se unen a las fibrillas de colágeno para mineralizar la matriz extracelular (38, 39). Las vesículas de matriz son ricas en fosfolípidos, especialmente en fosfatidilserina, que tiene gran afinidad por el calcio. Las vesículas de matriz también contienen anexinas, bombas de Ca ATP-dependientes y calbindina D9K, encargadas de la captación y del transporte intracelular del Ca; además de anhidrasa carbónica, colágeno X y fosfatasas (39,40). Las vesículas de la matriz tienen una alta actividad de la fosfatasa alcalina no específica de tejido (TNSALP), con una unidad catalítica orientada hacia el exterior, encargada de liberar Pi mediante hidrólisis a partir de esteres fosfóricos (β -glicerofosfato), lo que facilita la mineralización. En situaciones de hipofosfatemia, la actividad de la fosfatasa alcalina ósea se eleva con el fin de aportar fosfato a los osteoblastos. Una vez que se proporcionan cantidades adecuadas de fosfato, la actividad de la enzima disminuye. Por tanto, los niveles altos de P actúan como un inhibidor de la formación de hidroxiapatita (2,26,38,39). Se han descrito mutaciones inactivantes en TNSALP que están asociadas a hipofosfatasa y produce alteraciones en la mineralización ósea (41). El P liberado es transportado al interior celular a través un transportador sodio-fosfato dependiente (NaPiIII), mediado por dos moléculas PiT-1 y PiT-2. El

suministro suficiente de Pi es crítico en la mineralización ósea, más que la propia expresión de cada transportador. En estudios realizados en ratones con mutación en PiT-1, se ha visto que la mineralización esquelética era normal, probablemente por un efecto compensador de PiT-2 (42). También se ha identificado otra fosfatasa en el interior de las vesículas de matriz, denominada PHOSPHO1 y que está implicada en la mineralización mediante la producción de P a través de la hidroxilación de fosfocolina y fosfoetanolamina (43,44).

Figura 6. Papel del Pi en la iniciación de la mineralización ósea en las vesículas de matriz. TNSALP hidroliza el PPI, el ATP y la proteína transportadora de P para liberar al Pi que entra en la vesícula a través de los cotransportadores NAPIII, PiT-1 y PiT-2. PHOSHO1 también produce Pi a través de la fosfocolina y la fosfoetanolamina. *TNSALP: fosfatasa alcalina no específica de tejido. PPI: pirofosfato inorgánico. ATP: adenosina trifosfato. PC: fosfocolina. PEA: fosfoetanolamina. HA: hidroxiapatita.*



1.4.2 Función del fósforo en la apoptosis de condrocitos

El P también ejerce efectos de una forma directa sobre las células cartilagosas. En situaciones de hiperfosfatemia, el exceso de P induce la apoptosis de los condrocitos diferenciados terminalmente, lo cual supone un proceso crítico en la osificación endocondral (39,45-46).

Por el contrario, la hipofosfatemia prolongada disminuye la apoptosis de los condrocitos hipertróficos en las placas de crecimiento, produciendo raquitismo, y también disminuye la mineralización del hueso preexistente provocando osteomalacia, si el proceso ocurre en un adulto una vez finalizado el periodo de crecimiento (46-47).

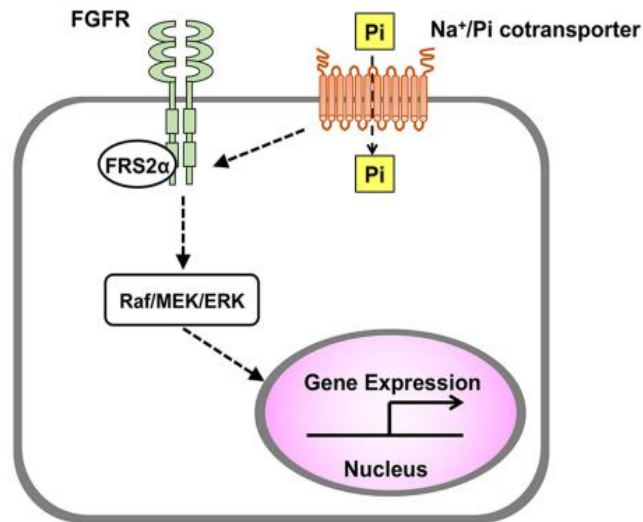
1.4.3 Función del fósforo como regulador de la expresión de genes implicados en el metabolismo óseo

El P extracelular también regula la expresión génica, al actuar como una molécula de señalización. Se han identificado varios genes sensibles a la alteración de P extracelular. El gen de la osteopontina (Opn) fue el primero en el que se demostró que el P extracelular induce la expresión génica en experimentos con la línea celular osteoblástica murina MC3T3-E1 (39,48). Otros genes identificados posteriormente regulados por P son el gen relacionado con el ciclo celular ciclina D1 y el Dmp1. Dmp1 se expresa abundantemente en los osteocitos y un aumento de P extracelular puede facilitar la diferenciación de células osteoblásticas a osteocitos. El aumento del P extracelular induce la activación de la vía Raf/MEK/ERK (*Rapidly Accelerated Fibrosarcoma* / Mitogen-activated protein kinase kinase/Extracellular-Signal-Regulated Kinase), que promueve la diferenciación osteoblástica y la formación ósea (49). La activación de la vía Raf/MEK/ERK mediada por el P, induce la regulación de varios genes, incluidos Opn, Dmp1 y Mgp en células osteoblásticas, y Mgp, ciclina D1 y Alpl en condrocitos. También se produce la activación de esta vía en células derivadas de tejidos extraesqueléticos, como las células HEK293, una línea celular proveniente de células de riñón de embrión humano (39,49). Un aumento del P extracelular induce la activación de FGFR, que es una de las señales de

activación de la vía de la cascada Raf/MEK/ERK. El FGFR parece tener un papel fundamental en la transducción de la señalización evocada por un aumento extracelular de P.

Los datos de un modelo de ratones deficientes del gen Phex denominados ratones Hyp, sugieren que una cierta “insensibilidad” de las células de la línea osteoblástica podría ser la base de la sobreproducción del FGF23 en la hipofosfatemia genética ligada al X (XLH) (50). Los receptores de FGF y los cotransportadores NA/Pi pueden estar implicados. En ensayos en células osteoblásticas, se ha visto que un inhibidor del FGFR y un inhibidor de MEK abolieron la regulación positiva de Dmp1 producida por un aumento del P extracelular. También se ha visto en células HEK293 que, la eliminación de FGFR1 disminuyó la fosforilación de ERK inducida por un aumento extracelular de P. Además, diversos estudios han demostrado la posible implicación de PiT-1, que codifica los cotransportadores Na/Pi, como otro mediador de la transducción de señales inducida por P (39,51).

Figura 7. P extracelular actúa como inductor de transducción de señal en osteoblastos y condrocitos mediante la activación de la vía Raf/MEK/ERK para la regulación de la expresión génica. Implicación del cotransportador Na/Pi y FGFR (39).



El P extracelular también regula el metabolismo del pirofosfato (PPi). Niveles de P extracelular elevado, inducen la expresión de dos genes Enpp1 y Ank encargados de codificar inhibidores de la mineralización. Enpp1 es un gen que codifica una enzima encargada de producir PPi, y Ank codifica un transportador de PPi. También se ha observado que, ante niveles de P extracelular elevados, existe una expresión disminuida de los genes Sost y Dkk1 que codifican sendas moléculas inhibitoras de la formación ósea (52,53).

Los efectos del P extracelular sobre la expresión de FGF23 en osteoblastos no son del todo conocidos. En un estudio realizado en humanos, tras la ingesta alta de fósforo los niveles de FGF23 se elevaron transitoriamente a las 4 semanas, pero posteriormente a las 8 semanas se normalizaron (39,40).

El P extracelular no solo induce modulación en la expresión génica de osteoblastos y osteocitos, sino que también influye sobre el patrón

transcripcional de los condrocitos. Los efectos del P sobre estas células difieren según su estado de diferenciación. En los condroblastos, un aumento del P extracelular induce la expresión de ciclina D1, para facilitar la proliferación, y disminuye la expresión de Alpl, que codifica TNSALP, disminuyendo así la liberación de P. En condrocitos maduros, las concentraciones elevadas de P inducen la expresión del gen Col10a1, que codifica el colágeno tipo X, y del gen Mgp1, que codifica una proteína de la matriz Gla, cuyo producto (Mgp) inhibe la mineralización (37,52-54).

1.5 CAUSAS DE HIPOFOSFATEMIA

Teniendo en cuenta los principales elementos de la homeostasis del P, las causas de hipofosfatemia pueden deberse fundamentalmente a 3 mecanismos fisiopatológicos: redistribución del P al espacio intracelular, aumento de las pérdidas renales de P, o disminución de la absorción intestinal de P. A su vez, según la velocidad de instauración se pueden clasificar en hipofosfatemias agudas o hipofosfatemias crónicas, con diferentes mecanismos etiopatogénicos implicados. La mayoría de las hipofosfatemias crónicas se deben a causas adquiridas o secundarias, pero también pueden ser de origen genético (55-57).

La prevalencia de la hipofosfatemia es muy variable en función de la población estudiada, desde un 0,2% a un 2,2% en los pacientes ingresados, pero puede elevarse a 50% en pacientes en Unidades de Cuidados Intensivos (35,58,59).

Tabla 1: Prevalencia descrita en la literatura de distintas series de pacientes con hipofosfatemia según la población estudiada (Tabla modificada 35,58-73).

Población estudiada	Prevalencia
Ingresados por diversas causas (59,60,62)	2,2% (P<0,64 mmol/l) 3,1% (P<0,70 mmol/l) 0,2% (P<0,32 mmol/l)
Alcohol (61) <ul style="list-style-type: none"> • Varones ingresados para deshabitación • Varones alcohólicos atendidos en Urgencias 	2,5% (P<0,80 mmol/l) 30,4% (P<0,80 mmol/l)
Politraumatizados (63)	75% (P<0,80mmol/l)
Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (67)	21,5 (P<0,80mmol/l)
Pacientes quirúrgicos en UCI (64)	28,8% (P<0,80mmol/l)
Pacientes en UCI (68)	33,9% (P<0,65mmol/l)
Infecciones (65) <ul style="list-style-type: none"> • Infección • Sepsis 	65% (P<0,80mmol/l) 80% (P<0,80mmol/l)
Lobectomía hepática (66)	100% (P < 0.48 mmol/l)
Ferrotterapia con carboximaltosa (69) <ul style="list-style-type: none"> • Patología ginecológica • Patología gastrointestinal • Patología neurológica 	30,1% (P< 0,65mmol/l) 51% (P< 0,65mmol/l) 55,6% (P< 0,65mmol/l)
Cirugía cardíaca (70)	34% (P< 0.48 mmol/l)
Enfermedad renal crónica estadio 3-5 (71)	2,8% (P<0,81mmol/l)
Hemofiltración continua (72)	30.3%(P<0,81mmol/l)
Tratamiento diurético con furosemida en pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva (NYHA III-IV) (73)	12,8% (P<0,81mmol/l)

1.5.1 Hipofosfatemias agudas

El mecanismo etiológico más frecuente de las hipofosfatemias es un fenómeno de redistribución de P al espacio intracelular. El P presente en el líquido extracelular en situaciones de glucólisis, es utilizado para la fosforilación de moléculas en el hígado y en el músculo, con la consiguiente disminución de los niveles séricos de P.

La prevalencia de hipofosfatemia aguda en las Unidades de Cuidados Intensivos varía desde el 30 al 50% (74).

Algunas de las causas más comunes de hipofosfatemia aguda son:

- Alcalosis respiratoria aguda: con el aumento del pH intracelular por la difusión del dióxido de carbono a través de las membranas celulares, se estimula la actividad de la fosfofructoquinasa, que estimula la glucólisis (75, 76).
- Corrección de cetoacidosis diabética: por la administración de insulina, con estímulo de la glucólisis (77,78).
- Trastorno por consumo agudo de alcohol: en situaciones de cetoacidosis alcohólica la hipofosfatemia aguda es multifactorial. Hasta en el 50% de los pacientes hospitalizados con alcoholemia positiva en sangre se detecta hipofosfatemia. La corrección de la acidosis, junto a la alcalosis respiratoria compensadora, la pérdida renal de P y K en el contexto de la acidosis, al déficit de ingesta y los vómitos hacen que los niveles de P disminuyan. La hipofosfatemia se puede exacerbar por el aumento de la insulina generada en el caso de la administración concomitante de líquidos que contienen glucosa y por la administración conjunta de catecolaminas (79- 81).
- Nutrición parenteral total o realimentación tras desnutrición prolongada: cuando se comienza una realimentación con un exceso de glúcidos y aminoácidos, se produce un estado anabólico con consumo de P (82, 83).
- Pacientes en diálisis: hasta el 26% de los pacientes con terapia de reemplazo renal pueden desarrollar hipofosfatemia (84).

- Otras causas: quemaduras graves, síndromes linfoproliferativos, sepsis, administración de manitol (85,86).

1.5.2 Hipofosfatemias crónicas

La homeostasis del P está regulada principalmente por la absorción a nivel intestinal y la modulación a nivel de la excreción renal, como se ha mencionado previamente. Por tanto, alteraciones en algunos de estos mecanismos de regulación van a ser causa de hipofosfatemia crónica.

a) Aumento de excreción renal inducida por factores sistémicos: por alteración en los mecanismos de regulación de la PTH, PTHrP o FGF23. En muchas ocasiones la hipofosfatemia tiene una causa multifactorial.

- **PTH dependiente:** cualquier causa de hipersecreción de PTH puede provocar hipofosfatemia. Puede deberse a un hiperparatiroidismo primario, por disfunción de una sola glándula (80%) o por un trastorno de múltiples glándulas (87).

Las causas genéticas de hipercalcemia que semejan un hiperparatiroidismo primario por la asociación con adenomas paratiroideos son extremadamente raras: hipercalcemia hipocalciúrica familiar o hiperparatiroidismo primario neonatal severo (OMIM#239200) por mutaciones en el receptor sensor de calcio (CaSR). Otras causas de hiperparatiroidismo incluyen la neoplasia endocrina múltiple tipo 1 (MEN1), la neoplasia endocrina múltiple tipo 2A (MEN2A) y el síndrome de hiperparatiroidismo-tumor mandibular (58,88).

Entre las causas de hiperparatiroidismo secundario destacan:

- Deficiencia o resistencia a la vitamina D: puede causar hipofosfatemia por varios mecanismos, incluyendo tanto la disminución de la absorción gastrointestinal de fosfato como por la hipocalcemia e hiperparatiroidismo secundario (35).
 - Ingesta de quelantes del calcio oral.
 - Fármacos antirresortivos: se ha descrito hipofosfatemia en pacientes que reciben tratamiento con pamidronato (89) y zoledronato (90) por el aumento de los niveles de PTH tras la disminución de la disponibilidad de los niveles séricos de calcio. En un 12-32% de los pacientes que reciben tratamiento con denosumab se puede observar hipofosfatemia (91,92).
 - Hiper calciuria renal (58).
 - Síndrome del hueso hambriento: tras la realización de una paratiroidectomía en pacientes con una osteopenia preexistente se produce un secuestro de calcio y fosfato en el hueso durante el postoperatorio inmediato (75).
- **Dependiente de PTHrP:** es una proteína estructuralmente similar a la PTH, aunque codificada por un gen diferente, que se expresa de manera ubicua y actúa como factor paracrino y autocrino de forma patológica en algunos pacientes con tumores. Se expresa sobre todo en carcinomas escamosos (pulmonar, esófago, piel, cérvix), de mama y carcinoma renal (58,93,94).
 - **FGF23-dependiente:** los niveles elevados de FGF23, ya sea por causa adquirida o genética, producen pérdida renal de fosfato caracterizada por TmP/GFR baja o inapropiadamente normal,

1,25(OH)₂D baja o inapropiadamente normal a pesar de la normalidad 25(OH)₂D y disminución de la excreción de calcio en la orina. La actividad de la fosfatasa alcalina puede aumentar, lo que refleja un defecto de mineralización subyacente. Los niveles de PTH pueden ser normales o moderadamente elevados, en respuesta a una disminución del calcio sérico debido a un nivel bajo de 1,25(OH)₂D (58).

Los principales trastornos mediados por FG23 son:

- *Osteomalacia inducida por tumores*: por aumento en la secreción de FGF23, MEPE y sFRP-4 por un tumor mesenquimatoso de partes blandas u origen óseo principalmente (58,95). También se han descrito casos asociados a neurofibromatosis, linfoma no Hodgkin de células B, carcinoma de colon y carcinoma de próstata (96-98).
- *Administración de hierro intravenoso*: se produce un aumento en los niveles circulantes de FGF23 tras la administración de carboximatoso férrica intravenosa (99). La administración intravenosa de hierro se asocia con niveles elevados de FGF23 intacto. El mecanismo preciso sigue sin estar claro, pero se sospecha que las formulaciones de hierro por vía intravenosa tienen un efecto sobre el metabolismo intracelular de FGF23. La incidencia de hipofosfatemia después de la infusión de hierro varía del 2,1% al 86% (100-102).
- *Postrasplante renal*: se observa hipofosfatemia en el 40-90% de los trasplantados renales (103). El mecanismo de la

hipofosfatemia se relaciona con un aumento de la secreción de PTH (hiperparatiroidismo secundario y terciario) y en parte con la persistencia de niveles inapropiados altos de FGF23. La hipofosfatemia puede observarse hasta meses después del trasplante (104).

- *Origen genético*: el más frecuente es el raquitismo hipofosfatémico ligado al cromosoma X (PHEX). Otros cuadros son raquitismo hipofosfatémico autosómico dominante (FGF23), raquitismo hipofosfatémico autosómico recesivo tipo 1 (DMP1), tipo 2 (ENPP1), tipo 3 (FAM20C), síndrome de McCune-Albright o displasia fibrosa (gen GNAS) y el síndrome de hipofosfatemia cutánea esquelética (Ver sección 1.7).
- **Alteración de los transportadores renales de P:**
 - Diuréticos de acción proximal: la acetazolamida produce fosfaturia por mecanismos relacionados con la inhibición de la anhidrasa carbónica (105). Algunos diuréticos del asa de Henle, como la furosemida y las tiazidas, también pueden producir fosfaturia (106).
 - Consumo crónico de alcohol: produce una disfunción tubular, renal reversible con 4 semanas de abstinencia (80,107).
 - Síndrome de Fanconi adquirido: en adultos con mayor frecuencia se produce secundario a fármacos, mieloma múltiple, intoxicación por metales pesados o síndrome de Sjögren (108).

- Fármacos: los implicados con mayor frecuencia son agentes quimioterapéuticos: inhibidores de la tirosina-quinasa (mesilato de imatinib), inhibidores mTOR (temsirolimus), inhibidores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (sorafenib), fármacos antivirales como el adenofocir, cidofovir y tenofovir, el valproato sódico o antibióticos como tetraciclinas o aminoglucósidos (109-112).
- Mieloma múltiple: por la producción de inmunoglobulinas monoclonales de cadena ligera se produce una tubulopatía proximal (113).
- Origen genético: enfermedad de Dent (gen CLCN5, OMIN# 300009), Cistinosis (gen CTNS OMIN #219800), mutaciones en NAPilla (gen SLC34A1 OMIN #616963) (58,114). (Ver sección 1.7).

b. Disminución de la absorción intestinal

- Ingesta inadecuada: gracias a la rápida adaptación renal, la ingesta deficiente por sí sola rara vez es responsable de la depleción grave de fosfato. Sin embargo, si la ingesta deficiente se combina con diarrea crónica o ingesta deficiente de vitamina D o malabsorción de vitamina D, puede causar hipofosfatemias crónicas graves (58). Esta descrita hipofosfatemia en el 3,4% de los pacientes con niveles de vitamina D < 30 nmol/l. En los países de clima templado, la causa

principal de la deficiencia de vitamina D es la baja exposición al sol (115,116).

- Fármacos: los antiácidos con una base de aluminio y magnesio forman sales insolubles de fosfato de aluminio y magnesio al unirse al Pi. La niacina y sus derivados también pueden promover las pérdidas fecales de fosfato al reducir la expresión intestinal del cotransportador de sodio-fosfato tipo 2b (NaPiIb) (117,118). Los fármacos antiepilépticos (fenobarbital, carbamazepina, fenitoína) o la rifampicina, que son inductores de la actividad del citocromo CYP3A4, pueden catalizar la hidroxilación de 1,25(OH)₂D y, por lo tanto, conducir a déficit de vitamina D y osteomalacia (119).
- Otras causas: esteatorrea y diarrea crónica, síndrome de intestino corto debido a una cirugía bariátrica, enfermedad celiaca o enfermedad inflamatoria intestinal. En estos casos la hipofosfatemia se puede ver agravada por la asociación con un hiperparatiroidismo secundario por el déficit concomitante de vitamina D (120-123).
- Origen genético: raquitismo dependiente de la vitamina D tipo I, II y III (58,114) (Ver sección 1.7).

1.6 MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA HIPOFOSFATEMIA CRÓNICA

El déficit de fosfato a largo plazo perjudica el desarrollo y la calidad del tejido mineralizado del sistema esquelético, dental o auditivo, con gran impacto en la calidad de vida de estos pacientes. En la edad adulta las deformidades óseas de los individuos que sufrieron raquitismo en su infancia pueden provocar artrosis temprana de caderas y rodillas. Asimismo, la hipofosfatemia mantenida

puede dar lugar a osteomalacia, con fracturas /pseudofracturas y retraso en la consolidación de fracturas. Sin embargo, es importante considerar que aquellas enfermedades que cursan con hipofosfatemia crónica pueden producir otros defectos no directamente relacionados con la hipofosfatemia persistente.

El dolor óseo, la miopatía o el deterioro de la mineralización pueden ser reversibles independientemente de la duración de la hipofosfatemia. Sin embargo, la deformidad de las extremidades, baja estatura, pérdida de la audición, anomalías dentales o la artrosis pueden ser irreversibles, o sólo parcialmente corregibles, cuando el desarrollo está completo (124).

1.6.1 Alteraciones esqueléticas

La osteomalacia es una condición caracterizada por un déficit de la mineralización ósea, con un acúmulo de osteoide no mineralizado y disminución de la resistencia ósea. Las principales manifestaciones son las deformidades de huesos largos de carga, dolor óseo difuso, mayor riesgo de fracturas o pseudofracturas así como retraso en la consolidación de las mismas.

En niños sanos, en la placa de crecimiento, la mineralización normal y el alargamiento óseo requieren la apoptosis de los condrocitos hipertróficos regulada por fosfato. En la hipofosfatemia crónica, esta apoptosis se detiene, lo que lleva a una deficiencia mineralización y acumulación de osteoide en la metafisis, lo que conlleva a retraso en el crecimiento. Es lo que se conoce como raquitismo (125).

Hasta un 60% de las hipofosfatemias crónicas de origen genético cursan con craneosinostosis, que durante el período de crecimiento causa deformidad

en la forma de la cabeza y puede conducir a un aumento de la presión intracraneal, problemas oftalmológicos y retraso en el desarrollo. Sin embargo, no está claro si estas manifestaciones son causadas directamente por la hipofosfatemia o son una consecuencia independiente de la enfermedad de base (124).

1.6.2 Alteraciones dentales

Los mecanismos moleculares responsables de las manifestaciones dentales en pacientes con hipofosfatemia crónica son poco conocidos. La mineralización insuficiente del tejido dental por deficiencia crónica de fosfatos produce esmaltes delgados, grietas microscópicas, estructuras superficiales irregulares y abscesos espontáneos (24,124).

1.6.3 Complicaciones articulares

Los pacientes con una carga mecánica anormal por las deformaciones esqueléticas a largo plazo presentan una degeneración temprana de las articulaciones, a menudo con dolor y limitación. La hipofosfatemia crónica también puede producir la calcificación anormal del fibrocartilago de tendones y ligamentos, lo que contribuye a causar dolor, rigidez y limitación de la movilidad articular.

1.6.4 Sistema muscular

El dolor muscular, la rigidez y la miopatía proximal son manifestaciones comunes en pacientes con niveles bajos de fosfato sérico, por la disminución de la síntesis de ATP y la reducción de la fosforilación oxidativa. También se ha asociado a disfagia e íleo paralítico, presumiblemente por alteración del músculo liso (124).

1.6.5 Alteraciones auditivas

La hipoacusia neurosensorial solo se ha asociado a las formas genéticas de hipofosfatemia crónica, sobre todo el raquitismo ligado al cromosoma X.

1.6.6 Sistema nervioso central

La hipofosfatemia crónica puede ser causante de varias manifestaciones neurológicas, que pueden ser leves, como neuropatía, parestesias, o leve irritabilidad. Sin embargo, en ocasiones pueden ser más graves, incluyendo encefalopatía, convulsiones, e incluso estado de coma (35,126).

1.6.7 Sistema cardiopulmonar

La afectación de la contractilidad miocárdica, asociación con arritmias ventriculares y alteración de la contractilidad diafragmática, se produce especialmente en situaciones de hipofosfatemia grave ($<1\text{mg/dl}$) y de instauración aguda, por lo que rara vez estas manifestaciones están presentes en las hipofosfatemias de larga evolución (127).

1.6.8 Alteraciones hematológicas

La hipofosfatemia crónica grave ($<1\text{ mg/dl}$) puede originar disfunción leucocitaria, alteraciones plaquetarias y hemólisis, aunque con muy baja frecuencia (128).

1.7 HIPOFOSFATEMIAS GENÉTICAS

Existen varias causas genéticas de raquitismo, que en general se clasifican como fosfopénicas o calcipénicas. La deficiencia de fosfato es el defecto primario en el raquitismo fosfopénico, y es causada principalmente por

trastornos genéticos del manejo renal de fosfato que conducen a una reabsorción tubular alterada. Así, bajo el término “raquitismo hipofosfatémico” se engloban un grupo de alteraciones con fenotipo similar, pero con diferentes genotipos, modelos de herencia y etiopatogenias.

Desde el punto de vista de la patogenia, en concreto del papel del FGF23, se clasifican en dos grupos: FGF23-dependientes y FGF23-independientes. Las causas genéticas importantes del raquitismo fosfopénico son el raquitismo hipofosfatémico dominante ligado al X, el autosómico dominante y autosómico recesivo relacionado con FGF23 (114, 129-131).

1.7.1 Diagnóstico de hipofosfatemias genéticas

El diagnóstico clínico del raquitismo hipofosfatémico se basa en las características clínicas, radiológicas y bioquímicas. Sin embargo, aunque las pruebas genéticas pueden ser prescindibles, ayudan a confirmar el diagnóstico y permiten la detección de portadores y el asesoramiento genético.

Las pruebas de laboratorio muestran hipofosfatemia significativa con hiperfosfaturia, que es causada por la disminución de la reabsorción de fosfato en los túbulos renales. El aumento de la fosfaturia en el raquitismo hipofosfatémico puede definirse por una disminución de la reabsorción tubular de fosfato por debajo del 85% (TRP, calculado a partir de la siguiente fórmula: $TRP\% = 100 \times (1 - [P \text{ en orina} \times \text{creatinina en suero}] / [P \text{ en suero} \times \text{creatinina en orina}])$ (132). La actividad de la fosfatasa alcalina está elevada y una disminución de su actividad es un buen marcador en el seguimiento de la eficacia del tratamiento. Los marcadores de recambio óseo, como la osteocalcina (marcador de formación ósea) y las piridolinas (marcador de resorción ósea) pueden estar

elevados (133). Los niveles de FGF23 pueden estar elevados o disminuidos en función del trastorno, y los niveles de 25 (OH)²D son normales siempre y cuando se mantenga la síntesis cutánea o el aporte de suplementación de forma preventiva (129).

Los estudios de imagen realizados a paciente con hipofosfatemias genéticas no son específicos de esta patología. Las radiografías revelan signos de raquitismo (en niños) u osteomalacia (en adultos). Tras finalizar el crecimiento pueden observarse cambios proliferativos y aumento subperióstico y formación de hueso intraóseo, en particular en diáfisis de huesos largos, lo que provoca un aumento del grosor del hueso cortical. Las zonas de Looser-Milkman también pueden estar presentes; son áreas lúcidas medialmente en los huesos curvos, lo que resulta en fracturas patológicas llamadas fracturas por fatiga o sobrecarga. Otros signos visibles en una radiografía pueden incluir depósitos de calcio en las regiones de tendones e inserciones ligamentosas (entesopatías) y cambios proliferativos con calcificación de grandes articulaciones y la columna vertebral, relacionado con la osteoartritis. También se ha descrito la extensión de la diáfisis ósea con agrandamiento de la rodilla en resonancias magnéticas, con buena correlación con los niveles de fosfatasa alcalina. Algunos autores sugieren su utilización como un índice cuantitativo para la evaluación de la actividad de la fosfatasa (129,134).

1.7.2 Raquitismo hipofosfatémico ligado al cromosoma X (XLH, OMIM #307800)

Es la causa más común de pérdida hereditaria de fosfato y la forma más prevalente de raquitismo hipofosfatémico genético relacionado con el FGF23. Se ha estimado una incidencia de 3,9 por 100.000 nacidos vivos y una prevalencia

que oscila entre 1,7 por 100.000 niños y 4,8 por 100.000 personas (niños y adultos) (135,136). Está causado por mutaciones en PHEX (gen localizado en Xp22.1), que codifica una endopeptidasa expresada fundamentalmente en osteoblastos, osteocitos y dientes. Aproximadamente el 20-30% de los casos se deben a mutaciones esporádicas o de novo del gen *PHEX*, en ausencia de antecedentes familiares. Estas mutaciones inactivadoras en el gen *PHEX* aumentan la expresión del FGF23 al aumentar los niveles de péptido de proteína ASARM asociada a MEPE. Esto conduce a una mayor liberación de FGF23 en el suero y aumento de la señalización mediada por FGF23. (2,129). Los defectos de mineralización del esqueleto en XLH son consecuencia de la pérdida renal de fosfato, y de la disminución de 1,25(OH)₂D debido al exceso de FGF23, que suprime la actividad de la 1 α -hidroxilasa y aumenta la expresión de la 24-hidroxilasa vitamina D (137).

El modo de herencia es dominante ligado al cromosoma X, por lo que los hombres suelen tener una enfermedad más grave que las mujeres. Se han descrito algunas familias con mujeres portadoras de la mutación completamente asintomáticas, lo que se en ocasiones se ha denominado raquitismo ligado al cromosoma X recesivo. Sin embargo, también se piensa que las mujeres en realidad son oligosintomáticas en lugar de asintomáticas por la presencia de la segunda copia del gen, es decir, una herencia codominante (129,138).

En adultos, el fenotipo esquelético se caracteriza por osteomalacia, pseudofracturas, calcificaciones anormales en los sitios de inserción ósea de tendones y ligamentos (entesopatía), artrosis prematura y trastornos dentales (58).

1.7.3 Raquitismo hipofosfatémico de herencia autosómica dominante (AHDR, OMIM# 193100)

En el caso de herencia autosómica, la mutación más frecuente es la que afecta al gen FGF23 en el cromosoma 12p13. Como resultado del cambio de la secuencia de aminoácidos, se forma una molécula de FGF23 que es resistente a la acción degradante de la peptidasa. En tales circunstancias, FGF23 se une al receptor de FGF (FGFR), cuyo cofactor es la proteína Klotho, y por tanto inhibe los cotransportadores NaPi-IIa y NaPi-IIc en los túbulos renales. A su vez, esto provoca disminución de la reabsorción renal de fosfatos y aumento de la fosfaturia. La activación de este receptor también disminuye la producción renal de 1,25(OH)₂D (129,139). Aunque el modo de herencia es autosómico dominante, la penetrancia es incompleta, con expresividad variable. A diferencia de los pacientes con XLH, los pacientes con mutaciones ADHR no presentan entesopatía y además pueden presentar un inicio temprano o tardío de la enfermedad, lo que dificulta el diagnóstico diferencial con los raquitismos hipofosfatémicos adquiridos dependientes de FGF23, como ocurre en los casos de tumor inductor de osteomalacia (140).

Otros dos trastornos con un patrón de herencia autosómico dominante, pero menos frecuentes son el raquitismo hipofosfatémico con nefrolitiasis y osteoporosis tipo I y tipo II. El raquitismo hipofosfatémico con nefrolitiasis y osteoporosis tipo I (OMIM #612286) es debido a una mutación del gen transportador de sodio (SLC34A1, localizado en 5q35) y se caracteriza por la coexistencia de nefrolitiasis, osteoporosis y raquitismo hipofosfatémico.

El raquitismo hipofosfatémico con nefrolitiasis y osteoporosis tipo II (OMIM # 612287) es debido a una mutación en el gen SLC9A3R1 (localizado en 17q25.1),

que codifica la proteína citoplasmática intercambiadora de sodio/hidrógeno (NHEFR1). Están asociados con una reabsorción deficiente de fosfato e hipofosfatemia (129,131).

1.7.4 Raquitismo hipofosfatémico de herencia autosómica recesiva

En el caso de herencia autosómica recesiva, se han descrito varias mutaciones que producen hipofosfatemia asociadas a otras manifestaciones clínicas. Se deben a mutaciones en los genes DMP1, ENPP1 y FAM20C y representan causas muy raras de raquitismo hipofosfatémico.

- Raquitismo hipofosfatémico tipo I (OMIM #241520): causado por una mutación del gen de la proteína de matriz de dentina 1 (DMP1) (locus 4q22.1) que produce una pérdida de la función de una proteína que inhibe la secreción de FGF23, de manera que la mutación conduce a un aumento de los niveles de FGF23. DMP1 se expresa en osteoblastos/osteocitos en tejido óseo y en odontocitos en dientes. Los pacientes con esta mutación manifiestan raquitismo y osteomalacia con pérdida renal aislada de fosfato asociada con niveles elevados de FGF23 y normocalciuria (141).
- Raquitismo hipofosfatémico tipo II (OMIM #613312): originado por mutación con pérdida de función en el gen de ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa 1 (ENPP1), localizado en 6q23.2, que produce aumento de los niveles de FGF23. La proteína ENPP1 participa en la producción de pirofosfatos extracelulares que inhiben el depósito de cristales de hidroxapatita y, por tanto, en pacientes con mutación de este gen, se observan calcificaciones vasculares, a veces desde la infancia, y con frecuencia con mal pronóstico.

- Raquitismo hipofosfatémico autosómico recesivo III (Enfermedad de Raine) (no considerado en OMIN) por mutaciones en FAM20C o DMP4, cursa con alteraciones dentales, calcificaciones intracraneales, osteosclerosis y patrones dismórficos. Se ha demostrado que, la pérdida de la función FAM20C reduce la expresión de DMP1.
- Raquitismo hipofosfatémico asociado a hipercalciuria (OMIM #241530): relacionado con una mutación con pérdida de función del gen SLC34A3 (en 9q34), que codifica una proteína del cotransportador renal NaPi-IIc. A nivel clínico presentan nefrocalcinosis y nefrolitiasis.
- Raquitismo hipofosfatémico ligado al X recesivo (Enfermedad de Dent) (OMIM #300554): por mutación del gen CLCN5, que codifica la proteína CLC-5, responsable del transporte transmembrana de iones, y reconocido como transportador de iones H⁺/Cl⁻. En los túbulos renales proximales, transporta iones de hidrógeno a los endosomas e iones de cloruro al exterior, lo que ayuda a mantener valores de pH adecuados (129).

1.7.5 Raquitismo dependiente de vitamina D

- Raquitismo dependiente de vitamina D tipo IA (OMIM#264700): se desarrolla más comúnmente como resultado de una mutación del gen CYP27B1, localizado en el cromosoma 12 (locus 12q14.1). Esto causa deficiencia de 1 α -hidroxilasa y, como resultado, alteraciones de la hidroxilación de 25-hidroxicolecalciferol. Se han detectado múltiples mutaciones diferentes en el gen CYP27B1, pero en concreto

las dos más comunes son la eliminación de guanina 958 (958delG) y una mutación de splicing (sustitución de guanina por adenina en el primer nucleótido de un intrón) (142).

El diagnóstico de raquitismo por pseudodeficiencia de vitamina D tipo 1 generalmente se establece con base en el examen físico y resultados de laboratorio donde predominan: hiperfosfatasemia, hipofosfatemia e hipocalcemia acompañada de hiperparatiroidismo secundario. El nivel sérico de 1,25(OH)₂D suele ser indetectable y los niveles de 25(OH)₂D superan el valor normal superior límite o están dentro de los valores de referencia.

El único tratamiento efectivo es la administración de 1,25 (OH)₂D en dosis ajustada de forma individual (129-131).

- Raquitismo dependiente de vitamina D tipo IB (OMIM#600081): es el resultado de una mutación del gen CYP2R1 (locus 11p15.2) que codifica la 25-hidroxilasa, responsable de hidroxilación de vitamina D a 25(OH)₂D en el hígado. Tiene una herencia autosómica recesiva y hay muy pocos casos descritos. El tratamiento se realiza con altas dosis de 25(OH)₂D (93,143).
- Raquitismo dependiente de vitamina D tipo IIA (OMIM#277440): también se conoce como resistencia generalizada a la 1,25(OH)₂D. Esta forma sigue un patrón de herencia autosómico recesivo y es causado por una mutación del gen que codifica el receptor de vitamina D (VDR, en el locus 12q13.11). El defecto de VDR impide la señalización de la 1,25(OH)₂D y en consecuencia se produce una alteración en la absorción de calcio en el intestino.

Las mutaciones del VDR en el dominio de unión al DNA producen una resistencia total a la 1,25(OH)₂D. Sin embargo, puede haber una resistencia parcial cuando las mutaciones afectan al dominio de unión al ligando.

A nivel clínico, en esta enfermedad predominan las manifestaciones de raquitismo severo. La alopecia es también un hallazgo clínico frecuente en estos pacientes y se correlaciona con la gravedad del raquitismo.

La respuesta al tratamiento depende de la ubicación de la mutación, y la afinidad de 1,25(OH)₂D por VDR (129,144).

- Raquitismo dependiente de vitamina D tipo IIB (OMIN#600785): es una forma de raquitismo dependiente de vitamina D, pero con un receptor de vitamina D (VDR) normofuncionante. Se debe a la sobreexpresión de una ribonucleoproteína nuclear heterogénea que interfiere en la unión del complejo VDR y el ligando.

El fenotipo de esta enfermedad es similar al raquitismo dependiente de vitamina D tipo IIA y a nivel bioquímico, la 25(OH)₂D es normal mientras que la 1,25 (OH)₂D está aumentada (145).

- Raquitismo dependiente de vitamina D tipo III (OMIN# 619073): se debe una mutación de ganancia de función en CYP3A4, gen que codifica una oxidasa del grupo P450. La enzima degrada metabolitos de la vitamina D, sintetizando 1,25(OH)₂D.

La mutación, presuntamente activadora, se identificó mediante análisis de secuenciación del exoma completo en dos pacientes no relacionados que presentaban raquitismo de aparición temprana,

niveles séricos reducidos de metabolitos de vitamina D, como 25(OH)2D y 1,25(OH)2D y respuesta deficiente a la suplementación (146).

Tabla 2.1. Diagnóstico diferencial de los raquitismos hipofosfatémicos FGF-23 dependientes (Modificada de 130,131).

Trastornos	Gen	P _p	P _o	Ca _p	Ca _o	TRP	TmP /FG	FA	25OHD	1,25(OH) ₂ D	PTH	FGF-23
Raquitismo hipofosfatémico ligado al cromosoma X	PHEX	↓↓	↑↑	N	↓	↓	↓	↑	N	N / ↓	N	↑/N
Raquitismo hipofosfatémico autosómico dominante	FGF23	↓↓	↑↑	N	↓	↓	↓	↑	N	N / ↓	N	↑/N
Raquitismo hipofosfatémico autosómico recesivo 1	DMP1	↓↓	↑↑	N	↓	↓	↓	↑	N	N / ↓	N	↑/N
Raquitismo hipofosfatémico autosómico recesivo 2	ENPP1	↓↓	↑↑	N	↓	↓	↓	↑	N	N / ↓	N	↑/N
Raquitismo hipofosfatémico autosómico recesivo 3 (Síndrome de Raine)	FAM20/DMP4	↓↓	↑↑	N	↓	↓	↓	↑	N	N / ↓	N	↑/N

Tabla 2.2. Diagnóstico diferencial de los raquitismos hipofosfatémicos FGF-23 independientes. (Tabla modificada de (130,131).

Trastornos	Gen	P _p	P _o	Ca _p	Ca _o	TRP	TmP /FG	FA	25OHD	1,25(OH) ₂ D	PTH	FGF23
Raquitismo hipofosfatémico asociado a hipercalciuria	SLC34A3	↓↓	↑↑	N	↑	↓	↓	↑	N	↑	N /↓	N
Raquitismo hipofosfatémico con nefrolitiasis y osteoporosis tipo 1	SLC34A1	↓↓	↑↑	N	↑	↓	↓	↑	N	↑	N /↓	N
Raquitismo hipofosfatémico con nefrolitiasis y osteoporosis tipo 2	SLC9A3R1	↓↓	↑↑	N	↑	↓	↓	↑	N	↑	N /↓	N
Raquitismo hipofosfatémico ligado al X recesivo 1 (Enfermedad de Dent)	CLCN5	↓↓	↑↑	N	↑	↓	↓	↑	N	↑	N /↓	N
Raquitismo hipofosfatémico ligado al X recesivo 2 (Enfermedad de Lowe)	OCRL1	N	↑↑	N	↑	↓	↓	↑	N	N	N	N
Raquitismo hipofosfatémico asociado a hiperparatiroidismo	KLOTHO	↓	↑	N	N/ ↑	↓	↓	↑	N	N	↑	↑

Tabla 2.3. Diagnóstico diferencial de los trastornos asociados a raquitismo hipofosfatémico dependiente de FGF-23. (Tabla modificada). (130,131).

Trastornos	Gen	P _p	P _o	Ca _p	Ca _o	TRP	TmP/FG	FA	25OHD	1,25(OH) ₂ D	PTH	FGF23
Displasia fibrosa (Síndrome McCune-Albright)	GNAS1	N /↓	↑	N /↓	N	N /↓	↓	N	N	N /↓	N /↑	N /↑
Síndrome de hipofosfatemia cutánea esquelética	KRAS/ HRAS/ NRAS	N /↓	↑	N /↓	N /↓	N /↓	↓	↑	N	N /↓	N /↑	N /↑
Displasia osteoglofónica	FGFR1	↓	↑	N	N	↓	↓	↑	N	↓	N	N /↑
Tumor inductor de osteomalacia	-	↓	↑	N /↓	N /↓	↓	↓	↑	N	↓	N /↑/↓	N /↑

Tabla 3. Diagnóstico diferencial de raquitismos hipocalcémicos. (Tabla modificada). (130,131).

Trastornos	Gen	P _p	P _o	Ca _p	Ca _o	TRP	TmP /FG	FA	25OHD	1,25(OH) ₂ D	PTH	FGF23
Raquitismo dependiente de vitamina D tipo IA	CYP27B1	N /↓	Varía	↓	↓	↓	↓	↑↑	N	↓	↑↑	N /↓
Raquitismo dependiente de vitamina D tipo IB	CYP2R1	N /↓	Varía	↓	↓	↓	↓	↑↑	↓↓	Varía	↑↑	N
Raquitismo dependiente de vitamina D tipo IIA	VDR	N /↓	Varía	↓	↓	↓	↓	↑↑	N	↑↑	↑↑	N /↓
Raquitismo dependiente de vitamina D tipo IIB	HNRNPC	N /↓	Varía	↓	↓	↓	↓	↑↑	N	↑↑	↑↑	N
Raquitismo dependiente de vitamina D tipo III	CYP3A4	↓	Varía	↓	↓	↓	↓	↑↑	↓	↓	↑↑	¿?

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPOTESIS

Las causas más frecuentes de hipofosfatemias crónicas son de origen adquirido. La prevalencia de la hipofosfatemia genética más frecuente (hipofosfatemia ligada al X) es de 1 de cada 20.000 personas, según varios estudios (147). La prevalencia en la comunidad de Cantabria es desconocida, pero a la vista de la experiencia de los clínicos implicados en estos trastornos parecería muy inferior a la esperada para una población de 581641 habitantes (datos actualizados de 2019). Por eso, nos planteamos la hipótesis de que deben de existir muchos casos de hipofosfatemia genética no diagnosticados.

OBJETIVOS

El objetivo principal del trabajo fue analizar las hipofosfatemias crónicas en la comunidad de Cantabria, identificando aquellas de origen genético.

Para ello, los objetivos específicos planteados fueron los siguientes:

1. Conocer la prevalencia de hipofosfatemias de causa genética en la población de Cantabria.
2. Analizar el perfil clínico y bioquímico de los pacientes con hipofosfatemias genéticas.
3. Realizar el estudio de los familiares de pacientes con hipofosfatemia genética.
4. Determinar las causas de hipofosfatemia secundaria.

3. METODOLOGÍA

El estudio se realizó en el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (Santander), hospital terciario y centro de referencia de la región que atiende a 320.000 personas. Este estudio consta de una fase retrospectiva y otra prospectiva.

3.1 ESTUDIO RETROSPECTIVO

El estudio retrospectivo comprende el periodo de octubre 2002 hasta enero 2020 e incluye una fase de revisión de determinaciones analíticas.

Se extrajeron 631.855 determinaciones analíticas de fósforo correspondientes a 208.245 pacientes y posteriormente se filtraron según punto de corte deseado. Para ello, se realizó una búsqueda en el sistema informático del laboratorio (LIS):

- Anterior a 21 febrero de 2019: Servolab4 (Siemens Healthcare®). La extracción de datos se realizó con el módulo de extracción de datos de dicho sistema informático.
- Posterior a 21 febrero de 2019: LISCAN (Modulab 3.0 de Werfen®) (<https://www.werfen.com/es/es/modulab>). La extracción de datos se realizó con el módulo de extracción de datos de dicho sistema informático.

Criterios de inclusión:

- Edad 18-55 años.
- Al menos una determinación de P en sangre ≤ 2.2 mg/dl en ayunas.

- Pacientes ambulatorios atendidos en atención primaria y consultas externas.
- Firma de consentimiento informado de aquellos pacientes valorados posteriormente en la consulta.

Criterios de exclusión:

De inicio, se excluyeron directamente los pacientes hospitalizados y las determinaciones de pacientes realizados por servicios médicos con alta probabilidad de hipofosfatemia secundaria (trasplante renal, cirugía gastrointestinal, etc.).

- Pacientes hospitalizados.
- Servicios peticionarios excluidos: Nefrología, Cuidados Intensivos, Oncología, Hematología, consulta VIH de enfermedades infecciosas, servicios quirúrgicos.
- Trasplantados de médula ósea y órgano sólido, como trasplante renal.
- Diabetes mellitus con episodios de descompensación aguda (cetoacidosis diabéticas).
- Consumo crónico de alcohol.
- Administración de hierro intravenoso previamente.
- Tratamiento activo con diuréticos (acetazolamida, tiazidas), quimioterápicos (cisplatino, imatinib), antivirales (tenofovir, adenofovir), antiácidos con aluminio o magnesio.
- Hiperparatiroidismo primario.
- Enfermedad inflamatoria intestinal.
- Antecedentes de cirugía bariátrica.
- Sepsis o intervenciones quirúrgicas mayores.

- VIH
- Trastornos de conducta alimentaria.
- Fallecimiento.

De un total de 631.855 determinaciones bioquímicas de P se incluyeron 2.928 determinaciones analíticas que cumplían los criterios de inclusión y correspondían a 842 pacientes.

3.2 ESTUDIO PROSPECTIVO

La fase prospectiva comprendió por un lado una fase de identificación de hipofosfatemias crónicas, que abarcó un periodo de 14 meses posteriores al inicio del estudio. Por otro lado, incluyó una fase de valoración clínica y analítica específicas de los pacientes seleccionados, comprendida entre noviembre 2020 y marzo 2021.

Entre enero de 2020 y marzo de 2021, mediante la implementación de un algoritmo de gestión de peticiones, se añadió la determinación de P a todas las solicitudes de laboratorio de pacientes con los mismos criterios de inclusión que en la fase retrospectiva. En esta etapa se incluyeron todas las solicitudes de laboratorio en la región de Cantabria. Además del Hospital Marqués de Valdecilla, en la fase prospectiva, participaron en el estudio el Hospital Sierrallana y el Hospital Laredo.

En total, en esta fase prospectiva de selección de pacientes se incluyeron 183.973 determinaciones analíticas de P. Entre esas pruebas, se identificaron 445 pacientes con al menos una prueba de fósforo ≤ 2.2 .

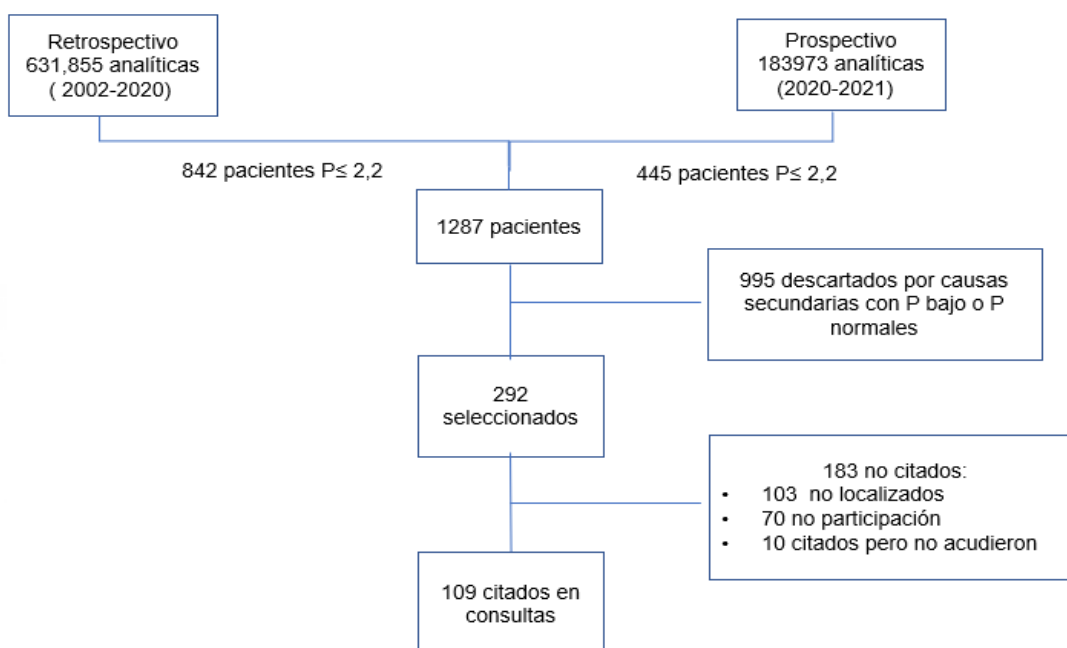
3.2.1 Protocolo de actuación

En total 1287 pacientes fueron seleccionados para realizar el estudio, 842 pacientes de la rama retrospectiva y 445 de la prospectiva. Se revisaron las historias electrónicas de todos estos pacientes.

Del total de los 1287 pacientes, se excluyeron 14 (1,09%) por haber fallecido en el momento de la revisión de las historias clínicas. Tras la revisión exhaustiva de las 1287 historias clínicas, en 292 pacientes (24,79%) no se identificó una causa de hipofosfatemia, por lo que fueron seleccionados para una evaluación clínica y analítica en consulta. Se trató de contactar con estos pacientes y se les invitó a participar en el estudio.

De los 292, no se logró localizar a 103 pacientes y rehusaron a participar en el estudio 80. Finalmente, 109 pacientes fueron evaluados en la consulta de Medicina Interna.

Figura 8. Selección de pacientes seleccionados para la valoración clínica y analítica en consultas de Medicina Interna.



Adicionalmente, para valorar los niveles de FGF23, se midió este también en un grupo de 9 controles (pacientes sometidos a estudio preoperatorio rutinario sin evidencia de enfermedades esqueléticas o metabólicas).

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación con medicamentos de Cantabria de acuerdo con la normativa vigente. Además, en caso de muestra sobrante, una vez finalizado el estudio, se envió al Biobanco Valdecilla (Nodo de ADN y fluidos), en el que se procesaron las muestras mediante un procedimiento de codificación de acuerdo con la Ley Orgánica 3/2018 de 5 de diciembre de Protección de Datos Personales y Garantía de los derechos digitales. Las muestras donadas al Biobanco de Valdecilla y datos clínicos asociados podrán ser cedidos a otros investigadores cuyos proyectos estén aprobados por Comités de Ética y Científico del Biobanco.

3.2.2 Variables analizadas

En los 109 pacientes valorados en consulta se analizaron variables clínicas y bioquímicas.

Las variables clínicas analizadas fueron:

- Edad: variable cuantitativa expresado en años.
- Sexo: variable cualitativa dicotómica: “1” Mujer “2” Varón.
- Ingesta de alcohol: variable cualitativa: “1” Si, “2” No, “3” Ocasional.
- Tabaco: variable cualitativa: “1” Si, “2” No, “3” Exfumador.
- Hipertensión: variable cualitativa: “1” Si, “2” No.
- Dislipemia: variable cualitativa: “1” Si, “2” No.
- Diabetes Mellitus tipo 2: variable cualitativa: “1” Si, “2” No.

- Prematuridad al nacer: variable cualitativa: "1" Si, "2" No.
- Bajo peso al nacer: variable cualitativa: "1" Si, "2" No.
- Menarquia: variable cualitativa: "1" normal, "2" no normal.
- Pubertad: "1" normal, "2" retraso en el crecimiento.
- Fractura: variable cualitativa: "1" Si, "2" No.
- Mecanismo de fractura: variable cualitativa: "1" traumática "2" no traumática.
- Problemas dentales: variable cualitativa: "1" Si, "2" No.
- Tratamientos habituales: variable cualitativa: "1" Si, "2" No.
- Tipo de tratamiento habitual: "1" antidiabéticos, "2" diuréticos, "3" estatinas, "4" IECAS/ARAI, "5" Acalca, "6" Aines, "7" antidepressivos, "8" Fosfato, "9" NACO, "10" IBP, "11" antipsicóticos, "12" ansiolíticos, "13" antiagregantes, "14" PTH, "15" inmunológicos, "16" vitamina D, "17" antiepilépticos.
- Antecedentes familiares relacionados con hipofosfatemia: variable cualitativa: "1" Si, "2" No.
- Talla del padre: variable cuantitativa expresado en cm.
- Talla de la madre: variable cuantitativa expresado en cm.
- Hermanos: variable cuantitativa.
- Número de hijos: variable cuantitativa.
- Hijos sanos: variable cualitativa: "1" Si, "2" No.
- Talla: variable cuantitativa expresado en cm.
- Peso: variable cuantitativa expresado en Kg.
- Dismorfia facial: variable cualitativa: "1" Si, "2" No.
- Escleras: variable cualitativa: "1" normales, "2" alteradas.

- Dentadura: variable cualitativa: “1” normal, “2” ausencia de >1 pieza dentaria, “3” dientes supernumerarios.
- Tórax: variable cualitativa: “1” normal, “2” deformidad.
- Auscultación cardiaca: variable cualitativa: “1” normal, “2” alterada.
- Extremidades: variable cualitativa: “1” normal, “2” alterada.
- Otras deformidades: variable cualitativa: “1” normal, “2” alterada.
- Hiperlaxitud: escala de Beighton “1” Score 0, “2” Score 1, “3” Score 2, “4” Score 3, “5” Score 4.

Las variables bioquímicas analizadas fueron: fósforo (mg/dl), calcio (mg/dl), albúmina (mg/dl), fosfatasa alcalina (U/l), PTH (pg/ml), 25 hidroxivitamina D o 25 (OH)2D (ng/ml), 1,25-dihidroxivitamina D o 1,25(OH)2D (pg/ml), TSH (mU/L), T4L (mU/L), creatinina (mg/dl), FGF23 intacto (pg/ml), FGF23 C-terminal (pg/ml), creatinuria (mg/dl), fosfaturia (mg/dl), calciuria (mg/dl) y el cociente fosfaturia / creatinuria (mg/mg). Se determinó la reabsorción tubular máxima de P por volumen de filtración (TMP/TFG) mediante el normograma de Walton–Bijvoet. La reabsorción tubular de fósforo (TRP) se calculó con la fórmula: $1 - \frac{[(P \text{ urinario} \times \text{Creatinina sérico}) / (P \text{ sérico} \times \text{Creatinina urinaria})] \times 100}{100}$, expresado en %.

3.2.3 Recogida de muestras

Las muestras se obtuvieron por el personal de enfermería en las consultas de Medicina Interna, tras un periodo de ayunas de unas 10 horas, para evitar la interferencia de la dieta en las cifras de séricas de P. Se extrajeron:

- 3 tubos de 5mL, con gel separador y activador de coágulo (no trombínico), para la obtención de suero de alta calidad tras centrifugación 10 minutos a 1500g a temperatura ambiente.

- 3 tubos malva de 5mL, sin gel separador y con anticoagulante EDTA dipotásico (1 mg/mL) para la obtención de sangre total para la extracción de DNA leucocitario, y de plasma, tras centrifugación 10 minutos a 1500g a temperatura ambiente.
- Tubo de plástico de fondo redondo para orina de micción para análisis bioquímico tras centrifugación 10 minutos a 1500g a temperatura ambiente.

Las muestras de sangre total, plasma y suero se mantuvieron en frío (4-8°C) si su procesado era en el mismo día de la extracción o fueron alicuotadas en criotubos y congeladas a -20°C hasta su análisis.

3.2.4 Métodos bioquímicos

El análisis de creatinina, calcio, fósforo, fosfatasa alcalina, albúmina y PTH intacta se realizaron mediante un analizador automatizado Atellica CH&IM (Siemens Healthcare Diagnostics, Malvern, PA, USA).

- **Creatinina:** el ensayo Atellica® CH Enzymatic Creatinine_2 (ECre_2) se basa en la reacción enzimática de Fossati, Prencipe y Berti. La creatinina se convierte en creatina por la acción de la creatininasas. La creatina formada se hidroliza por la creatininasas para producir sarcosina, que se descompone mediante la sarcosina oxidasa para formar glicina, formaldehído y peróxido de hidrógeno. En presencia de peroxidasa, el peróxido de hidrógeno formado genera un pigmento azul mediante condensación oxidativa cuantitativa con N-(3-sulfopropil)-3-metoxi-5-metilnilina (HMMPS) y 4-aminoantipirina. La

concentración de creatinina se obtiene midiendo la absorbancia del color azul a 596/694 nm. Precisión $\leq 2.5\%$.

- **Calcio:** la absorbancia del color es proporcional a la concentración de calcio, Atellica® CH Calcium_2 (CA_2). El ensayo Atellica CH Calcium_2 (CA_2) está basado en el trabajo de Michaylova e Illkova, que descubrieron que el Arsenazo III forma un complejo estable con calcio con alta selectividad en pH bajo. Los iones de calcio forman un complejo coloreado con Arsenazo III, que se mide a 658/694 nm. La cantidad de calcio presente en la muestra es directamente proporcional a la intensidad del complejo coloreado formado. Precisión $\leq 1.5\%$.
- **Fosfato:** se analizó mediante Atellica® CH Inorganic Phosphorus (IP). El ensayo Atellica® CH Inorganic Phosphorus (IP) se basa en el procedimiento de Daly y Ertinghausen, que depende de la formación de un complejo absorbente de UV entre el fósforo y el molibdato. El fósforo inorgánico reacciona con molibdato de amonio en presencia de ácido sulfúrico para formar un complejo de fosfomolibdato no reducido, que se mide como una reacción de punto final a 340/658 nm. Precisión $\leq 4.6\%$.
- **Fosfatasa alcalina:** Atellica ® CH Alkaline Phosphatase, Concentrated (ALP_2c). El ensayo Atellica ® CH Alkaline Phosphatase, Concentrated (ALP_2c) se basa en el procedimiento de referencia principal para la medición de la actividad catalítica de la fosfatasa alcalina a 37°C según lo describe la Federación Internacional de Química Clínica (IFCC). El método de fosfatasa

alcalina se basa en un procedimiento publicado por Bowers y McComb, que ha sido recientemente revisado por Rej. Este ensayo responde a todas las isoenzimas de fosfatasa alcalina presentes en el suero humano. La fosfatasa alcalina cataliza la transfosforilación del *p*-nitrofenilfosfato (*p*-NPP) a *p*-nitrofenol (*p*-NP) en presencia del tampón de transfosforilación, 2-amino-2-metil-1-propanol (AMP). La reacción se mejora mediante el uso de iones de magnesio y cinc. El cambio en la absorbancia a 410 nm debido a la formación de *p*-NP es directamente proporcional a la actividad del Atellica CH Alkaline Phosphatase, Concentrated (ALP_2c), ya que los demás reactantes están presentes en cantidades que no limitan la cinética de la reacción. El cambio se mide mediante una técnica de cinética bicromática (410/478 nm). Precisión $\leq 1.5\%$.

- **Albúmina:** se utilizó Atellica® CH Albumin (Alb). El ensayo Atellica® CH Albumin (Alb) se basa en el método de Doumas, Watson y Biggs y en él se usa verde de bromocresol (BCG) como colorante de reacción. La albúmina en suero o plasma se une cuantitativamente al BCG y forma un complejo albúmina-BCG que se mide como reacción de punto final a 596/694 nm. Precisión ≤ 2.4 .
- **PTH intacta:** se realizó mediante Atellica® IM Intact Parathyroid Hormone (PTH). El ensayo Atellica® IM Intact Parathyroid Hormone (PTH) está previsto para uso diagnóstico *in vitro* a la hora de realizar la determinación cuantitativa de hormona paratiroidea intacta en plasma y suero humanos con el Atellica® IM Analyzer. El ensayo Atellica IM PTH es un inmunoensayo no competitivo de doble punto

utilizando la tecnología quimioluminiscente directa, que emplea cantidades constantes de 2 anticuerpos anti PTH humana. El primer anticuerpo, en el reactivo Lite, es un anticuerpo de ratón anti PTH N terminal marcado con éster de acridinio. El segundo anticuerpo es un anticuerpo de ratón frente al extremo C-terminal de la PTH humana, ligado a biotina y acoplado a partículas de látex paramagnéticas recubiertas de estreptavidina en la fase sólida. Existe una relación directa entre la cantidad de PTH intacta presente en la muestra del paciente y la cantidad de unidades relativas de luz (RLU) detectadas por el sistema. Precisión $\leq 7.8\%$.

- **25- hidroxicolecalciferol:** se analizó mediante quimioluminiscencia automatizada (inmunoensayo competitivo directo) para la determinación cuantitativa del total de 25(OH)2D en suero (D2 + D3) en un Liaison® XL Analyzer (DiaSorin, Stillwater, Minnesota, USA). Las muestras de suero son sometidas a una fase de pretratamiento para desnaturalizar la VDBP. Estas muestras tratadas se neutralizan después con un tampón y se añade un anticuerpo policlonal de oveja anti-25OH vitamina D marcado con un derivado del éster de acridinio. Tras una fase de incubación se añaden partículas magnéticas enlazadas a 25(OH)2D. Después de una nueva fase de incubación las partículas magnéticas se capturan utilizando un imán. Tras una fase de lavado y la adición de reactivos desencadenantes, la luz emitida por el acridinio está inversamente relacionada con la concentración de 25(OH)2D de la muestra. La sensibilidad es de 4 ng/ml; Especificidad: reacción cruzada con 1,25(OH)2D 8%, 1,3 % con el

3-epimero. Reproducibilidad intra e interensayo <8 y <12 % respectivamente. Se considera suficiencia de vitamina D un valor >20 ng/ml y se recomienda así mismo no pasar de 60 ng/ml. La metodología utilizada se encuentra estandarizada frente al material de referencia estándar certificado SRM 972a. El laboratorio de Bioquímica del HUMV dónde se han medido los niveles de 25(OH)2D participa en el programa de control externo de calidad DEQAS y posee el sello de calidad de dicha entidad.

- **1,25 dihidroxi-Vitamina D (D2+D3):** se analizó mediante inmunoensayo específico de tipo competitivo en placa recubierta (KAP 1921 de DiaSource, DiaSource Immunoassays, Belgium). En una primera fase del ensayo, previo a la incubación en placa, existe una fase de extracción en fase solida (columna) con solventes orgánicos para eliminar interferencias. Tras la elución de la muestra pretratada se procede a la incubación en placa recubierta de anticuerpos específicos anti-1,25-dihidroxi vitamina D para la reacción competitiva con un concentrado de 1,25 vitamina D conjugado. La cantidad se determina espectrofotométricamente (absorbancia de los puntos de la curva y de las muestras) siendo la absorbancia inversamente proporcional a la concentración en la muestra. Según técnica, sensibilidad 0,8 pg/ml; <0,01 % de reactividad cruzada con otras formas de vitamina D (25-OH-Vitamina D y 24-25-dihidroxivitamina D); reproducibilidad intra e interensayo: <15 %.
- **FGF23 intacto:** el FGF23 en su forma intacta se determinó en plasma EDTA mediante inmunoensayo tipo sándwich (ELISA), Human FGF23

(intact) ELISA kit (Immunotopics Inc, San Clemente, CA, USA). Durante la primera incubación, el FGF23 se une al Ac monoclonal anti-FGF23. El Ac no unido se elimina mediante lavado. Después del lavado, se añade biotina conjugada. La biotina no unida se elimina mediante lavado. En el siguiente paso, se añade la solución de estreptavidina-HRP, se vuelve a lavar y se añade el sustrato cromogénico TMB. Finalmente, la reacción se detiene mediante la adición de un reactivo de parada y se mide la absorbancia a 450 nm. La concentración de FG23 es directamente proporcional a la absorbancia en cada pocillo de muestra. Sensibilidad 1.5 pg/ml. El CV% intraensayo es de <4% e interensayo de <9%. Este ensayo no presenta reactividad cruzada con fragmentos del FGF23 N-terminal (25-179) o C-terminal (180-251). El fabricante no aporta datos de valores de referencia indicativos. FGF23 intacto también se determinó mediante otro método basado en quimioluminiscencia automatizada en un Liaison XL Analyzer®. En este caso la sensibilidad es de 5 pg/ml y la reproductibilidad intra e interensayo fue de <4 y <8% respectivamente.

- **FGF23 C-terminal:** el FGF23 C-terminal se determinó en plasma EDTA mediante inmunoensayo tipo sándwich (ELISA) (Biomedica Bi-20702). La sensibilidad fue de 0.1 pmol/l/ (1 pg/ml = 0.133 pmol/l) y la variabilidad intra e interensayo fue <10% y <12%. respectivamente. Valores de referencia en sujetos aparentemente sanos 1.3 pmol/l.

3.2.5 Técnicas genéticas

En el estudio genético se analizó un panel personalizado de 12 genes relacionados con el metabolismo del fósforo: ALPL, CLCN5, CYP27B1, DMP1 (fosfoproteína ácida de matriz dentinaria 1), ENPP1, FAM20C, FGF23, FGFR1, GNAS, PHEX, SLC34A3 y VDR). Se prepararon bibliotecas de ADN con el kit SureSelect QXT (Agilent) que posteriormente fueron secuenciadas en la plataforma MiSeq (Illumina). La identificación de las bases se estableció con un Q30 > 90 % y las lecturas se alinearon con el genoma de referencia GRCh37. Para el filtrado y análisis de variantes se utilizó la plataforma Alissa (Agilent). El análisis de variación del número de copias se realizó con el software DECoN v1.0.2 (148).

3.2.6 Interpretación de resultados genéticos

La clasificación de las variantes genéticas detectadas se realizó de acuerdo con las guías del American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) (149):

- I: variable benigna.
- II: variable probablemente benigna.
- III: variante de significado incierto.
- IV: variante probablemente patogénica.
- V: variante patogénica

Además de realizar una comparación y búsqueda de las variantes halladas en grandes bases de datos poblaciones de mutaciones genéticas (Human Gene Mutación Database, ClinVar...), se utilizó la clasificación CADD (Combined annotation-dependent depletion) como algoritmo de predicción para medir el

carácter nocivo de las variantes genéticas. Se espera que una puntuación CADD >15 identifique las variantes potencialmente dañinas en el genoma (150).

3.2.7 Análisis estadístico

Para evaluar la distribución normal de las variables cuantitativas se utilizó el test de Kolmogorov-Smirnov. Los datos se expresaron con la media y su desviación estándar (DE).

Para detectar las diferencias entre dos variables cuantitativas se utilizó la t de Student (si la distribución es normal), la prueba de Mann-Whitney (como prueba no paramétrica), la prueba de ANOVA para comparar varios grupos con distribución normal o el test de Friedman como prueba no paramétrica. Para detectar diferencias entre dos variables cualitativas la Chi² o el Test de Fisher en los análisis de una N muy pequeña (<5). Se consideró una significación estadística el valor $p < 0,05$. Los datos fueron analizados con el programa estadístico SPSS (Statistical Package for social Sciences, Chicago, IL, USA).

4. RESULTS

Electronic charts of 1287 patients with at least one measurement of $P \leq 2.2$ mg/dL were reviewed, looking for data suggestive of secondary causes of hypophosphatemia. Of the 1287 patients, 68.2% were male and 31.8% were female with a median age of 47 years (range 18–56 years) and a mean age of 45 ± 8 years.

Up to 51.47% (n=663 patients) had other analyses with normal P levels (>2.4 mg/dl) and no record of underlying pathology, so further studies were not done in this group.

Of the sample, 8.39% (n=108) presented a single determination of P between 2.1 and 2.4 mg/dl, without any relevant finding in the clinical history or any other altered investigations.

After chart review, causes of secondary hypophosphatemia were detected in 17.40% (n= 224 patients), including toxic habits, history of illnesses, and drug intake, that could be causing hypophosphatemia at the time of the analyses. We excluded 14 patients (1.09%) due to death at the time of the medical record review.

Alcoholism caused chronic hypophosphatemia in 3.34% (n=43), making it the most frequent cause. Primary hyperparathyroidism was diagnosed in 2.95% (n=38) and secondary hyperparathyroidism associated to vitamin D deficiency in 1.01% (n=13).

Of 210 patients alive with chronic hypophosphatemia, 1.70% (n=23) had received a kidney transplant, 0.39% (n=5) had undergone a bone marrow transplant and n=1 (0.08%) a lung transplant (those cases escaped our algorithms for exclusion criteria). Among the cases of drug-related

hypophosphatemia, 2.02% (n=26) were taking antiretroviral drugs, particularly tenofovir (n=22). Hypophosphatemia occurred in 1.16% (n=15) of cases following intravenous iron administration. Additionally, 1.79% cases (n=23) had previously undergone bariatric surgery and, 0.39% of cases (n=5) had hypophosphatemia secondary to an eating disorder.

Less frequent causes included 3 patients (0.23%) with severe acute hypophosphatemia caused by diabetic ketoacidosis, whereas 0.23% (n=3) had inflammatory bowel disease.

Miscellaneous causes were identified in 0.93% (n=12): 1 patient was diagnosed with Familial Hypocalciuric Hypercalcemia (FHH), 1 with Osteogenesis Imperfecta (OI), 2 were under renal replacement therapy, 1 developed a hungry bone syndrome following a parathyroidectomy performed because of a parathyroid gland carcinoma, 2 cases of hypophosphatemia had been detected in patients with acute psychotic decompensation, 1 had a pheochromocytoma and, another patient had Wilson's disease. Three other patients had KDIGO grade 3b-grade 4/A2 renal disease and no further studies of hypophosphatemia were carried out.

In 22.69% patients (n=292) we did not identify a clear cause of hypophosphatemia after chart review, so they were initially selected for further clinical, biochemical, and genetic assessment in the outpatient clinic. However, of the 292, we later excluded 103 patients (14.22%): 8% (n=103) because we were not able to contact them after several attempts by telephone or by surface mail and, 6.22% (n=80) because they refused to participate in the study. Finally, 109 patients (8.47%) were assessed in the clinic.

4.1 Clinical variables

Of the 109 patients evaluated in the clinic, 76% (n=83) were men and 24% (n=26) were women, with a median age of 50 years (range 18-55)

Table 4. Medical history of patients evaluated in the clinics.

	Frequency N (%)
Tobacco	
- Active smoker	18 (17)
- Never smoker	58 (53)
- Former smoker	33 (30)
Alcohol	
- Daily consumption	22 (20)
- Weekly consumption	34(31)
- No consumption	53 (49)
Cardiovascular risk factors	
- Hypertension	37 (34)
- Dyslipidemia	34 (31)
- Diabetes Mellitus type II	11(10)
Developmental issues* *	
- Prematurity	1 (1)
- Growth retardation	1 (1)
Calcified tissues problems	
- History of fracture*	49 (45)
- Dental problems	34 (31)

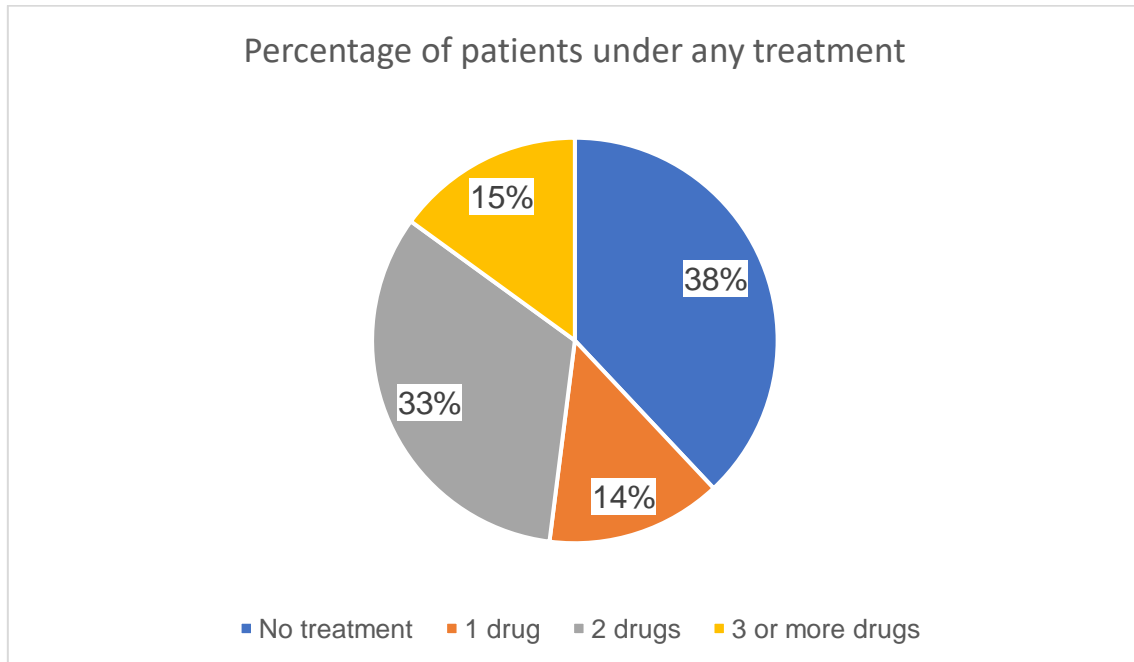
* None of the patients had low birth weight. Changes in menarche were not documented in any of the women.

** The fracture mechanism was traumatic in 48 patients and spontaneous in 1.

Out of all 109 patients, 51 did not have any children, while the other 53% had between one and three children. Of them, one had renal dysgenesis, one sensorineural hearing loss, and one epilepsy since childhood.

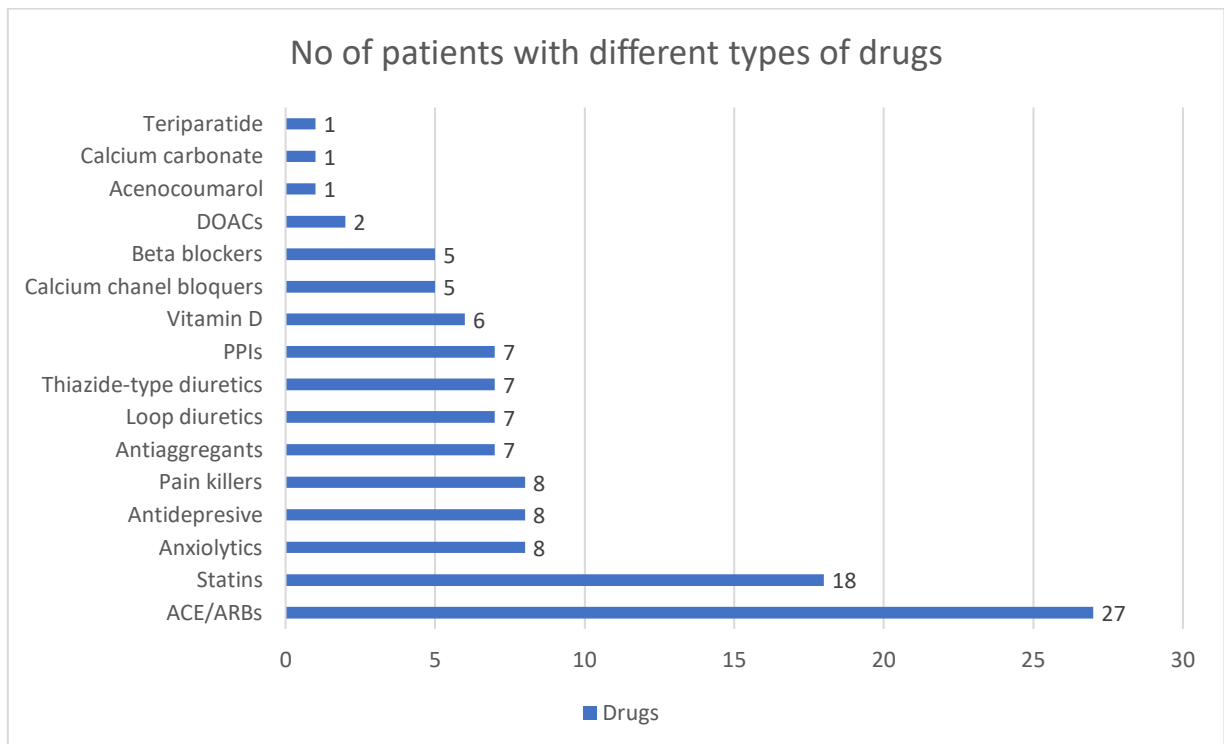
An examination of the current medication list revealed that 38% were without any treatment and 62% were on drug therapy.

Figure 9. Percentages of patients receiving drug therapy.



The most frequent treatments were ACE inhibitors and angiotensin II receptor blockers (ARBs), followed by statins and diuretics, including loop diuretics and thiazide-type diuretics.

Figure 10: Bar graph representing the number of patients with different types of treatments.



DOACs (direct oral anticoagulants), PPIs (proton pump inhibitors), ACE/ARBs (angiotensin-converting enzyme inhibitors/ angiotensin II receptor blockers)

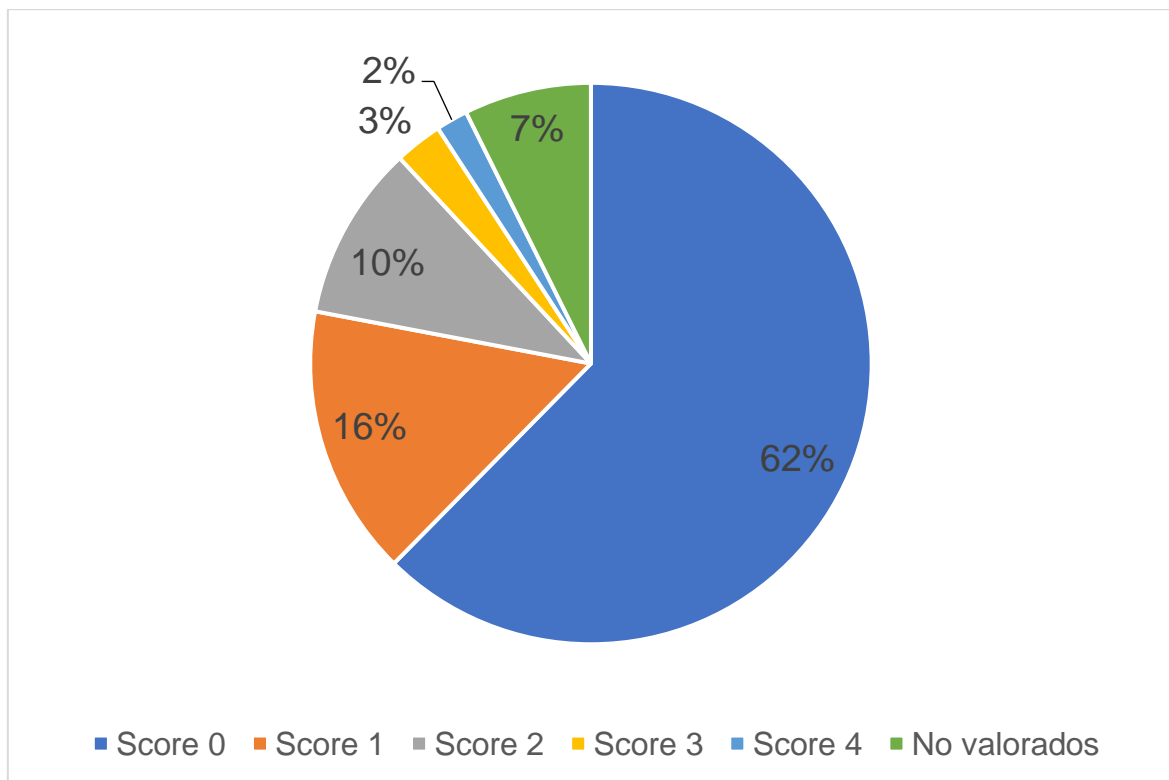
Regarding the family history, the father's height could be recalled in 85 patients, with a mean of 172 cm (SD \pm 7), and the mother's height in 83, with a mean of 163 cm (SD \pm 5).

In 14% of cases (n=15), there was a family history of potentially relevant abnormalities: a first-degree relative of 7 patients had sensorineural hearing loss, the mother and maternal grandmother of one patient had degenerative bone disease with early death without a definitive diagnosis, 1 patient had a first degree relative with Charcot Marie-Tooth disease, 1 with a nephrectomy for unidentified cause, 1 with Addison disease, 1 with alpha 1 antitrypsin deficiency, 1 with

hemochromatosis, 1 with recurrent nephrolithiasis, 1 with sarcoidosis and, 1 with minor thalassemia.

In the physical examination, we applied Beighton scale to assess joint hypermobility. In total, we evaluated 101 patients (92.7%). The majority of patients achieved a score of 0 (n=68). None had a score over 4 (Figure 11).

Figure 11. Ligamentous hypermobility assessed using the Beighton scale.



Among the 109 patients, 7% were diagnosed with minor facial dysmorphic features. Specifically, 6 had a high-arched palate, 1 had prognathism, and another patient had retrognathia. Missing some dental pieces were reported in 39%.

Heart murmurs were detected in 2%. Skeletal thorax abnormalities were present in 16% of the patients: 11 had scoliosis, 7 had thoracic kyphosis, 3 had lumbar hyperlordosis, and 1 had pectus excavatum.

We also found had mild leg deformities in 11% of patients, 9 had genu varum, and 3 genu valgus.

Other specified deformities found on physical examination included a short neck, mild gynecomastia, and camptodactyly (each in one patient).

4.2 Biochemical tests

Of the 109 patients, only 39 had serum $P \leq 2.3$ mg/dL at the time of clinic assessment (referred to as "Serum P at study visit"). The mean serum level of P was 2.6 mg/dL with a range of 1.5 mg/dL to 4.4 mg/dL.

No relationship was found between the serum P at the visit and cardiovascular risk factors (hypertension, dyslipidemia, type 2 diabetes mellitus), although the mean serum level was slightly higher in those with cardiovascular risk factors.

We did not find significant differences in current P levels between patients with and without a history of fractures or dental problems ($p > 0.05$). (Table 5).

Table 5. Mean P levels (mg/dL) according to personal history.

	P levels at visit (mg/dl)
Hypertension	
- Yes (n=37)	2.6 (0.6)
- No (n=72)	2.5 (0.5)
Dyslipidemia	
- Si (n=34)	2.6 (0.4)
- No (n=74)	2.6 (0.6)
Diabetes Mellitus type II	
- Si (n=11)	2.7 (0.5)
- No (n=98)	2.6 (0.5)
History of fractures	
- Yes (n=49)	2.5 (0.6)
- No (n=60)	2.6 (0.5)
Dental problems	
- Yes (n=49)	2.6 (0.7)
- No (n=60)	2.6 (0.5)

Mean (SD)

Calcium, albumin, magnesium, PTH, vitamin D, hydroxyvitamin D, thyroid function, and renal function tests were performed. Creatinuria, phosphaturia, and calciuria were also analysed (Table 6).

Table 6. Mean values and standard deviation (SD) of various biochemical parameters.

	N	Mean	SD
Calcium (mg/dL)	109	9.8	0.5
Albumin (g/dL)	109	4.6	0.2
Magnesium (mg/dL)	109	1.9	0.2
PTH (mg/dL)	109	68	45
25(OH)2D (ng/mL)	109	21.9	8.4
1,25(OH)2D (pg/mL)	56	28.6	11.0
TSH (mg/dL)	92	1.6	1.0
Calciuria (mg/dL)	25	12.5	6.0
Urinary creatinine (mg/dL)	26	125	57
Urinary phosphorus (mg/dL)	26	58.	27

(PTH parathormone, TSH thyroid stimulating hormone)

Table 7. Levels of 25 hydroxyvitamin D (ng/mL), 1,25 hydroxyvitamin D (pg/mL) and FGF23 ELISA (pg/mL), FGF23 LIAISON (pg/mL), and cFGF23 (pg/mL) in the groups of patients with normal and low P levels at the study visit.

Parameters	N (%)		
	P>2.3 mg/dL (n=70)	P≤ 2.3 mg/dL (n=39)	All patients (n=109)
25 hydroxyvitamin D (ng/mL)			
>30	14 (20)	6 (15.4)	20 (18.3)
20-30	27(38.6)	18(46.2)	45 (41.3)
<20	29(41.4)	15(38.5)	44 (40.4)
1,25 hydroxyvitamin D (pg/mL)			
>66	0 (0)	0 (0)	0 (0)
26-66	17 (24.3)	15 (38.5)	32 (29.4)
≤25	11/15.7)	13(33.3)	24(22)
Intact FGF23 ELISA (pg/mL)			
>50	6 (8.6)	7 (17.9)	13 (11.9)
31–50	8 (11.4)	7 (17.9)	15 (13.8)
≤30	12 (17.1)	16 (41)	28 (25.7)
Intact FGF23 LIAISON (pg/mL)			
>50	10 (14.3)	8 (20.5)	18 (16.5)
31–50	4 (5.7)	4 (10.3)	8 (7.3)
≤30	0 (0)	0 (0)	0 (0)

We also explored the relationship between serum P and other biochemical parameters (PTH, Calcium, TSH, free T4, vitamin D, 25-hydroxyvitamin D, and magnesium). No statistically significant correlations were found ($p>0.05$) (table 8).

Table 8. Lack of correlation between P levels and other biochemical parameters

	Phosphorus (mg/dL)	
	Correlation (r)	P value
PTH (mg/dL)	0.26	0.11
Calcium (mg/dL)	0.27	0.10
TSH (mg/dL)	-0.20	0.28
25-hydroxyvitamin D (ng/mL)	0.03	0.88
1,25-hydroxyvitamin D (pg/mL)	0.18	0.19
Magnesium (mg/dL)	0.25	0.12

There were moderate correlations between plasma calcium and plasma creatinine levels ($r=0.563$, $p=0.003$) and, between the levels of calcium and magnesium ($r=0.428$, $p=0.001$).

Intact FGF23 was determined by ELISA in 61% of cases ($n=56$). In 55% ($n=50$) the C-terminal fraction of FGF23 (cFGF23) was also measured by ELISA. Besides, intact FGF23 was estimated by using a chemiluminescence assay (Liaison) in 26 cases.

We analysed the relationship between hypophosphatemia and serum FGF23 levels measured by the three methods in patients and in 9 controls.

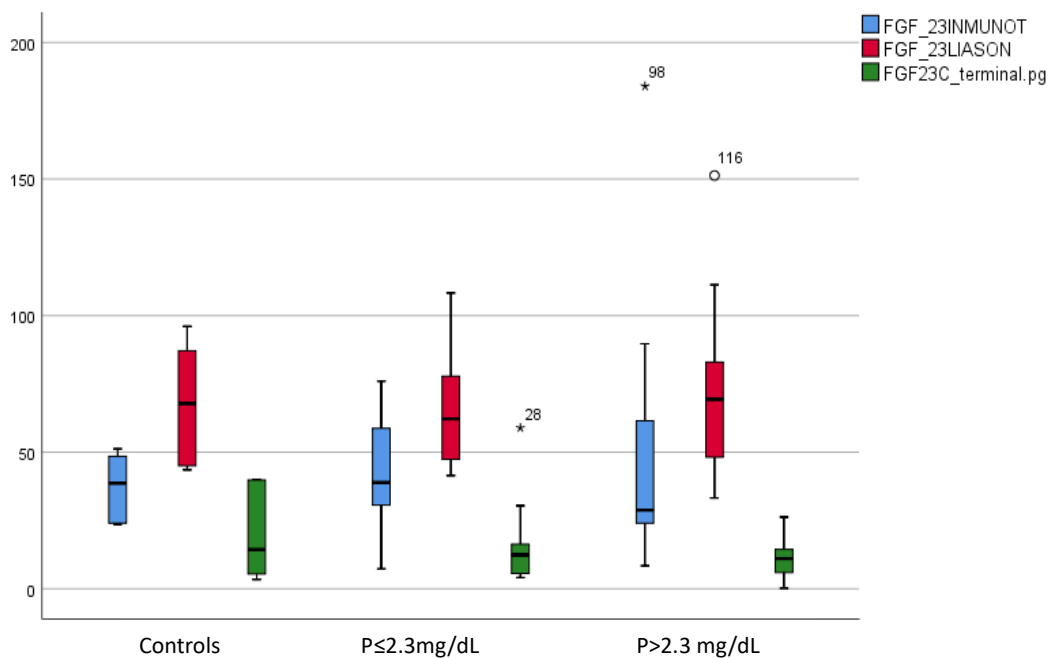
No statistically significant association was found between FGF23 measurements by either method and plasma P levels in study cases or in controls ($p>0.05$).

Table 9. Comparison among intact FGF23 ELISA, intact FGF23 LIAISON, and cFGF23 in patients with serum P \leq 2.3 mg/dL, patients with serum P $>$ 2.3 mg/dL, and controls. P values represent the statistical significance of the comparison of FGF23 levels, measured with each of the three methods, across the three groups.

	FGF23 ELISA (pg/mL)			FGF23 LIAISON (pg/mL)			cFGF23 (pg/mL)		
	N	Mean (SD)	p	N	Mean (SD)	p	N	Mean (SD)	p
Controls	9	36.0 (10,7)		6	67.9 (22.7)		9	15.1 (14.7)	
P \leq 2,3 mg/dL	20	36.9 (19.7)		9	66.4 (22.7)		18	13.1 (13.3)	
P $>$ 2,3 mg/dL	36	42.3 (33.1)		17	73.0 (30.3)		32	11.5 (7.3)	
Total	65	39.8 (27.1)	0.71	32	70.2 (26.5)	0.82	59	12.5 (10.5)	0.63

(SD) standard deviation

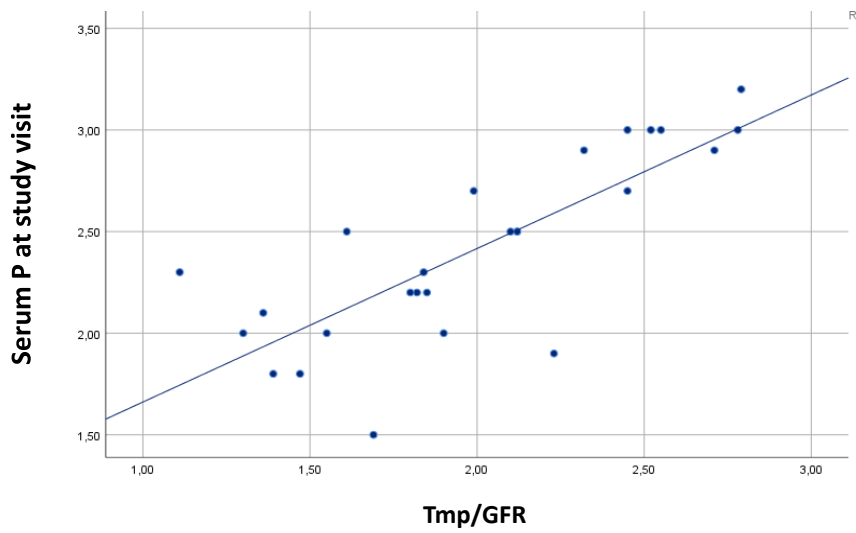
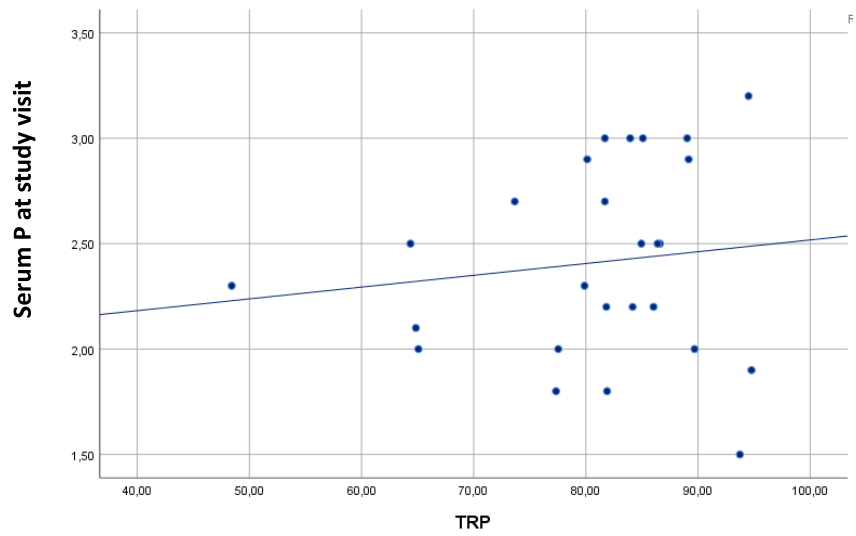
Figure 12. Serum FGF23 analysed with different methods in patients with hypophosphatemia at study visit, normal serum P at the study visit and in controls. The medians of the FGF23 Liaison values were greater than the medians of the FGF23 ELISA values. The median of the FGF23 Liaison controls (red) was 67.8, in the $P \leq 2.3$ mg/dL group 62.2, and in the $P > 2.3$ mg/dL group 69.4. The median of the FGF23 ELISA controls (blue) is 38.6, in the $P \leq 2.3$ mg/dL group is 38.9, and the $P > 2.3$ mg/dL group is 28.8. There is a greater variability of serum phosphate in the patient group than in the control group. There are two outliers with higher values that are represented by * and °.



We also calculated the tubular reabsorption rate (TRP) in 26 patients, obtaining a mean of 81.0% (SD 10.6). The maximum tubular reabsorption of phosphate for the glomerular filtration rate (T_{mp}/GFR) showed a mean value of 2.0 (SD 0.5).

There was not statistically significant correlation between the serum P levels and TRP ($p=0.53$). However, there was a positive correlation between serum P and T_{mp}/GFR ($p<0.01$).

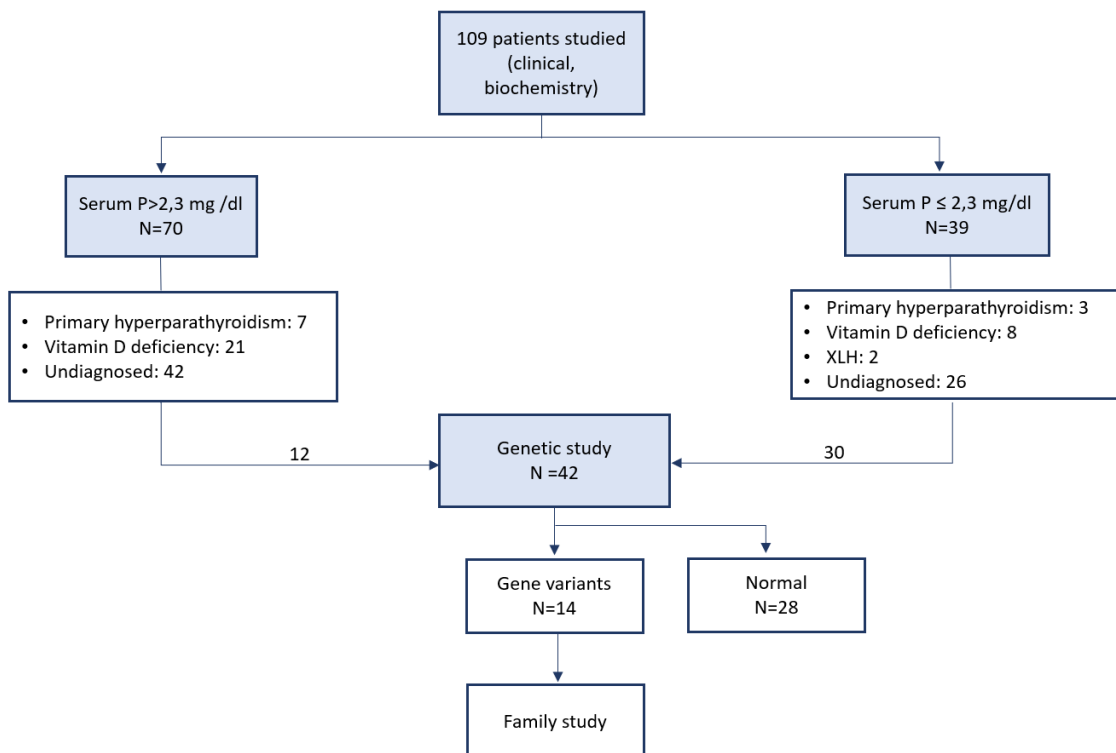
Figure 13. Correlation analysis between P and TRP and between serum P levels and Tmp/GFR. There is a statistically significant positive correlation ($r=0.794$) between serum P and Tmp/GFR levels. However, there is no correlation between serum P levels and TRP.



4.3 Genetic tests

Of the 109 patients, the genetic study was performed in 42 patients without a clear cause of hypophosphatemia: 30 (71,4%) of them had $P \leq 2.3 \text{ mg/dl}$ and 12 patients (28,6%) had $P > 2.3 \text{ mg/dl}$ at the study visit but previously showed unexplained low phosphorus levels. (Figure 14).

Figure 14. Flow diagram of the 109 individuals examined. At the time of the visit, 39 patients had serum P levels $< 2.3 \text{ mg/dL}$ and 70 patients had P levels $> 2.3 \text{ mg/dL}$. Clinical and biochemical tests showed 10 patients with primary hyperparathyroidism and 29 with vitamin D deficiency. Two patients had already been diagnosed with XLH. In the end, 42 patients were subject to a genetic study.



We identified 14 carriers of 13 novel variants of genes related to phosphate metabolism. Of them, 13 patients had a novel allelic variant that had not been previously reported. We did not identify potentially pathogenic variants in 28 patients.

The most commonly affected genes were SLC34A3 (n=3), VDR (n=3) and PHEX (n=2). One patient with low serum phosphorus without clear cause had a SLC34A3 variant classified as likely benign. Another patient with a SLC34A3 variant, classified as likely pathogenic, had mild hypercalciuria, a small kidney stone and a low serum phosphorus.

We could also identify variants in CYP27B1 (n=1), DMP1 (n=1), CLCN5 (n=1), SMAD3 (n=1), FGFR1 (n=1) and, ENPP1 (n=1) (Table 10).

Two patients with PHEX mutations were siblings and the oldest one had already been diagnosed of hypophosphatemic rickets. They had severe skeletal phenotype with short stature (132 and 135 cm, respectively) and, one of them had severe leg deformities that required corrective surgery. They had a novel variant classified as likely pathogenic. Apart from these two siblings, no other patient had a severe skeletal phenotype. Most patients were asymptomatic or had just mild manifestations. One patient with a SMAD variant had suffered from hip fracture after a minor trauma.

Table 10 shows the index patients with genetic variants and the biochemical parameters of each patient.

Table 11 shows the comparison of some of the most relevant biochemical parameters between patients with a positive genetic study and those with a negative genetic study.

We also compared the patients with a positive genetic study and the whole sample of patients studied at the study visit. P levels were lower in patients with a positive genetic study compared to the global group ($p < 0.01$). We did not find

any other statistically significant difference between both groups of patients regarding the variables analyzed.

Table 10. Index patients with genetic variants

Family	Sex	Age	Gene	Variant	CADD score	ACGM classification	Serum P at study visit, mg/dl	Lowest serum P mg/dl	Serum calcium mg/dl	PTH ng/ml	25(OH)D ng/ml	1,25(OH) ₂ D pg/ml	FGF23 pg/ml
1	F	52	SLC34A3	Tyr414Ter	40	LP	2.1	2.1	10	95	25	21	38
2	M	52	VDR	Ala303Ala ⁽¹⁾	-	VUS	2.3	2.3	10.7	69	30	46	52
3	M	49	CYP27B1	Arg104Trp	24.2	VUS	2.6	2.1	9.4	62	12	12	200
4	M	51	VDR	Asp65Gly	23.6	VUS	2.2	1.7	9.4	95	23	30	46
5	F	53	SLC34A3	Arg485His	27.2	LB	1.8	1.6	10.3	47	21	14	20
6	M	49	DPM1	Asp478Ala	22.7	VUS	2	1.9	9.2	56	31	-	6
7	M	43	SLC34A3	c.1094-14G>A (p.?) ⁽¹⁾	-	VUS	2.1	1.8	10.3	55	16	7	29
8	F	43	SMAD	Glu52Lys	25.9	VUS	2.7	2.1	9.7	59	36	-	7
9	M	41	CLCN5	Val699Ile	22.2	VUS	2	1.8	9.5	58	24	23	53
10	M	27	VDR	Met1	24	VUS	1.5	1.5	9.5	52	11	33	22
11	M	50	FGFR1	Ser219Phe	26.8	VUS	1.8	1.8	10.2	55	11	35	28
12a	F	32	PHEX	Phe654Ser		LP	2.2	2.2	9.6	85	8	19	89
12b(2)	F	33	PHEX	Phe654Ser	29.7	LP	1.7	1.9	9.2	100	25	28	50
13	F	44	ENNP1	His535Arg	25.5	VUS	2.3	2.1	8.1	38	26	71	36

(1) Possible splicing interference (2) patients 12a and 12b are siblings. CADD, Combined Annotation Dependent Depletion; VUS, variant of unknown significance; LP, likely pathogenic; LB, likely benign

Table 11: Biochemical parameters of patients with a positive genetic test, in comparison with those with a negative genetic study, and with the remaining patients studied (this is, those with negative genetic study plus those not subjected to genetic study).

	Patients with a positive genetic test (N=14)	Patients with negative genetic test (N=28)		All patients (N=95)	
	Mean (SD)	Mean (SD)	P value	Mean (SD)	P value
P at study visit (mg/dL)	2.1 (0.3)	2.3 (0.4)	P= 0.20	2.6 (0.5)	P<0,01
Calcium (mg/dL)	9.7 (0.4)	9.7 (0.3)	P=0.52	9.8 (0.5)	P=0,83
PTH (mg/dL)	63.2 (20.3)	53.5 (21.7)	P=0.17	68.8 (20.3)	P=0,44
25 hydroxyvitamin D (ng/mL)*	23.9 (11.5)	23.4 (6.7)	P=0.85	21.6 (8.0)	P=0,47
1,25 hydroxyvitamin D (pg/mL)**	27.2 (10.9)	26.7 (10.3)	P=0.88	29.0 (11.2)	P=0,62
FGF23***	45.6 (46.1)	29.4 (12.3)	P=0.09	38.7 (20.9)	P=0,60

* 25 hydroxyvitamin D (ng/mL) was measured in 12 patients. **25 hydroxyvitamin D (ng/mL) was measured in 44 patients.

***FGF23 was measured in 42 patients.

4.4 Family segregation studies

We also studied 10 relatives of six patients with gene variants: 8 of them also carried the variant present in the index individual (Table 12).

None of the relatives had any symptoms. Only one relative with a variant in CLCN5 had P levels <2.3mg/dL. All relatives were asymptomatic.

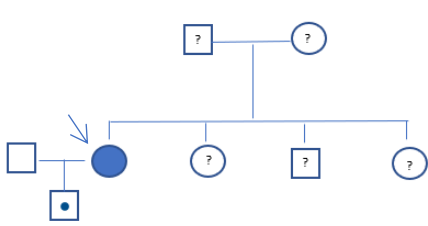
Pedigree details are shown in Figure 15. We did family segregation studies in Family 1, Family 3, Family 6, Family 7, Family 8 and Family 9.

Table 12. Index patients and relatives with mutations

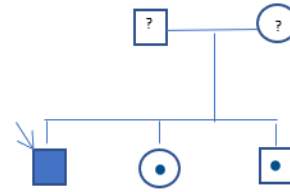
Gene	Index Patients, n	Relatives, n
SLC34A3	3	3
VDR	3	1
PHEX	2*	
CYP27B1	1	2
DMP1	1	1
CLCN5	1	1
SMAD	1	
FGFR1	1	
ENPP1	1	
All	14	8

(* Two sisters with known XLH)

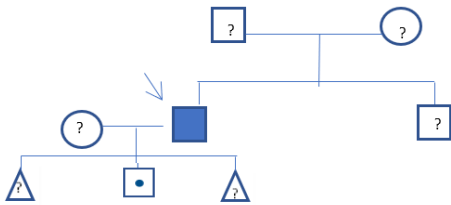
Figure 15. Pedigrees of patients with genetic variants



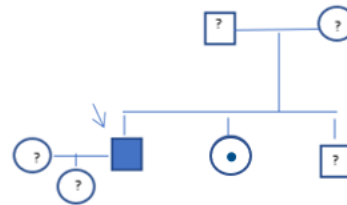
Family 1: p.Tyr414Ter. SLC34A3 gene.



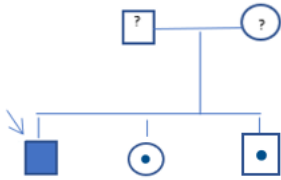
Family 3: p.Arg104Trp. CYP27B1 gene



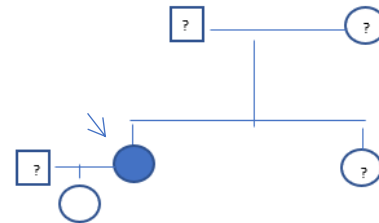
Family 4: p.Asp65Gly. VDR gene



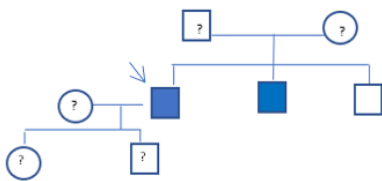
Family 6 p.Asp478Ala. DPM1 gene



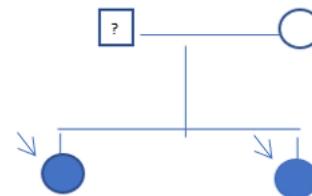
Family 7: c.1094-14G>A. SLC34A3 gene



Family 8: p.Glu52Lys. SMAD3 gene



Family 9: p.Val699Ile. CLCN5 gene



Family 12: Phe654Ser, PHEX gene

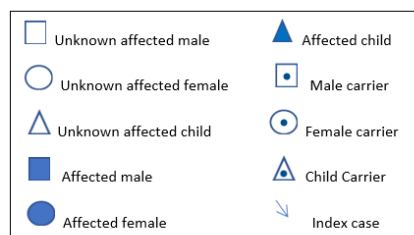


Table 13. Individuals with gene variants and family members studied.

Case	Family	Sex, M/F	Age	Gene	Variant	Serum Phosphorus at study visit, mg/dl	Lowest serum phosphorus, mg/dl	TRP	TmP/GFR mg/dl	Serum calcium mg/dl	Ca/Cr mg/mg	PTH	25(OH)D, ng/ml	1,25(OH)2D pg/ml	FGF23 pg/ml	ACMG classification
1	1	F	52	SLC34A3	Tyr414*	2.1	2.1	64.8	1.4	10.0	0.24	95	25	21	38	Likely pathogenic
2	1	M	17	SLC34A3	Tyr414*	3.5	3.5	88.9	3.4	10.1	0.01	36	42	-	-	Likely pathogenic
3	2	M	52	VDR	Ala303Ala ⁽¹⁾	2.3	2.3	-	-	10.7	-	69	30	46	52	Variant of uncertain significance
4	3	M	49	CYP27B1	Arg104Trp	2.6	2.1	-	-	9.4	-	62	12	12	200	Variant of uncertain significance
5	3	M	61	CYP27B1	Arg104Trp	3.1	3.1	71.8	2.2	9.6	0.16	87	12	50	35	Variant of uncertain significance
6	3	F	58	CYP27B1	Arg104Trp	3.5	3.5	93.0	3.8	10	0.04	84	6	14	62	Variant of uncertain significance
7	4	M	51	VDR	Asp65Gly	2.2	1.7	65.1	1.3	9.4	-	95	23	30	46	Variant of uncertain significance
8	4	M	18	VDR	Asp65Gly	4.5	4.5	83.9	3.8	10.4	0.13	44	22	33	37	Variant of uncertain significance
9	5	F	53	SLC34A3	Arg485His	1.8	1.6	-	-	10.3	-	47	21	14	20	Likely benign
10	6	M	49	DPM1	Asp478Ala	2	1.9	65.1	1.3	9.2	0.06	56	31	-	6	Variant of uncertain significance
11	6	F	37	DPM1	Asp478Ala	2.8	2.8	86.4	2.3	9.4	0.06	60	28	53	32	Variant of uncertain significance
12	7	M	43	SLC34A3	c.1094-14G>A (p.?)	2.1	1.8	-	-	10.3	-	55	16	7	29	Variant of uncertain significance

Case	Family	Sex, M/F	Age	Gene	Variant	Serum Phosphorus at study visit, mg/dl	Lowest serum phosphorus, mg/dl	TRP	TmP/GFR mg/dl	Serum calcium mg/dl	Ca/Cr mg/mg	PTH	25(OH)D, ng/ml	1,25(OH)2D pg/ml	FGF23 pg/ml	ACMG classification
13	7	F	51	SCL34A3	c.1094-14G>A (p.?)	2.5	2.5	81.1	2.0	9.3	0.16	76	13	31	33	Variant of uncertain significance
14	7	M	48	SCL34A3	c.1094-14G>A (p.?)	2.7	2.7	87.7	2.4	9.6	0.05	38	14	12	30	Variant of uncertain significance
15	8	F	43	SMAD	Glu52Lys	2.7	2.1	-	-	9.7	-	59	36	-	7	Variant of uncertain significance
16	8	F	15	Negative	-	3.7	3.7	90.7	3.7	10	0.08	34	13	-	31	-
17	9	M	41	CLCN5	Val699Ile	2	1.8	-	-	9.5	-	58	24	23	53	Variant of uncertain significance
18	9	M	33	CLCN5	Val699Ile	2.2	2.1	76.5	1.7	9.3	0.08	76	13	9	34	Variant of uncertain significance
19	9	M	37	Negative	-	2.7	2.7	99.7	2.7	9.7	0.11	89	15	41	47	-
20	10	M	27	VDR	Met1	1.5	1.5	93.7	1.7	9.5	0.19	52	11	33	22	Variant of uncertain significance
21	11	M	50	FGFR1	Ser219Phe	1.8	1.8	89.7	1.9	10.2	0.02	55	11	35	28	Variant of uncertain significance
22	12a	F	32	PHEX	Phe654Ser	2.2	2.2	86.0	1.8	9.6	0.06	85	8	19	89	Likely pathogenic
23	12b(2)	F	33	PHEX	Phe654Ser	1.7	1.9	94.7	2.2	9.2	0.1	100	25	28	50	Likely pathogenic
24	13	F	44	ENNP1	His535Arg	2.3	2.1	94.5	2.8	8.1	-	38	26	71	36	Variant of uncertain significance

4.5 Global results of patients with chronic hypophosphatemia

After the clinical and analytical assessment of 109 patients in the clinic, several cases of secondary causes of hypophosphatemia were identified.

Serum P normalized to levels >2.3 mg/dL in 70 of 109 patients. Among those 70 patients, 38 patients normalized the serum P level and had no other relevant abnormalities in the biochemical analyses performed at the time of the assessment. Thus, after adding those patients to those identified in the previous stage of the study, the overall percentage of patients with hypophosphatemia who had normal P at some time point raised from 51.6 (n=663) to 54.5% (n=701).

Considering globally the whole study, we identified 10 patients with primary hyperparathyroidism and 29 with secondary hyperparathyroidism associated with vitamin D deficiency. In one case, hypophosphatemia was due to chronic alcohol consumption.

In 14 patients (1.1%), the genetic analyses revealed variants in genes related to P metabolism (including 2 patients with normal serum phosphorus at study visit).

Despite of conducting an extensive study, including a genetic analysis, we did not find the cause of hypophosphatemia in 17 patients (1.3%).

Table 14 shows the secondary causes identified before carrying out the clinical evaluation and after the dedicated study visit.

Table 14. Causes of secondary hypophosphatemia detected pre-assessment and post-assessment.

Hypophosphatemia causes	Frequency No. (%) Prior to clinical and analytical assessment	Frequency No. (%) After clinical and analytical assessment
Other analyses with normal P levels	663 (51.5)	701 (54.5) *
Single determination of P (2.1- 2.4 mg/dl)	108 (8.4)	108 (8.4)
Non- participation	183 (14.2)	183 (14.2)
Primary hyperparathyroidism	38 (3.0)	48 (3.7)
Secondary hyperparathyroidism /Vitamin D deficiency	13 (1.0)	42 (3.3)
Chronic alcoholism	43 (3.3)	44 (3.4)
Kidney transplant	23 (1.8)	23 (1.8)
Bone marrow transplant	5 (0.4)	5 (0.4)
Lung transplant	1 (0.1)	1 (0.1)
Antiretroviral drugs	26 (2.0)	26 (2.0)
Bariatric surgery	23 (1.8)	23 (1.8)
Eating disorders	5 (0.4)	5 (0.4)
Intravenous iron infusion	15 (1.2)	15 (1.2)
Diabetic Ketoacidosis	3 (0.2)	3 (0.2)
Inflammatory bowel disease	3 (0.2)	3 (0.2)
Others	12 (0.9)	12 (0.9)
Deceases	14 (1.1)	14 (1.1)
Unidentified cause	109 (8.5)	17 (1.3)
Genetic cause	-	14 (1.1)
Total	1287 (100%)	1287 (100%)

*Including the n=38 patients who normalized the serum P level in the investigations performed at the time of the assessment.

5.DISCUSSION

5.1 Identification of 13 novel variants of genes related to phosphate metabolism.

SLC34A3 and VDR were the genes with the highest frequency of variants. Heterozygous VDR variants were found in 3 individuals, c.909C>T (p.Ala303Ala) (patient 2), c.194 A>G (p.Asp65Gly) (patient 4) and c.3G>A (P.Met1?) (patient 10). Genetic analysis revealed two novel heterozygous variants in SLC34A3, c.1242C>G (p. Tyr414Ter) (patient 1) and c.1094-14G>A (p.?) (patient 7). We also identified a heterozygous variant previously described, c.1454G>A (p. Arg485His) (patient 5) in the SLC34A3 gene. It appears included in the Human Gene Mutation Database (HGMD®) as pathogenic and in ClinVar as benign (152,169,170).

SLC34A3 codes for a NaPi-IIc renal cotransporter protein. Heterozygous loss-of-function mutations of the SLC34A3 gene are associated with FGF23-independent hypophosphatemic rickets with hypercalciuria (OMIM #241530) (129,153). Heterozygous individuals may show mild hypophosphatemia, nephrocalcinosis and nephrolithiasis secondary to hypercalciuria (151). This disorder associates normal levels of 25-hydroxyvitamin D and elevated 1.25 (OH)₂D (Table 2.2) (154). However, none of the patients in the study with heterozygous variants in SLC34A3 had elevated 1.25-(OH)₂D levels and all of them had vitamin D insufficiency. Low vitamin D levels may mask some biochemical features of hypophosphatemic rickets with hypercalciuria. There are previous reports of homozygous patients for a SLC34A3 mutation (c. 586G>A; p.G196R) with normal phosphorus levels, low vitamin D levels and nephrolithiasis(155).

In terms of segregation analyses, Patient 1 had a 18-year-old son who carried the SLC34A3 nonsense variant. The son had a phosphate level of 3.5 mg/dL, which may be difficult to interpret until he finishes his growth period. Additionally, two relatives of Patient 7 were found to have the same SLC34A3 mutation. Their serum phosphate levels were close to the lower limit of the normal range (2.5 and 2.7 mg/dL), while TRP was inappropriately normal and TmP/GFGR was below normal limits. Unfortunately, we could not study any relative of patient 5, who carried a missense variant.

VDR encodes the vitamin D receptor, which mediates the classical effects of vitamin D metabolites, specifically 1,25(OH)₂D, the most active one. Biallelic pathogenic variants of VDR, either single-nucleotide or structural, cause vitamin D-dependent rickets type IIA (156) (OMIM#277440). This defect leads to resistance to its ligand, resulting in a compensatory response with higher circulating levels of 1,25(OH)₂D (157).

Three patients with mild hypophosphatemia and without clinical features of hypophosphatemic rickets were heterozygous carriers of variants of unknown significance (VUS) in VDR. All of them had 1,25(OH)₂D levels in the normal range. The insufficient 25-hydroxyvitamin D levels in one patient may have contributed to hypophosphatemia. None of the three variants found in the VDR gene (p.Ala303Ala, p.Met1?, p.Asp65Gly) have been previously described and their significance remains uncertain. A son of the index patient of family 4 was a carrier of the variant, but he had normal serum phosphate.

PHEX gene encodes an endopeptidase expressed mainly in osteoblasts, osteocytes, and teeth. Deleterious variants cause X-linked hypophosphatemic

rickets (XLH, OMIM #307800). More than 800 different mutations have been found. So far 574 mutations in PHEX gene have been described in HGMD® (170). In most cases, it is inherited with a X-linked dominant pattern, but about one third of patients may bear “*de novo*” mutations (131,158,169). Two siblings were identified with a previously unreported PHEX variant (p. Phe654Ser). They showed important clinical manifestations, including short stature, bone deformities, and musculoskeletal pain because of rickets, despite having been treated with active vitamin D and phosphate supplements since childhood.

XLH is the most genetic cause of clinically significant hypophosphatemia. The frequency has been estimated at 1/25,000 live births (129), but the prevalence would be considerably lower in our study (roughly 1/200,000). Although we may have missed some patients, the number is unlikely to rise until the commonly reported in the literature. Therefore, XLH seemed to be less frequent in our region than in other regions, such as the United Kingdom, with an estimated prevalence of 15 cases per million people (159). However, the prevalence in the present study is not notably discrepant from the prevalence reported in other countries. Rafaelsen et al. identified about four cases per million inhabitants (1 per-60,000 children) in Norway (160).

Loss-of-function variants of PHEX are associated with increased levels of FGF23. Burosumab, a humanized anti-FGF23 monoclonal antibody has been shown to improve rickets manifestations compared to conventional treatment with phosphate and active vitamin D. The rickets severity score (RSS), radiographic changes, growth, and biochemical abnormalities were used to evaluate rickets (131,161). Clinical studies have shown increases in renal phosphate reabsorption, serum phosphate, and 1,25(OH)₂D levels in XLH adults treated

with burosumab at a dose of 1mg/kg for 4 weeks (162,163). Burosumab has been approved since 2018 in several countries and, its availability will certainly improve the prognosis of patients in the future (164).

CYP27B1 encodes the 1 α -hydroxylase that converts 25-hydroxyvitamin D into 1,25(OH)₂D (142). Mutations in this gene cause vitamin D-dependent rickets type IA (OMIM#264700). One patient (Family 2) had a novel p. Arg104Trp variant in the CYP27B gene. The low circulating levels of 1,25(OH)₂D are consistent with diminished enzymatic activity. The 25(OH)₂D levels would be expected to be in the upper range of normal, in contrast to the 25(OH)₂D levels of this patient, who had serum levels of 12 ng/ml. The levels of FGF23 serum were unexpectedly increased (200 pg/ml), despite the fact that 1,25(OH)₂D is known to regulate FGF23 expression positively (19).

We analysed the genetic inheritance patterns of two siblings of Family 2, who shared the same mutation as the index patient. However, despite having the same mutation, the siblings had normal levels of phosphate and FGF23. Although the cause of hypophosphatemia in this patient is unclear, it could be attributed to a rise in FGF23. Various disorders can rise FGF23 levels, including Tumour-Induced Osteomalacia (TIO). TIO is a paraneoplastic syndrome caused by mesenchymal tumours, which is associated with abnormal secretion of FGF23. (95,165). It should be highlighted that we did not find any evidence of oncogenic osteomalacia in this patient.

DMP1 gene encodes an extracellular matrix protein predominantly expressed in osteocytes and odontoblasts. DMP1 is critical for osteoblast–osteocyte differentiation, which is important for mineralization. DMP1 deficiency

increases FGFG23 levels by poorly understood mechanisms, but it could probably be attributed to enhanced FGFR signaling in osteocytes (166,167). Homozygous mutations of the DMP1 gene cause autosomal recessive hypophosphatemic rickets type 1 (OMIM#241520), which may be associated with enthesopathy (166).

The patient with a novel variant in the DMP1 gene (p. Arg478Ala) had FGF23 levels in the normal range. In addition, we identified a sibling who was a carrier of the mutation and with normal FGF23 levels. Both findings argue against the pathogenic role of the Arg478Ala variant.

Recessive X-linked hypophosphatemic rickets 1 or Dent disease type 1 (OMIM #300554) are caused by mutations in CLCN5. This gene encodes a voltage-dependent chloride/proton exchanger. Dent disease type 1 is a renal tubular dysfunction, characterized by proteinuria, hypercalciuria, nephrocalcinosis, nephrolithiasis, and hypophosphatemia, among other manifestations (168). So far 275 pathogenic variants in CLCN5 gene have been described in HGMD® (170). An index patient in Family 9 and his brother, both with persistent hypophosphatemia, carried a CLCN5 variant (p.Val699Ile). Another noncarrier brother had normal serum phosphorus. Thus, although classified as VUS, the missense Val699Ile variant seems to be functionally relevant.

SMAD gene encodes the SMAD protein, which regulates the transcription of TGF β target genes (17,171,172). TGF β is known to have complex effects on skeletal homeostasis (173,174). SMAD3 mutations have been associated with 5-10% of cases of Loeys–Dietz syndrome, known as LDS subtype 3

(OMIM#603109) (175,176). Loeys- Dietz syndrome is characterized by late onset vascular abnormalities, such as aneurysms, and arterial tortuosity, and usually less prominent skeletal manifestations, including pectus carinatum/excavatum, scoliosis, joint laxity or arachnodactyly (173,177,178).

A 43-year-old woman with spondyloarthropathy and an atraumatic hip fracture carried a VUS (p.Glu52Lys) in the SMAD3 gene. The patient presented intermittent hypophosphatemia, with serum values between 2.1 and 2.7 mg/dl. A patient's daughter who did not carry the variant had normal phosphate. Although there is no reported association between SMAD3 variants and hypophosphatemia, these findings would favour the functional relevance of the variant and further exploration is warranted.

Pathogenic variants of FGFR1, the gene encoding fibroblast growth factor receptor 1, have been associated with Osteoglophonic dysplasia (OMIM#166250), a rare autosomal dominant disorder characterized by several skeletal phenotypes such as craniosynostosis, facial dysmorphism, failure of tooth eruption, and variable short stature (179). We identified a new variant (p.Ser219Phe) of FGFR1 in a 50-year-old man with asymptomatic persistent hypophosphatemia (1.8–2.4 mg/dL) and low TRP. The variant was present in 16% of reads, thus suggesting mosaicism. Some patients with FGFR1 variants also present hypophosphatemia, due to increased urinary losses. The mechanism has not been fully elucidated, but it may include the klotho-induced conversion of FGFR1 into a FGF23 receptor (180). Mosaic status in this patient might explain the mild phenotype.

Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 (ENPP1) catalyzes the hydrolysis of ATP/GTP to AMP/GMP, generating extracellular inorganic pyrophosphate. Alkaline phosphatase hydrolyses pyrophosphate to form two phosphate molecules that can be incorporated into the mineralizing osteoid. Overall, ENPP1 activity increases phosphate levels by providing a source of phosphate, as well as decreasing its urinary elimination by inhibiting FGF23. Pathogenic variants of ENPP1 cause autosomal recessive hypophosphatemic rickets type 2 (OMIM#613312), which is associated with bone mineralization defects due to renal phosphate wasting. Mutations in ENPP1 may have various phenotypic consequences, such as arterial calcification, hearing loss, ossification of the posterior longitudinal ligament, or pseudoxanthoma elasticum (181). Patients with mutations in ENPP1 may have normal or increased levels of FGF23 (182).

In summary, we identified 14 individuals with persistent hypophosphatemia presumably related to allelic variants of genes related to phosphate metabolism. Most patients in this study had no symptoms or had minor ailments, such as enthesopathy and slightly premature tooth loss, which cannot be linked with certainty to hypophosphatemia. Although there is an association between the identified mutations and low serum phosphate levels, their clinical significance remains uncertain in most cases.

Family segregation may reveal the pathogenic significance in some cases. Due to the fact that both sisters had typical clinical features of rickets as well as the same genetic mutation, it is highly likely that the mutation in the PHEX gene is pathogenic. The CLCN5 variant may cause hypophosphatemia in family 9 since

two siblings with the same mutation have low P levels, making it a likely pathogenic variant.

Even though the son's blood showed normal P levels during growth, the hypophosphatemia and symptoms in the index patient of family 1 could be due to a mutation in the SLC34A3 gene.

The mutation found in SLC34A3 in family 7 could also be relevant. Unlike the index case, who displayed abnormal P values, the siblings had P values within the lower limit of normal. This discrepancy can be attributed to the phenomenon of variable expressivity.

The variant found in the SMAD3 gene is certainly interesting. Despite the fact that the association between hypophosphatemia and SMAD3 has not been described, the genetic variant it could have some pathological significance as SMAD3 regulates the transcription of several genes involved in bone homeostasis.

The variant p.Ser219Phe of FGFR1 presents mosaicism, which could explain mild hypophosphatemia and the fact that the patient is asymptomatic.

In the case of family 2 variants with CYP27B variants, family 4 with VDR variants, and family 6 with DMP1 variants, familial segregation suggested that these mutations are probably not the direct cause of hypophosphatemia in index cases.

5.2 Causes of secondary chronic hypophosphatemia

Causes of hypophosphatemia in hospitalized patients include a number of conditions, with severe sepsis, diabetic ketoacidosis, major surgery, or trauma

being the primary disorders that lead to hypophosphatemia (60,63). However, we are not aware of previous studies about the prevalence and causes of chronic hypophosphatemia in outpatients.

Our data show that persistent hypophosphatemia in outpatients has a variety of causes. Prior to the specific evaluation in a dedicated outpatient consultation, we found that excessive alcohol consumption, primary hyperparathyroidism, organ transplant, and some drug therapies (antiretrovirals and parenteral iron) are among the most frequent causes in the tertiary hospital setting.

However, after evaluation in consultations, additional 29 patients with secondary hyperparathyroidism/vitamin D deficiency, 10 patients with primary hyperparathyroidism, and 1 patient with chronic alcohol consumption were detected (Table 13).

Chronic alcohol intake causes tubular dysfunction producing Fanconi-like syndrome. This dysfunction may be reversible after cessation of alcohol (79,107). The patient identified in the consultations had fluctuations in P levels, likely depending on periods with higher or lower alcohol intake.

The association of hypophosphatemia with solid organ transplantation was common, and it may be due to multiple causes, such as surgery, the use of diuretics, antibiotics, or immunosuppressants. Besides tubular dysfunction, in the first weeks after renal transplantation there is an increase in FGF23 due to unclear mechanisms, leading to hypophosphatemia (58,83,84).

Two of the 10 patients with primary hyperparathyroidism had a hyperfunctioning parathyroid adenoma and they underwent surgery after

confirmation by cervical ultrasound and Tc-99m MIBI scintigraphy. These two patients had a history of recurrent renal colic and long-lasting asthenia. We recommended annual PTH control for the other 8 patients with a slight rise in PTH, who likely have a mild normocalcemic hyperparathyroidism.

Nephrolithiasis is present in about 20% to 60% in several series of patients with symptomatic primary hyperparathyroidism (183,184). Nevertheless, only a small percentage of individuals having kidney stones, up to 5%, are affected by primary hyperparathyroidism (185). In our study, 20% of the patients diagnosed with primary hyperparathyroidism in the clinical evaluation, had kidney stones.

According to the results obtained in our study, renal stones secondary to parathyroid disease in the general population is probably underdiagnosed. Therefore, it is essential to carry out a metabolic assessment in patients with recurrent bilateral nephrolithiasis. A repeated, but frequently neglected recommendation.

Regarding the 29 patients with vitamin D deficiency, increased sun exposure was advised in 9 patients with serum 25-hydroxyvitamin D levels between 20 and 30 ng/ml without any other analytical alteration, and vitamin D supplementation was initiated in the remaining 20 patients with levels below 20 ng/ml.

It is well known that vitamin D deficiency is very common in high latitude countries with reduced Ultraviolet B (UVB) radiation (186). The incidence and global prevalence of vitamin D deficiency in the population at risk is frequently underestimated (187).

5.3 Serum FGF-23 levels interpretation

Currently, there are no available international standardized methods to measure intact FGF23. Several studies comparing techniques have shown substantial differences depending on the method used (188,189).

The optimal established cut-off point for intact FGF23 is 30 pg/mL. Levels above 30 pg/mL, along with a serum phosphate level lower than 2.5 mg/dl, may suggest a condition caused by an excess of FGF23. Prior studies found that this cut-off has a sensitivity of 100% and a specificity of 82% in identifying patients with FGF23-related hypophosphatemic rickets, regardless of their vitamin D levels (190,191).

In our study, intact FGF23 was determined in EDTA plasma using a sandwich immunoassay (ELISA from Immunotopics Inc). Intact FGF-23 was also determined by automated chemiluminescence on a Liaison XL Analyzer®.

Differences between studies may have several causes, both technical and biological. In two studies previously conducted, the Immunotopics iFGF23 assay results were approximately 20% less than those obtained with the Liaison assay. In addition, there are differences across individual patients and groups of patients (188,190). In our study, 35.8% of patients with $P \leq 2.3$ levels had FGF23 levels >30 pg/mL using the ELISA assay. A similar proportion of patients (30.8% had FGF23 levels >30 pg/mL when analyzed by Liaison XL, a difference that was not statistically significant (Table 7).

As shown in Figure 12, the FGF23 values measured by ELISA are slightly lower in the control group, low serum phosphorus group, and normal serum

phosphorus group than those measured by Liaison, but without statistically significant differences.

The cFGF23 levels were not different among the control, low serum phosphorus, and normal serum phosphorus groups. Based on the study results, it can be inferred that the cFGF23 levels are equivalent in both groups.

Our study has some limitations. When the patients were selected to carry out the evaluation in the consultations, patients with hypophosphatemia attributable to other causes were excluded. However, we cannot completely rule out that they had some type of genetic alteration causing or contributing to hypophosphatemia. Another limitation was the number of patients that we were unable to contact or did not want to participate in the study. Also, we were not able to obtain a urine sample from all patients with genetic alterations, so certain biochemical parameters (TRP, Tmp) could not be calculated. It is difficult to interpret the genetic variants found in some patients in the present series. In some cases, the absence of enough relatives with and without hypophosphatemia limited the possibility of performing segregation analysis and, consequently, the elucidation of the pathogenicity of some allelic variants.

6. CONCLUSIONS

1. After an extensive search for patients with chronic hypophosphatemia, we identified 14 patients with genetic variants related to phosphorus metabolism. This represents 12.8% of patients appointed for a dedicated consultation, after excluding obvious causes of hypophosphatemia.
2. The phenotype of most patients was mild, but two patients with XLH due to novel PHEX mutations had marked skeletal abnormalities. There was a wide variability among clinical manifestations of patients, which could be explained by differences in expression, without being able to rule out the influence of epigenetic factors.
3. Although the frequency of XLH seems to be lower in our region than in other populations, our data are consistent with the conception that XLH is the most common cause of genetic hypophosphatemia with an overt musculoskeletal phenotype.
4. This study also highlights the ability of new DNA sequencing techniques to identify genetic variants presenting in cases with a mild phenotype.
5. The family segregation analysis contributes to elucidating the significance of the potentially pathogenic variants identified in the index case. Most of the mutations detected in our study are variants of uncertain significance, many of them previously unreported. Therefore, pending further investigations in other populations and/or functional studies, the presence of these mutations in relatives with similar manifestations, along the absence of the mutations in healthy relatives, can help interpret the pathogenicity of the variants.
6. The most frequent non-genetic causes of chronic hypophosphatemia in outpatients were alcohol consumption, primary hyperparathyroidism,

secondary hyperparathyroidism due to vitamin D deficiency, organ transplant, and some drug therapies (antiretrovirals and parenteral iron).

7. REFERENCES

1. Iheagwara OS, Ing TS, Kjellstrand CM, Lew SQ. Phosphorus, phosphorous, and phosphate. *Hemodial Int.* 2013;17(4):479-82.
2. Goretti Penido M, Alon US. Phosphate homeostasis and its role in bone health. *Pediatr Nephrol.* 2012;27(11):2039-2048
3. Dahir K, Roberts MS, Krolczyk S, Simmons JH. X-Linked Hypophosphatemia: A New Era in Management. *J Endocr Soc.* 2020;4(12):bvaa151
4. Xu H, Collins JF, Bai L, Kiela PR, Ghishan FK. Regulation of the human sodium-phosphate cotransporter NaPi-IIb gene promoter by epidermal growth factor. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001; 280(3): C628–C36.
5. Xu H, Uno JK, Inouye M, Xu L, Drees JB, Collins JF, Ghishan FK. Regulation of intestinal NaPi-IIb cotransporter gene expression by estrogen. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003;285(6):G1317-24.
6. Stauber A, Radanovic T, Stange G, Murer H, Wagner CA, Biber J. Regulation of intestinal phosphate transport. II. Metabolic acidosis stimulates Na(+)-dependent phosphate absorption and expression of the Na(+)-P(i) cotransporter NaPi-IIb in small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005;288(3):G501-6
7. Hernando N, Myakala K, Simona F, Knöpfel T, Thomas L, Murer H, Wagner CA, Biber J. Intestinal Depletion of NaPi-IIb/Slc34a2 in Mice: Renal and Hormonal Adaptation. *J Bone Miner Res.* 2015;30(10):1925-37.
8. Radanovic T, Wagner CA, Murer H, Biber J. Regulation of intestinal phosphate transport. I. Segmental expression and adaptation to low-P(i) diet of the type IIb Na(+)-P(i) cotransporter in mouse small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005;288(3):G496-500.

9. Alizadeh Naderi AS, Reilly RF. Hereditary disorders of renal phosphate wasting. *Nat Rev Nephrol.* 2010;6(11):657-65.
10. Marks J. The role of SLC34A2 in intestinal phosphate absorption and phosphate homeostasis. *Pflugers Arch.* 2019;471(1):165-173.
11. Knopfel T, Pastor-Arroyo EM, Schnitzbauer U, Kratschmar DV, Odermatt A, Pellegrini G, et al. The intestinal phosphate transporter NaPi-IIb (Slc34a2) is required to protect bone during dietary phosphate restriction. *Sci Rep.* 2017;7(1):11018.
12. Candéal E, Caldas YA, Guillén N, Levi M, Sorribas V. Intestinal phosphate absorption is mediated by multiple transport systems in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2017;312(4):G355-G366.
13. Segawa H, Aranami F, Kaneko I, Tomoe Y, Miyamoto K. The roles of Na/Pi-II transporters in phosphate metabolism. *Bone.* 2009;45 Suppl 1:S2-7.
14. Blaine J, Chonchol M, Levi M. Renal control of calcium, phosphate, and magnesium homeostasis. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2015;10(7):1257-72.
15. Murer H, Forster I, Biber J. The sodium phosphate cotransporter family SLC34. *Pflugers Arch.* 2004;447(5):763-7
16. Fukumoto S. Phosphate metabolism and vitamin D. *Bonekey Rep.* 2014; 3:497
17. Santos F, Fuente R, Mejia N, Mantecon L, Gil-Peña H, Ordoñez FA. Hypophosphatemia and growth. *Pediatr Nephrol.* 2013;28(4):595-603
18. KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of chronic kidney disease mineral and bone disorder (CKD-MBD). *Kidney Int.* 2009;76(Suppl 113):S3- S130.

19. Portales-Castillo I, Simic P. PTH, FGF23, Klotho and Vitamin D as regulators of calcium and phosphorus: Genetics, epigenetics and beyond. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022;13:992666
20. Georgiadou E, Marketou H, Trovas G, Dontas I, Papaioannou N, Makris K, Galanos A, Papavassiliou AG. Effect of Calcitriol on FGF23 Level in Healthy Adults and its Dependence on Phosphate Level. *In Vivo*. 2017;31(1):145-150.
21. Thakker RV. Calcium-sensing receptor: Role in health and disease. *Indian J Endocrinol Metab*. 2012;16(Suppl 2):S213-6
22. Farrow EG, White KE. Recent advances in renal phosphate handling. *Nat Rev Nephrol*. 2010;6(4):207-17
23. Bacic D, Lehir M, Biber J, Kaissling B, Murer H, Wagner CA. The renal Na⁺/phosphate cotransporter NaPi-IIa is internalized via the receptor-mediated endocytic route in response to parathyroid hormone. *Kidney Int*. 2006;69(3):495-503
24. Beck-Nielsen SS, Mughal Z, Haffner D, Nilsson O, Levtchenko E, Ariceta G, et al. FGF23 and its role in X-linked hypophosphatemia-related morbidity. *Orphanet J Rare Dis*. 2019;14(1):58.
25. Dastghaib S, Koochpeyma F, Shams M, Saki F, Alizadeh A. New concepts in regulation and function of the FGF23. *Clin Exp Med*. 2023;23(4):1055-1066.
26. Tiosano D, Hochberg Z. Hypophosphatemia: the common denominator of all rickets. *J Bone Miner Metab*. 2009;27(4):392-401.
27. Urakawa I, Yamazaki Y, Shimada T, Iijima K, Hasegawa H, Okawa K, et al. Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature*. 2006;444(7120):770-4

28. Bacchetta J, Bardet C, Prié D. Physiology of FGF23 and overview of genetic diseases associated with renal phosphate wasting. *Metabolism*. 2020;103S:153865.
29. Antonucci DM, Yamashita T, Portale AA. Dietary phosphorus regulates serum fibroblast growth factor-23 concentrations in healthy men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(8):3144-9
30. Richter B, Faul C. FGF23 actions on target tissues-with and without Klotho. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018; 9:189
31. Kinoshita Y, Fukumoto S. X-Linked Hypophosphatemia and FGF23-Related Hypophosphatemic Diseases: Prospect for New Treatment. *Endocr Rev*. 2018;39(3):274-291.
32. Sass MR, Wewer Albrechtsen NJ, Pedersen J, Hare KJ, Borbye-Lorenzen N, Kiss K, et al. Secretion of parathyroid hormone may be coupled to insulin secretion in humans. *Endocr Connect*. 2020;9(7):747-754
33. Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, Lubert Stryer. *Bioquímica*. [versión española por José M. Macarulla]. 6ª ed. Barcelona: Reverté, 2007. 18: 502-529
34. **«Columna vertebral de fosfato»**. [Internet]. **National Human Genome Research Institute (NHGRI)**. **January 20, 2023**.
35. Gaasbeek A, Meinders AE. Hypophosphatemia: an update on its etiology and treatment. *Am J Med*. 2005;118(10):1094-101
36. Kowaltowski, A. J., R. F. Castilho and A. E. Vercesi. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett* 2001; 495(1-2): 12-15.
37. Magne D, Bluteau G, Faucheux C, Palmer G, Vignes-Colombeix C, Pilet P, et al. Phosphate is a specific signal for ATDC5 chondrocyte maturation and apoptosis-associated mineralization: possible implication of apoptosis in the

- regulation of endochondral ossification. *J Bone Miner Res.* 2003;18(8):1430-42.
38. Millan JL. The role of phosphatases in the initiation of skeletal mineralization. *Calcif Tissue Int.* 2013; 93 (4):299–306.
39. Michigami T, Ozono K. Roles of Phosphate in Skeleton. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019;10:180.
40. Balcerzak M, Hamade E, Zhang L y col. The roles of annexines and alkaline phosphatase in mineralization process. *Acta Bichim Pol.* 2003;50(4):1019-38.
41. Solomon DH, Browning JA, Wilkins RJ. Inorganic phosphate transport in matrix vesicles from bovine articular cartilage. *Acta Physiol (Oxf).* 2007;190(2):119-25.
42. Bourguine A, Pilet P, Diouani S, Sourice S, Lesoeur J, Beck-Cormier S, et al. Mice with hypomorphic expression of the sodium-phosphate cotransporter PiT1/Slc20a1 have an unexpected normal bone mineralization. *PLoS One.* 2013;8(6):e65979
43. Yadav MC, Simão AM, Narisawa S, Huesa C, McKee MD, Farquharson C, Millán JL. 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;26(2):286-97.
44. Suchacki KJ, Morton NM, Vary C, Huesa C, Yadav MC, Thomas BJ, Turban S, Bunker L, Ball D, Barrios-Llerena ME, Guntur AR, Khavandgar Z, Cawthorn WP, Ferron M, Karsenty G, Murshed M, Rosen CJ, MacRae VE, Millán JL, Farquharson C. PHOSPHO1 is a skeletal regulator of insulin resistance and obesity. *BMC Biol.* 2020;18(1):149

45. Mansfield K, Pucci B, Adams CS, Shapiro IM. Induction of apoptosis in skeletal tissues: phosphate-mediated chick chondrocyte apoptosis is calcium dependent. *Calcif Tissue Int.* 2003;73(2):161-72.
46. Di Marco GS, Hausberg M, Hillebrand U, Rustemeyer P, Wittkowski W, Lang D, et al. Increased inorganic phosphate induces human endothelial cell apoptosis in vitro. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008;294(6):F1381-7.
47. Saraff V, Nadar R, Högler W. New Developments in the Treatment of X-Linked Hypophosphataemia: Implications for Clinical Management. *Paediatr Drugs.* 2020;22(2):113-121.
48. Beck GR Jr, Zerler B, Moran E. Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(15):8352-7.
49. Kim JM, Yang YS, Park KH, Oh H, Greenblatt MB, Shim JH. The ERK MAPK Pathway Is Essential for Skeletal Development and Homeostasis. *Int J Mol Sci.* 2019;20(8):1803.
50. Miyagawa K, Yamazaki M, Kawai M, Nishino J, Koshimizu T, Ohata Y, Tachikawa K, Mikuni-Takagaki Y, Kogo M, Ozono K, Michigami T. Dysregulated gene expression in the primary osteoblasts and osteocytes isolated from hypophosphatemic Hyp mice. *PLoS One.* 2014;9(4):e93840
51. Nishino J, Yamazaki M, Kawai M, Tachikawa K, Yamamoto K, Miyagawa K, Kogo M, Ozono K, Michigami T. Extracellular Phosphate Induces the Expression of Dentin Matrix Protein 1 Through the FGF Receptor in Osteoblasts. *J Cell Biochem.* 2017;118(5):1151-1163.
52. Rendenbach C, Yorgan TA, Heckt T, Otto B, Baldauf C, Jeschke A, et al. Effects of extracellular phosphate on gene expression in murine osteoblasts. *Calcif Tissue Int.* 2014;94(5):474-83.

53. Trautvetter U, Jahreis G, Kiehntopf M, Gleit M. Consequences of a high phosphorus intake on mineral metabolism and bone remodeling in dependence of calcium intake in healthy subjects - a randomized placebo-controlled human intervention study. *Nutr J.* 2016;15:7
54. Julien M, Magne D, Masson M, Rolli-Derkinderen M, Chassande O, Cario-Toumaniantz C, Cherel Y, Weiss P, Guicheux J. Phosphate stimulates matrix Gla protein expression in chondrocytes through the extracellular signal regulated kinase signaling pathway. *Endocrinology.* 2007;148(2):530-7.
55. Felsenfeld AJ, Levine BS. Approach to treatment of hypophosphatemia. *Am J Kidney Dis.* 2012;60(4):655-61.
56. Carpenter TO. The expanding family of hypophosphatemic syndromes. *J Bone Miner Metab.* 2012;30(1):1-9.
57. García Martín A, Varsavsky M, Cortés Berdonces M, Ávila Rubio V, Alhambra Expósito MR, Novo Rodríguez C, et al. Phosphate disorders and clinical management of hypophosphatemia and hyperphosphatemia. *Endocrinol Diabetes Nutr (Engl Ed).* 2020;67(3):205-215.
58. Koumakis E, Cormier C, Roux C, Briot K. The Causes of Hypo- and Hyperphosphatemia in Humans. *Calcif Tissue Int.* 2021;108(1):41-73.
59. Larsson L, Rebel K, Sorbo B. Severe hypophosphatemia—a hospital survey. *Acta Med Scand.* 1983;214:221–3.
60. Betro MG, Pain RW. Hypophosphataemia and hyperphosphataemia in a hospital population. *Br Med J.* 1972;1(5795):273-6.
61. Ryback RS, Eckardt MJ, Pautler CP. Clinical relationships between serum phosphorus and other blood chemistry values in alcoholics. *Arch Intern Med.* 1980;140:673–7.

62. King AL, Sica DA, Miller G, Pierpaoli S. Severe hypophosphatemia in a general hospital population. *South Med J*. 1987;80(7):831-5.
63. Daily WH, Tonnesen AS, Allen SJ. Hypophosphatemia incidence, etiology, and prevention in the trauma patient. *Crit Care Med*. 1990;18(11):1210-4.
64. Zazzo JF, Troche G, Ruel P, Maintenant J. High incidence of hypophosphatemia in surgical intensive care patients: efficacy of phosphorus therapy on myocardial function. *Intensive Care Med*. 1995;21: 826–31.
65. Barak V, Schwartz A, Kalickman I, et al. Prevalence of hypophosphatemia in sepsis and infection: the role of cytokines. *Am J Med*. 1998;104:40–7.
66. Salem RR, Tray K: Hepatic resection-related hypophosphatemia is of renal origin as manifested by isolated hyperphosphaturia. *Ann Surg* 2005, 241: 343-8.
67. Fiaccadori E, Coffrini E, Ronda N, et al. Hypophosphatemia in course of chronic obstructive pulmonary disease. Prevalence, mechanisms, and relationships with skeletal muscle phosphorus content. *Chest*. 1990;97:857–68.
68. Marik PE, Bedigian MK. Refeeding hypophosphatemia in critically ill patients in an intensive care unit. A prospective study. *Arch Surg*. 1996;131:1043–47.
69. Rosano GM, Kalantar-Zadeh K, Jankowska EA. Hypophosphatemia risk associated with ferric carboxymaltose in heart failure: A pooled analysis of clinical trials. *ESC Heart Fail*. 2023;10(2):1294-1304.
70. Cohen J, Kogan A, Sahar G, Lev S, Vidne B, Singer P: Hypophosphatemia following open heart surgery: incidence and consequences. *Eur J Cardiothorac Surg* 2004, 26: 306-10.

71. Vikrant S, Parashar A. Prevalence and severity of disordered mineral metabolism in patients with chronic kidney disease: A study from a tertiary care hospital in India. *Indian J Endocrinol Metab.* 2016;20(4):460-7.
72. Kim SY, Kim YN, Shin HS, Jung Y, Rim H. The influence of hypophosphatemia on outcomes of low- and high-intensity continuous renal replacement therapy in critically ill patients with acute kidney injury. *Kidney Res Clin Pract.* 2017;36(3):240-49.
73. Milionis HJ, Alexandrides GE, Liberopoulos EN, Bairaktari ET, Goudevenos J, Elisaf MS. Hypomagnesemia and concurrent acid-base and electrolyte abnormalities in patients with congestive heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2002;4(2):167–73.
74. Broman M, Wilsson AMJ, Hansson F, Klarin B. Analysis of Hypo- and Hyperphosphatemia in an Intensive Care Unit Cohort. *Anesth Analg.* 2017;124(6):1897-1905.
75. Brautbar N, Leibovici H, Massry SG. On the mechanism of hypophosphatemia during acute hyperventilation: evidence for increased muscle glycolysis. *Miner Electrolyte Metab* 1983; 9:45-50.
76. Relman AS. Metabolic consequences of acid-base disorders. *Kidney Int.* 1972;1(5):347-59.
77. Seldin DW, Tarail R. The metabolism of glucose and electrolytes in diabetic acidosis. *J Clin Invest.* 1950;29(5):552-65.
78. Gundersen K, Bradley RF, Marble A Serum phosphorus and potassium levels after intravenous administration of glucose; their use as diagnostic acids in diabetic and nondiabetic subjects with and without liver disease. *N Engl J Med.* 1954;250(13):547-54.

79. Funabiki Y, Tatsukawa H, Ashida K, Matsubara K, Kubota Y Uwatoko H, et al. Disturbance of consciousness associated with hypophosphataemia in a chronically alcoholic patient. *Int Med* 1998; 37 (11): 958-61
80. Elisaf MS, Siamopoulos KC. Mechanisms of hypophosphataemia in alcoholic patients. *Int J Clin Pract.* 1997;51(8):501-3
81. Palmer BF, Clegg DJ. Electrolyte Disturbances in Patients with Chronic Alcohol-Use Disorder. *N Engl J Med.* 2017;377(14):1368-1377
82. Marinella MA. Refeeding syndrome and hypophosphatemia. *J Intensive Care Med.* 2005;20(3):155-9
83. Dwyer K, Barone JE, Rogers JF. Severe hypophosphatemia in postoperative patients. *Nutr Clin Pract.* 1992;7(6):279-83.
84. Lim C, Tan HK, Kaushik M. Hypophosphatemia in critically ill patients with acute kidney injury treated with hemodialysis is associated with adverse events. *Clin Kidney J.* 2017;10(3):341-347.
85. Steiner M, Steiner B, Wilhelm S, Freund M, Schuff-Werner P. Severe hypophosphatemia during hematopoietic reconstitution after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2000;25(9):1015-6.
86. Berger MM, Rothen C, Cavadini C, Chiolerio RL. Exudative mineral losses after serious burns: a clue to the alterations of magnesium and phosphate metabolism. *Am J Clin Nutr.* 1997;65(5):1473-81
87. Baloch ZW, LiVolsi VA. Pathology of the parathyroid glands in hyperparathyroidism. *Semin Diagn Pathol.* 2013;30(3):165-77.

88. Pearce SH, Williamson C, Kifor O, Bai M, Coulthard MG, Davies M, et al. A familial syndrome of hypocalcemia with hypercalciuria due to mutations in the calcium-sensing receptor. *N Engl J Med.* 1996 10;335(15):1115-22.
89. Mechanick JI, Liu K, Nierman DM, Stein A. Effect of a convenient single 90-mg pamidronate dose on biochemical markers of bone metabolism in patients with acute spinal cord injury. *J Spinal Cord Med.* 2006;29(4):406-12
90. Body JJ, Lortholary A, Romieu G, Vigneron AM, Ford J. A dose-finding study of zoledronate in hypercalcemic cancer patients. *J Bone Miner Res.* 1999;14(9):1557-61
91. Hu MI, Glezerman IG, Leboulleux S, Insogna K, Gucalp R, Misiorowski W, et al. Denosumab for treatment of hypercalcemia of malignancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(9):3144-52.
92. Watkins KR, Rogers JE, Atkinson B. Tolerability of denosumab in metastatic solid tumor patients with renal insufficiency. *Support Care Cancer.* 2015;23(6):1657-62
93. Casella SJ, Reiner BJ, Chen TC, Holick MF, Harrison HE. A possible genetic defect in 25-hydroxylation as a cause of rickets. *J Pediatr.* 1994;124:929-93
94. Horwitz MJ, Tedesco MB, Sereika SM, Prebehala L, Gundberg CM, Hollis BW, et al. A 7-day continuous infusion of PTH or PTHrP suppresses bone formation and uncouples bone turnover. *J Bone Miner Res.* 2011;26(9):2287-97.
95. Jan de Beur SM, Minisola S, Xia WB, Abrahamsen B, Body JJ, Brandi ML, et al. Global guidance for the recognition, diagnosis, and management of tumor-induced osteomalacia. *J Intern Med.* 2023;293(3):309-328

96. Elderman JH, Wabbijn M, de Jongh F. Hypophosphataemia due to FGF-23 producing B cell non-Hodgkin's lymphoma. *BMJ Case Rep.* 2016;bcr2015213954
97. Leaf DE, Pereira RC, Bazari H, Jüppner H. Oncogenic osteomalacia due to FGF23-expressing colon adenocarcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(3):887-91
98. Nakahama H, Nakanishi T, Uno H, Takaoka T, Taji N, Uyama O, et al. Prostate cancer-induced oncogenic hypophosphatemic osteomalacia. *Urol Int.* 1995;55(1):38-40
99. Schouten BJ, Hunt PJ, Livesey JH, et al. FGF23 elevation and hypophosphatemia after intravenous iron polymaltose: a prospective study. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94:2332
100. Bishay RH, Ganda K, Seibel MJ. Long-term iron polymaltose infusions associated with hypophosphatemic osteomalacia: a report of two cases and review of the literature. *Ther Adv Endocrinol Metab.* 2017;8(1-2):14-19.
101. Huang LL, Lee D, Troster SM, Kent AB, Roberts MA, Macdougall IC, McMahon LP. A controlled study of the effects of ferric carboxymaltose on bone and haematinic biomarkers in chronic kidney disease and pregnancy. *Nephrol Dial Transplant.* 2018;33(9):1628-1635
102. Ifie E, Oyibo SO, Joshi H, Akintade O. Symptomatic hypophosphataemia after intravenous iron therapy: an underrated adverse reaction. *Endocrinol Diabetes Metab Case Rep.* 2019;(1):19-0065.
103. Evenepoel P, Meijers BK, de Jonge H, Naesens M, Bammens B, Claes K, Kuypers D, Vanrenterghem Y. Recovery of hyperphosphatonaemia and renal

- phosphorus wasting one year after successful renal transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008;3(6):1829-36.
104. Green J, Debby H, Lederer E, Levi M, Zajicek HK, Bick T. Evidence for a PTH-independent humoral mechanism in post-transplant hypophosphatemia and phosphaturia. *Kidney Int.* 2001;60(3):1182-96.
105. Wong PS, Barclay PL, Newman MJ, Johns EJ. The influence of acetazolamide and amlodipine on the intracellular sodium content of rat proximal tubular cells. *Br J Pharmacol.* 1994;112(3):881-6
106. Brown GR, Greenwood JK. Drug- and nutrition-induced hypophosphatemia: mechanisms and relevance in the critically ill. *Ann Pharmacother.* 1994;28(5):626-32
107. De Marchi S, Cecchin E, Basile A, Bertotti A, Nardini R, Bartoli E. Renal tubular dysfunction in chronic alcohol abuse-effects of abstinence. *N Engl J Med.* 1993;329(26):1927-34.
108. Yang YS, Peng CH, Sia SK, Huang CN. Acquired hypophosphatemia osteomalacia associated with Fanconi's syndrome in Sjögren's syndrome. *Rheumatol Int.* 2007;27(6):593-7.
109. O Owen S, Hatfield A, Letvak L. Imatinib and altered bone and mineral metabolism. *N Engl J Med.* 2006;355(6):627; author reply 628-9.
110. Kempe DS, Dërmaku-Sopjani M, Fröhlich H, Sopjani M, Umbach A, Puchchakayala G, Capasso A, Weiss F, Stübs M, Föller M, Lang F. Rapamycin-induced phosphaturia. *Nephrol Dial Transplant.* 2010;25(9):2938-44.
111. Izzedine H, Launay-Vacher V, Isnard-Bagnis C, Deray G. Drug-induced Fanconi's syndrome. *Am J Kidney Dis.* 2003;41(2):292-309

112. Hall AM, Bass P, Unwin RJ. Drug-induced renal Fanconi syndrome. *QJM*. 2014;107(4):261-9
113. Messiaen T, Deret S, Mougnot B, Bridoux F, Dequiedt P, Dion JJ, Makdassi R, Meeus F, Pourrat J, Touchard G, Vanhille P, Zaoui P, Aucouturier P, Ronco PM. Adult Fanconi syndrome secondary to light chain gammopathy. Clinicopathologic heterogeneity and unusual features in 11 patients. *Medicine (Baltimore)*. 2000;79(3):135-54.
114. Marik B, Bagga A, Sinha A, Khandelwal P, Hari P, Sharma A. Genetic and clinical profile of patients with hypophosphatemic rickets. *Eur J Med Genet*. 2022;65(8):104540.
115. Shah S, Chiang C, Sikaris K, Lu Z, Bui M, Zebaze R, Seeman E. Serum 25-Hydroxyvitamin D Insufficiency in Search of a Bone Disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;102(7):2321-2328.
116. Prentice A. Vitamin D deficiency: a global perspective. *Nutr Rev*. 2008 Oct;66(10 Suppl 2):S153-64
117. Maccubbin D, Tipping D, Kuznetsova O, Hanlon WA, Bostom AG. Hypophosphatemic effect of niacin in patients without renal failure: a randomized trial. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010;5(4):582-9.
118. Pivnick EK, Kerr NC, Kaufman RA, Jones DP, Chesney RW. Rickets secondary to phosphate depletion. A sequela of antacid use in infancy. *Clin Pediatr (Phila)*. 1995;34(2):73-8.
119. Wang Z, Lin YS, Zheng XE, Senn T, Hashizume T, Scian M, Dickmann LJ, Nelson SD, Baillie TA, Hebert MF, Blough D, Davis CL, Thummel KE. An inducible cytochrome P450 3A4-dependent vitamin D catabolic pathway. *Mol Pharmacol*. 2012;81(4):498-509

120. Shaker JL, Brickner RC, Findling JW, Kelly TM, Rapp R, Rizk G, Haddad JG, Schalch DS, Shenker Y. Hypocalcemia and skeletal disease as presenting features of celiac disease. *Arch Intern Med.* 1997;157(9):1013-6.
121. Dibble JB, Sheridan P, Losowsky MS. A survey of vitamin D deficiency in gastrointestinal and liver disorders. *Q J Med.* 1984 Winter;53(209):119-34.
122. Kumar R. Hepatic and intestinal osteodystrophy and the hepatobiliary metabolism of vitamin D. *Ann Intern Med.* 1983 May;98(5 Pt 1):662-3.
123. Peterson LA, Zeng X, Caufield-Noll CP, Schweitzer MA, Magnuson TH, Steele KE. Vitamin D status and supplementation before and after bariatric surgery: a comprehensive literature review. *Surg Obes Relat Dis.* 2016;12(3):693-702.
124. Aljuraibah F, Bacchetta J, Brandi ML, Florenzano P, Javaid MK, Mäkitie O, Raimann A, Rodriguez M, Siggelkow H, Tiosano D, Vervloet M, Wagner CA. An Expert Perspective on Phosphate Dysregulation With a Focus on Chronic Hypophosphatemia. *J Bone Miner Res.* 2022;37(1):12-20
125. Uday S, Hogler W. Nutritional rickets and osteomalacia in the twentyfirst century: revised concepts, public health, and prevention strategies. *Curr Osteoporos Rep.* 2017;15(4):293-302
126. Subramanian R, Khardori R. Severe hypophosphatemia. Pathophysiologic implications, clinical presentations, and treatment. *Medicine (Baltimore).* 2000;79(1):1-8
127. Amanzadeh J, Reilly RF Jr. Hypophosphatemia: an evidence-based approach to its clinical consequences and management. *Nat Clin Pract Nephrol.* 2006;2(3):136-48.
128. David W. Mazingo, Arthur D. Mason. Hypophosphatemia. *Total Burn Care (Fourth Edition)*, W.B. Saunders. 2012:325-331.

129. Michałus I, Rusińska A. Rare, genetically conditioned forms of rickets: Differential diagnosis and advances in diagnostics and treatment. *Clin Genet.* 2018;94(1):103-114
130. González-Lamuño D, Lorente Rodríguez A, Luis Yanes MI, Marín-Del Barrio S, Martínez Díaz-Guerra G, Peris P. Clinical practice recommendations for the diagnosis and treatment of X-linked hypophosphatemia: A consensus based on the ADAPTE method. *Med Clin (Barc).* 2022;159(3):152
131. Haffner D, Emma F, Eastwood DM, Duplan MB, Bacchetta J, Schnabel D, et al. Clinical practice recommendations for the diagnosis and management of X-linked hypophosphataemia. *Nat Rev Nephrol.* 2019;15(7):435-455
132. De Menezes Filho H, de Castro LC, Damiani D. Hypophosphatemic rickets and osteomalacia. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2006;50(4): 802-813
133. Bergwitz C, Jüppner H. FGF23 and syndromes of abnormal renal phosphate handling. *Adv Exp Med Biol.* 2012;728:41-64.
134. Lempicki M, Rothenbuhler A, Merzoug V, Franchi-Abella S, Chaussain C, Adamsbaum C, Linglart A. Magnetic Resonance Imaging Features as Surrogate Markers of X-Linked Hypophosphatemic Rickets Activity. *Horm Res Paediatr.* 2017;87(4):244-253.
135. Beck-Nielsen SS, Brock-Jacobsen B, Gram J, Brixen K, Jensen TK. Incidence and prevalence of nutritional and hereditary rickets in southern Denmark. *Eur J Endocrinol.* 2009 Mar;160(3):491-7
136. Endo I, Fukumoto S, Ozono K, Namba N, Inoue D, Okazaki R, Yamauchi M, Sugimoto T, Minagawa M, Michigami T, Nagai M, Matsumoto T. Nationwide survey of fibroblast growth factor 23 (FGF23)-related hypophosphatemic

- diseases in Japan: prevalence, biochemical data and treatment. *Endocr J*. 2015;62(9):811-6.
137. Bai X, Miao D, Xiao S, Qiu D, St-Arnaud R, Petkovich M, Gupta A, Goltzman D, Karaplis AC. CYP24 inhibition as a therapeutic target in FGF23-mediated renal phosphate wasting disorders. *J Clin Invest*. 2016;126(2):667-80.
138. Gottesman GS, Madson KL, Wollberg V, Mumm S, McAlister WH, Whyte MP. PHEX 3'-UTR c.*321A>G demonstrates X-linked recessive inheritance in a large American family. *ASBMR 2015 Annual Meeting*; 2015; S316
139. Goldsweig BK, Carpenter TO. Hypophosphatemic rickets: lessons from disrupted FGF23 control of phosphorus homeostasis. *Curr Osteoporos Rep*. 2015;13(2):88-97
140. Clinkenbeard EL, White KE. Heritable and acquired disorders of phosphate metabolism: Etiologies involving FGF23 and current therapeutics. *Bone*. 2017;102:31-39.
141. Feng JQ, Ward LM, Liu S, Lu Y, Xie Y, Yuan B, Yu X, Rauch F, Davis SI, Zhang S, Rios H, Drezner MK, Quarles LD, Bonewald LF, White KE. Loss of DMP1 causes rickets and osteomalacia and identifies a role for osteocytes in mineral metabolism. *Nat Genet*. 2006;38(11):1310-5.
142. Kim CJ, Kaplan LE, Perwad F, Huang N, Sharma A, Choi Y, Miller WL, Portale AA. Vitamin D 1alpha-hydroxylase gene mutations in patients with 1alpha-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(8):3177-82
143. Cheng JB, Levine MA, Bell NH, Mangelsdorf DJ, Russell DW. Genetic evidence that the human CYP2R1 enzyme is a key vitamin D 25-hydroxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 May 18;101(20):7711-5.

144. Feldman D, J Malloy P. Mutations in the vitamin D receptor and hereditary vitamin D-resistant rickets. *Bonekey Rep.* 2014 Mar 5;3:510.
145. Khokhar A, Castells S, Perez-Colon S. Genetic Disorders of Vitamin D Metabolism: Case Series and Literature Review. *Clin Pediatr (Phila).* 2016 May;55(5):404-14.
146. Roizen JD, Li D, O'Lear L, Javaid MK, Shaw NJ, Ebeling PR, Nguyen HH, Rodda CP, Thummel KE, Thacher TD, Hakonarson H, Levine MA. CYP3A4 mutation causes vitamin D-dependent rickets type 3. *J Clin Invest.* 2018 May 1;128(5):1913-1918.
147. Lo SH, Lachmann R, Williams A, Piglowska N, Lloyd AJ. Exploring the burden of X-linked hypophosphatemia: a European multi-country qualitative study. *Qual Life Res.* 2020;29(7):1883-1893.
148. Fowler A. DECoN: a detection and visualization tool for exonic copy number variants. *Methods Mol Biol.* 2022;2493:77– 88.
149. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17:405–24.
150. Rentzsch P, Schubach M, Shendure J, Kircher M. CADDSplice-improving genome-wide variant effect prediction using deep learning-derived splice scores. *Genome Med.* 2021;13:31
151. Chen A, Ro H, Mundra VRR, Joseph K, Brenner D, Carpenter TO, et al. Description of 5 novel SLC34A3/NPT2c mutations causing hereditary hypophosphatemic rickets with hypercalciuria. *Kidney Int Rep.* 2019;4 (8):1179–86

152. Halbritter J, Baum M, Hynes AM, Rice SJ, Thwaites DT, Gucev ZS, et al. Fourteen monogenic genes account for 15% of nephrolithiasis/nephrocalcinosis. *J Am Soc Nephrol.* 2015 Mar;26(3):543-51.
153. Stürznickel J, Heider F, Delsmann A, Gödel M, Grünhagen J, Huber TB, et al. Clinical Spectrum of Hereditary Hypophosphatemic Rickets With Hypercalciuria (HHRH). *J Bone Miner Res.* 2022;37(8):1580-1591.
154. Dasgupta D, Wee MJ, Reyes M, Li Y, Simm PJ, Sharma A, et al. Mutations in SLC34A3/NPT2c are associated with kidney stones and nephrocalcinosis. *J Am Soc Nephrol.* 2014;25(10):2366-75
155. Kremke B, Bergwitz C, Ahrens W, Schutt S, Schumacher M, Wagner V, et al. Hypophosphatemic rickets with hypercalciuria due to mutation in SLC34A3/NaPi-IIc can be masked by vitamin D deficiency and can be associated with renal calcifications. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2009;117(2):49-56.
156. Demir K, Zou M, Al-Rijjal RA, BinEssa H, Acar S, Durmaz E, et al. Novel VDR mutations in patients with vitamin D dependent rickets type 2a: a mild disease phenotype caused by a novel canonical splice-site mutation. *Endocr Pract.* 2020;26:72–81
157. Koren R. Vitamin D receptor defects: the story of hereditary resistance to vitamin D. *Pediatr Endocrinol Rev.* 2006;3:470-475
158. Sarafrazi S, Daugherty SC, Miller N, Boada P, Carpenter TO, Chunn L, Dill K, Econs MJ, Eisenbeis S, Imel EA, Johnson B, Kiel MJ, Krolczyk S, Ramesan P, Truty R, Sabbagh Y. Novel PHEX gene locus-specific database: Comprehensive characterization of vast number of variants associated with X-linked hypophosphatemia (XLH). *Hum Mutat.* 2022;43(2):143-157

159. Hawley S, Shaw NJ, Delmestri A, Prieto-Alhambra D, Cooper C, Pinedo-Villanueva R, et al. Prevalence and mortality of individuals with X-linked hypophosphatemia: A United Kingdom real-world data analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2020;105(3):e871–8.
160. Rafaelsen S, Johansson S, Ræder H, Bjerknes R. Hereditary hypophosphatemia in Norway: a retrospective population-based study of genotypes, phenotypes, and treatment complications. *Eur J Endocrinol.* 2016;174(2):125-36.
161. Trombetti A, Al-Daghri N, Brandi ML, Cannata-Andia JB, Cavalier E, Chandran M, et al. Interdisciplinary management of FGF23-related phosphate wasting syndromes: a Consensus Statement on the evaluation, diagnosis and care of patients with X-linked hypophosphataemia. *Nat Rev Endocrinol.* 2022;18(6):366-384.
162. Insogna KL, Briot K, Imel EA, Kamenický P, Ruppe MD, Portale AA, et al; AXLES 1 Investigators. A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 3 Trial Evaluating the Efficacy of Burosumab, an Anti-FGF23 Antibody, in Adults With X-Linked Hypophosphatemia: Week 24 Primary Analysis. *J Bone Miner Res.* 2018;33(8):1383-1393.
163. Portale AA, Carpenter TO, Brandi ML, Briot K, Cheong HI, Cohen-Solal M, et al. Continued Beneficial Effects of Burosumab in Adults with X-Linked Hypophosphatemia: Results from a 24-Week Treatment Continuation Period After a 24-Week Double-Blind Placebo-Controlled Period. *Calcif Tissue Int.* 2019;105(3):271-284.
164. Imel EA, Glorieux FH, Whyte MP, Munns CF, Ward LM, Nilsson O, et al. Burosumab versus conventional therapy in children with X-linked

- hypophosphataemia: a randomised, active-controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 2019;393:2416–27
165. Kritmetapak K, Kumar R. Phosphatonins: from discovery to therapeutics. *Endocr Pract*. 2022;7:69–79
166. Ni X, Li X, Zhang Q, Liu C, Gong Y, Wang O, et al. Clinical characteristics and bone features of autosomal recessive hypophosphatemic rickets type 1 in three Chinese families: report of five Chinese cases and review of the literature. *Calcif Tissue Int*. 2020;107:636–48.
167. Yamazaki M, Michigami T. Osteocytes and the pathogenesis of hypophosphatemic rickets. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022;13
168. Burballa C, Cantero-Recasens G, Prikhodina L, Lugani F, Schlingmann K, Ananin PV, et al. Clinical and genetic characteristics of Dent's disease type 1 in Europe. *Nephrol Dial Transplant*. 2022;16:518–24.
169. Acar S, BinEssa HA, Demir K, Al-Rijjal RA, Zou M, Çatli G, et al. Clinical and genetic characteristics of 15 families with hereditary hypophosphatemia: Novel Mutations in PHEX and SLC34A3. *PLoS One*. 2018;13(3)
170. HGMD Professional. Available online: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php> (accessed on 15 June 2023).
171. Brown KA, Pietenpol JA, Moses HL. A tale of two proteins: differential roles and regulation of Smad2 and Smad3 in TGF-beta signaling. *J Cell Biochem*. 2007;101(1):9-33
172. Feng XH, Derynck R. Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2005;21:659-93

173. El-Gazzar A, Kang H, Fratzi-Zelman N, Webb E, Barnes AM, Jovanovic M, et al. SMAD3 mutation in LDS3 causes bone fragility by impairing the TGF- β pathway and enhancing osteoclastogenesis. *Bone Rep.* 2022;17: 17:101603.
174. Guo M, Liu N, Guo Z. MiR-221-5p/Smad3 axis in osteoclastogenesis and its function: potential therapeutic target for osteoporosis. *Steroids.* 2022;185:109063.
175. Van de Laar IM, Oldenburg RA, Pals G, Roos-Hesselink JW, de Graaf BM, Verhagen JM, et al. Mutations in SMAD3 cause a syndromic form of aortic aneurysms and dissections with early-onset osteoarthritis. *Nat Genet.* 2011;43(2):121-6.
176. Meester JAN, Verstraeten A, Schepers D, Alaerts M, Van Laer L, Loeys BL. Differences in manifestations of Marfan syndrome, Ehlers-Danlos syndrome, and Loeys-Dietz syndrome. *Ann Cardiothorac Surg.* 2017;6(6):582-594.
177. Chesneau B, Edouard T, Dulac Y, Colineaux H, Langeois M, Hanna N, et al. Clinical and genetic data of 22 new patients with SMAD3 pathogenic variants and review of the literature. *Mol Genet Genomic Med.* 2020;8(5)
178. Erkula G, Sponseller PD, Paulsen LC, Oswald GL, Loeys BL, Dietz HC. Musculoskeletal findings of Loeys-Dietz syndrome. *J Bone Joint Surg Am.* 2010 Aug 4;92(9):1876-83
179. Chen G, Liu Y, Goetz R, Fu L, Jayaraman S, Hu M-C, et al. A-Klotho is a non-enzymatic molecular scaffold for FGF23 hormone signalling. *Nature.* 2018;553:461–6
180. Marzin P, Baujat G, Gensburger D, Huber C, Bole C, Panuel M, Finidori G, et al. Heterozygous FGFR1 mutation may be responsible for an incomplete form

- of osteoglophonic dysplasia, characterized only by radiolucent bone lesions and teeth retentions. *Eur J Med Genet.* 2020;63(2):103729.
181. Choe Y, Shin CH, Lee YA, Kim MJ, Lee YJ. Case report and review of literature: autosomal recessive hypophosphatemic rickets type 2 caused by a pathogenic variant in ENPP1 gene. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022;13:911672.
182. Levy-Litan V, Hershkovitz E, Avizov L, Leventhal N, Bercovich D, Chalifa-Caspi V, Manor E, Buriakovsky S, Hadad Y, Goding J, Parvari R. Autosomal-recessive hypophosphatemic rickets is associated with an inactivation mutation in the ENPP1 gene. *Am J Hum Genet.* 2010;86(2):273-8.
183. Simon I, Roumeguère T, Devuyst F, Cotton F, Tang BN, Cappello M, Corbetta S, Idrissi M, Pozdzik A, Nortier J. Néphrolithiases récurrentes de brushite révélant une hyperparathyroïdie primaire [Recurrent episodes of brushite nephrolithiasis revealing primary hyperparathyroidism]. *Rev Med Brux.* 2015;36(3):172-6
184. Alvarez-Arroyo MV, Traba ML, Rapado A, de la Piedra C. Role of citric acid in primary hyperparathyroidism with renal lithiasis. *Urol Res.* 1992;20(1):88-90.
185. Parks J, Coe F, Favus M: Hyperparathyroidism in nephrolithiasis. *Arch Intern Med.* 1980, 140:1479-81
186. Webb AR, Kazantzidis A, Kift RC, Farrar MD, Wilkinson J, Rhodes LE. Colour Counts: Sunlight and Skin Type as Drivers of Vitamin D Deficiency at UK Latitudes. *Nutrients.* 2018;10(4):457.
187. Minisola S, Colangelo L, Pepe J, Diacinti D, Cipriani C, Rao SD. Osteomalacia and Vitamin D Status: A Clinical Update 2020. *JBMR Plus.* 2020 Dec 21;5(1)

188. Heijboer AC, Cavalier E. The Measurement and Interpretation of Fibroblast Growth Factor 23 (FGF23) Concentrations. *Calcif Tissue Int.* 2023;112(2):258-270
189. Marcucci G, Masi L, Ferrari S, Haffner D, Javaid MK, Kamenický P, Reginster JY, Rizzoli R, Brandi ML. Phosphate wasting disorders in adults. *Osteoporos Int.*;29(11):2369-2387
190. Endo I, Fukumoto S, Ozono K, Namba N, Tanaka H, Inoue D, Minagawa M, Sugimoto T, Yamauchi M, Michigami T, Matsumoto T. Clinical usefulness of measurement of fibroblast growth factor 23 (FGF23) in hypophosphatemic patients: proposal of diagnostic criteria using FGF23 measurement. *Bone.* 2008 Jun;42(6):1235-9.
191. Ito N, Kubota T, Kitanaka S, Fujiwara I, Adachi M, Takeuchi Y, Yamagami H, Kimura T, Shinoda T, Minagawa M, Okazaki R, Ozono K, Seino Y, Fukumoto S. Clinical performance of a novel chemiluminescent enzyme immunoassay for FGF23. *J Bone Miner Metab.* 2021 Nov;39(6):1066-1075.

8. ANEXOS

Escala de Beighton para hiperlaxitud:

1. Hiperextensión activa de los codos de más de 10° (un punto por cada lado).
2. Aposición pasiva de los pulgares a la cara flexora del antebrazo (un punto por cada lado).
3. Dorsiflexión pasiva de las metacarpofalángicas o extensión del 5° metacarpofalángica a más de 90° (un punto por cada lado).
4. Hiperextensión de las rodillas de 10° o más (un punto por cada lado).
5. Tocar el suelo con las palmas de las manos al agacharse sin doblar las rodillas, actualmente o en el pasado (un punto).

Se obtiene un máximo de 9 puntos, a partir de 4 ya se considera hiperlaxitud articular.

HOJA DE INFORMACION AL PACIENTE

ESTUDIO: IDENTIFICACIÓN DE CASOS OCULTOS DE HIPOFOSFATEMIA DE CAUSA GENÉTICA

INTRODUCCIÓN

Nos dirigimos a usted para informarle sobre un estudio de investigación en el que se le invita a participar. El estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de Cantabria y respeta la normativa vigente.

Nuestra intención es proporcionarle información adecuada y suficiente para que pueda evaluar si quiere o no participar en el estudio. Para ello le rogamos que lea con atención esta hoja informativa y luego podrá preguntar cualquier duda que le surja relativa al estudio. Además, puede consultar con cualquier persona que considere oportuno.

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

Debe saber que su participación en este estudio es totalmente voluntaria y puede decidir no participar. En caso de que decida participar en el estudio, luego puede cambiar de decisión y retirar su consentimiento en cualquier momento, sin dar explicaciones y sin que por ello se altere la relación con su médico o se produzca perjuicio alguno en su tratamiento.

DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

El fósforo es un elemento que está presente en la sangre y en todas las células del organismo. Es esencial para muchas funciones, y en particular para el desarrollo y el posterior funcionamiento normal del sistema musculoesquelético (huesos, articulaciones, tendones, ligamentos, etc.).

En algunas personas se producen alteraciones en la forma en que el organismo maneja el fósforo, lo que conduce a que la cantidad de fósforo en la sangre, y en otras partes, disminuya. Es lo que se conoce como "hipofosfatemia". Esa disminución del fósforo puede producir diversas manifestaciones, como dolores, debilidad, artritis, alteraciones de los nervios y de los dientes, etc. Sin embargo, esas manifestaciones son inespecíficas, es decir, pueden deberse no sólo a hipofosfatemia, sino también a otras enfermedades. Por ello, se necesita medir específicamente la cantidad de fósforo en la sangre para identificar la existencia de hipofosfatemia.

En un esfuerzo para identificar los pacientes con hipofosfatemia que no estaba correctamente diagnosticada, hemos hecho un estudio en el que hemos medido la cantidad de fósforo en la sangre en pacientes que se habían hecho un análisis por problemas en el esqueleto o por otros motivos que se asocian a mayor riesgo de hipofosfatemia.

En ese estudio hemos comprobado que en al menos una ocasión usted tenía cantidades anormalmente bajas de fósforo en su sangre. Por ello, le invitamos ahora a participar en un estudio de seguimiento para confirmar que efectivamente presenta hipofosfatemia (fósforo bajo en la sangre) y cuál es el motivo.

Procedimientos del estudio

Para llevar a cabo el estudio debemos hacer un cuestionario clínico, una exploración médica habitual y un análisis de sangre y orina. Las causas de la hipofosfatemia son múltiples, y se puede tratar de un trastorno adquirido (por ejemplo, por problemas en el tubo digestivo, en el riñón o en algunas glándulas del cuello), o genético (hereditario). Por eso, en algunos casos, en función de los resultados de los análisis iniciales, podrá ser necesario hacer un test genético. De ser así, solicitaremos su consentimiento, pero podremos utilizar la muestra de sangre inicial, por lo que no será necesario realizar una nueva extracción de sangre.

Todos estos procedimientos serán realizados por profesionales expertos en los trastornos esqueléticos. Una vez tengamos los resultados del estudio, podremos confirmarle cuál es el diagnóstico y si debe seguir o no algún tratamiento.

ENVÍO DE LA MUESTRA AL BIOBANCO VALDECILLA

Una vez finalizado el estudio, si existiera muestra sobrante, y si Ud. da su consentimiento, ésta será enviada al Biobanco Valdecilla para ser utilizada en futuros estudios de investigación; en caso contrario será destruida y no se utilizará para futuros estudios.

El Biobanco Valdecilla (Nodo de ADN y fluidos) es un centro en el que se registran, procesan, almacenan y proveen muestras biológicas humanas con sus datos clínicos asociados para ser utilizados en investigación biomédica, asegurando en todo momento calidad y confidencialidad. En él se procesarán sus muestras, y se registrarán y archivarán los datos que puedan asociarse con las mismas, empleando un procedimiento de codificación, es decir, sólo será identificado por un número y/o código, para garantizar la protección de su identidad de acuerdo con la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales. Estos archivos serán de acceso restringido y confidencial.

Las muestras donadas al Biobanco Valdecilla y datos clínicos asociados podrán ser cedidos a otros investigadores (nacionales o internacionales) cuyos proyectos estén aprobados por sendos Comités de Ética y Científico del Biobanco, cumpliendo las normas ético-legales vigentes. El Biobanco transferirá a los investigadores una fracción de la muestra y los datos clínicos relevantes, de forma anónima, comprometiéndose a garantizar la confidencialidad de la información personal.

El Biobanco Valdecilla tendrá a su disposición toda la información sobre los proyectos de investigación en los que se ha utilizado su muestra, pero no será posible comunicarle ningún resultado personal obtenido del estudio de las mismas. El Comité Ético de referencia del Biobanco decidirá en qué casos será necesario que se le envíe la información de manera individualizada, si ésta fuera relevante para su salud.

BENEFICIOS Y RIESGOS DERIVADOS DE SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO

Beneficios de la participación en el estudio.

Con este estudio se espera mejorar el conocimiento científico relativo a las enfermedades causantes de hipofosfatemia.

Además, para usted tendrá el beneficio de esclarecer si padece realmente o no este trastorno y si su causa es adquirida o genética. Ello a su vez redundará en un mejor tratamiento, ajustado de forma personalizada a sus características complejas. En el caso de causa genética, esa información podría ser útil también para sus familiares. Es decisión personal suya informar a dichos familiares sobre estos resultados.

Riesgos de la participación en el estudio.

La participación en este estudio no supone ningún riesgo adicional para usted, salvo las molestias derivadas de la extracción de una muestra de sangre. Este es un procedimiento que puede causar un leve dolor y que en algunas ocasiones puede producir un ligero hematoma (acumulo de sangre) que no precisa tratamiento y se resuelve en unos días.

CONFIDENCIALIDAD

Todos los datos de carácter personal se considerarán confidenciales y se tratarán de acuerdo a lo dispuesto en las normativas vigentes, incluyendo el Reglamento (UE) 2016/679 del Parlamento europeo y del Consejo, de 27 de abril de 2016, de Protección de Datos (RGPD) y la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales.

Para garantizar la protección de su identidad, los datos o muestras recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código de forma que no sea posible la identificación del paciente. Sólo el investigador y personas autorizadas relacionadas con el estudio tendrán acceso a dicho código, y en ningún caso podrán desvelar dicha información a terceros. El acceso a los datos estará restringido al equipo investigador y el archivo que relacione los códigos con las identidades de los pacientes será custodiado por el investigador principal.

Los datos que se requieren son los necesarios para cubrir los objetivos del estudio y el investigador principal y su equipo se comprometen a utilizarlos única y exclusivamente con esta finalidad. Es posible que los resultados del estudio sean publicados en la literatura científica, pero su identidad permanecerá confidencial y los datos no podrán ser relacionados con usted, incluso aunque los resultados del estudio sean publicados.

De acuerdo con la legislación vigente, tiene Ud. derecho al acceso de sus datos personales y a su rectificación, cancelación y oposición, que podrá ejercer dirigiéndose al médico que le atiende en este estudio.

En el caso de que Ud. diera su consentimiento y una vez transferida su muestra y sus datos al Biobanco Valdecilla, ambos serán tratados como se ha expuesto anteriormente.

No está prevista la transferencia de los datos individuales generados fuera de la Unión Europea.

COMPENSACIÓN

Usted no recibirá ningún tipo de compensación económica o de cualquier otro tipo por su participación.

La donación de muestras para investigación es voluntaria y altruista. Su único beneficio es el que corresponde al avance de la medicina en beneficio de la sociedad y el saber que ha colaborado en este proceso. Si usted decide no participar recibirá todos los cuidados médicos que pudiera necesitar y su relación con los equipos médicos que le atiendan no se verá afectada.

REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

Si en cualquier momento y sin necesidad de comunicar un motivo decide retirar su consentimiento ningún dato nuevo se incorporará al estudio a partir de ese momento, sin embargo, los datos recogidos con anterioridad seguirán disponibles para el investigador principal del estudio.

También podrá solicitar la destrucción de sus muestras en cualquier momento. Si el estudio aún no hubiera finalizado sólo tendrá que contactar con los médicos del estudio, en particular el Dr. Riancho, y ellos se encargarán de llevar a cabo su destrucción.

Si las muestras ya se hubieran transferido al Biobanco Valdecilla, deberá ponerse en contacto con el Biobanco, con el Coordinador del Nodo de ADN y fluidos, en la siguiente dirección de correo electrónico: biobanco2@idival.org o llamando al teléfono: 942 202563 o 942 315515

DATOS DE CONTACTO

Si le surge cualquier duda sobre su participación en este proyecto o sobre sus derechos como paciente, por favor, contacte con los investigadores principales, en la dirección de contacto abajo indicada:

Dr. José A. Riancho, Servicio de Medicina Interna, Hospital U. Marqués de Valdecilla. Av Valdecilla s/n. 39008 Santander. Teléfono 942 202513 o 942 201990. Fax 942 201695. Correo electrónico: rianchoj@unican.es

Este investigador es responsable último de que el estudio se lleve a cabo garantizando en todo momento la calidad científica del mismo y sus derechos como participante en el mismo.

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA DONACIÓN DE MUESTRAS SOBANTES AL BIOBANCO
PROCEDENTES DEL ESTUDIO:

TÍTULO DEL ESTUDIO: IDENTIFICACIÓN DE CASOS OCULTOS DE HIPOFOSFATEMIA DE CAUSA GENÉTICA

Responsable clínico:/ José A. Riancho

Yo, _____

(Nombre y apellidos del Paciente en MAYÚSCULAS)

Declaro que:

- He leído la hoja de información que me han facilitado.
- He podido formular las preguntas que he considerado necesarias acerca del estudio.
- He recibido información adecuada y suficiente por el profesional de salud abajo indicado y he comprendido:
 - Que mi donación es voluntaria y altruista
 - El lugar de almacenamiento y el procedimiento que sufrirán tanto los datos personales como las muestras.
 - La finalidad para la que se utilizarán mis muestras y mis datos personales, y las garantías de cumplimiento de la legalidad vigente,
 - Que las muestras podrán ser cedidas a terceros para futuros proyectos de investigación que cumplan con las exigencias éticas y legales aplicables.
 - Que mis muestras y datos personales serán proporcionados de forma anonimizada a los investigadores que trabajen con ellas.
 - Que en cualquier momento puedo revocar mi consentimiento y solicitar la eliminación de mis datos personales y muestras.
 - Que tengo derecho de acceso y rectificación a mis datos personales, siempre que mi muestra no se haya anonimizado.
 - Que existen 3 copias del presente consentimiento. Un ejemplar será custodiado en las instalaciones del Biobanco Valdecilla, otro en el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla donde se obtuvo mi muestra y el tercero es una copia para mí.

AUTORIZO LA DONACIÓN de la muestra sobrante al Biobanco Valdecilla

sí **NO**

AUTORIZO SE ME INFORME sobre los resultados referidos a mi salud
derivados de análisis que pudieran ser realizados sobre mi muestra
biológica (siempre que la muestra no se haya anonimizado).

sí **NO**

RESTRICCIONES DEL USO DE LA MUESTRA. Especifique a continuación si no desea que se utilice su muestra y datos asociados en algún uso concreto o proyecto en particular:

Para dejar constancia de todo ello, firmo a continuación:

Fecha Firma del paciente

Constato que he explicado las características de las condiciones de conservación y seguridad que se aplicarán a la muestra y a los datos clínicos conservados.

Nombre del clínico responsable:

Fecha Firma
Nombre:

APARTADO PARA LA REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

Yo, revoco el consentimiento de participación en el proceso, arriba firmado.

Solicito que mi muestra sea **DESTRUIDA**
ANONIMIZADA

Firma y Fecha de la revocación:

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EL ESTUDIO

TITULO: **IDENTIFICACIÓN DE CASOS OCULTO DE HIPOFOSFATEMIA DE CAUSA GENETICA**

Responsable clínico:/José A. Riancho.

YO, _

Declaro que:

- He leído la hoja de información que me han facilitado.
- He podido formular las preguntas que he considerado necesarias acerca del estudio.
- He recibido información adecuada y suficiente por el profesional de salud abajo indicado sobre:
 - Los objetivos del estudio y sus procedimientos.
 - Los beneficios e inconvenientes del proceso.
 - Que mi participación es voluntaria y altruista.
 - El lugar de obtención, almacenamiento y el procedimiento que sufrirán tanto los datos personales como las muestras.
 - La finalidad para la que se utilizarán mis muestras y mis datos personales, y las garantías de cumplimiento de la legalidad vigente.
 - Que en cualquier momento puedo revocar mi consentimiento, (sin necesidad de explicar el motivo y sin que ello afecte a mi atención médica) y solicitar la eliminación de mis datos personales y muestras.
 - Que tengo derecho de acceso y rectificación a mis datos personales.

CONSENTIMIENTO EN LA PARTICIPACIÓN EN EL PRESENTE ESTUDIO

SI NO

Para dejar constancia de todo ello, firmo a continuación:

Fecha Firma del paciente.....

Constato que he explicado las características de las condiciones de conservación y seguridad que se aplicarán a la muestra y a los datos clínicos conservados.

Fecha Firma.....

APARTADO PARA LA REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

YO.....revoco el consentimiento de participación en el proceso, arriba firmado.

Firma y fecha de la revocación

CONSENTIMIENTO INFORMADO: ESTUDIOS GENETICOS CON FINALIDAD DIAGNOSTICA

Solicitamos su consentimiento para:

- 1.- Realizar pruebas genéticas de laboratorio en sangre, cuya finalidad es diagnosticar si está afectado o es portador de
- 2.- Dichas pruebas serán realizadas en la Unidad de Genética del Hospital Marqués de Valdecilla, o en el laboratorio de referencia que a tal efecto designe esta Unidad.
- 3.- Únicamente el personal sanitario debidamente autorizado por el Hospital Marqués de Valdecilla podrá acceder a los datos personales y a los resultados de las pruebas genéticas.
- 4.- El facultativo que le solicita estas pruebas adquiere el compromiso de suministrarle información acerca del objeto de los análisis y facilitarle el asesoramiento genético.
- 5.- En las pruebas, podría ser que se encontrase información no directamente relacionada con el objeto de los análisis y usted puede decidir si desea o no que se le comunique.
- 6.- La información obtenida puede ser relevante también para sus familiares y en este caso le explicaremos el por qué de la conveniencia de que la conozcan. Es decisión personal suya informarles, algo que nosotros le recomendamos con el fin de que, si ellos lo desean, puedan acudir a una consulta especializada en genética donde le informarán sobre su riesgo personal y sus opciones de salud en el futuro.
- 7.- Una vez finalizados los análisis, los datos obtenidos y las muestras excedentes se guardarán en la Unidad de Genética del Hospital Marqués de Valdecilla, por el interés que pueden tener para satisfacer futuras necesidades asistenciales de usted y sus familiares.

Si ha comprendido la información que se le ha proporcionado, ha resuelto cualquier duda que pudiese tener y otorga su consentimiento para realizar las pruebas genéticas en los términos antes explicados, por favor, firme a continuación este **consentimiento informado en sentido afirmativo**:

Yo.....
paciente/padre o madre del paciente/custodio legal del paciente (nombre y dos apellidos)

declaro que he sido informado de la posibilidad de que

.....
(nombre de la persona a quien se le toma la muestra)

podría estar afectado/a o ser portador/a de una alteración genética, y de la conveniencia de realizar pruebas de laboratorio con el fin de obtener un diagnóstico.

Doy mi consentimiento para realizar dichas pruebas genéticas en la Unidad de Genética del Hospital Marqués de Valdecilla y en caso necesario, en otros laboratorios designados por el mismo para ayudar al proceso diagnóstico.

Fecha: en, a.....de.....de 20....

Firma
Nombre del paciente, padre, madre o custodio legal

Firma
Profesional autorizado que solicita el consentimiento

Sr./Sra.....
DNI:.....

.....

BIOQUÍMICA



Etiqueta de Paciente

PROTOCOLO HIPOFOSFATEMIA

1 tubo teja

2 tubos rosa (EDTA)


Entregar en bolsa separado junto a este volante

Entrega en Recogida general del Laboratorio de Bioquímica Clínica

(Responsables Dra. García Unzueta/Dr. Lavín)

9. PUBLICACIONES

Uncovering genetic causes of hypophosphatemia

■ Nuria Puente-Ruiz^{1*} , Pablo Docio², María T. García Unzueta³, Bernardo A. Lavín³, Ainhoa Maiztegi³, Ana Isabel Vega⁴, María Piedra⁵, Leyre Riancho-Zarrabeitia⁶, Fátima Mateos⁷, Domingo Gonzalez-Lamuño², Carmen Valero¹ & José A. Riancho¹

From the ¹Servicio de Medicina Interna, Hospital U M Valdecilla, Universidad de Cantabria, Instituto de Investigación Valdecilla (IDIVAL), Santander, Spain; ²Servicio de Pediatría, Hospital U M Valdecilla, IDIVAL, Santander, Spain; ³Servicio de Análisis Clínicos y Bioquímica, Hospital U M Valdecilla, IDIVAL, Santander, Spain; ⁴Servicio de Genética, Hospital U M Valdecilla, IDIVAL, Santander, Spain; ⁵Servicio de Endocrinología, Hospital U M Valdecilla, Santander, Spain; ⁶Servicio de Reumatología, Hospital U Sierrallana, IDIVAL, Torrelavega, Spain; and ⁷Servicio de Análisis Clínicos y Bioquímica, Hospital U Sierrallana, Torrelavega, Spain

Abstract. Puente-Ruiz N, Docio P, Unzueta MTG, Lavín BA, Maiztegi A, Vega AI, et al. Uncovering genetic causes of hypophosphatemia. *J Intern Med*. 2023;00:00–00.

Background. Chronic hypophosphatemia can result from a variety of acquired disorders, such as malnutrition, intestinal malabsorption, hyperparathyroidism, vitamin D deficiency, excess alcohol intake, some drugs, or organ transplantation. Genetic disorders can be a cause of persistent hypophosphatemia, although they are less recognized. We aimed to better understand the prevalence of genetic hypophosphatemia in the population.

Methods. By combining retrospective and prospective strategies, we searched the laboratory database of 815,828 phosphorus analyses and included patients 17–55 years old with low serum phosphorus. We reviewed the charts of 1287 outpatients with at least 1 phosphorus result ≤ 2.2 mg/dL. After ruling out clear secondary causes, 109 patients underwent further clinical and analytical studies. Among them, we confirmed hypophosphatemia in 39 patients. After

excluding other evident secondary causes, such as primary hyperparathyroidism and vitamin D deficiency, we performed a molecular analysis in 42 patients by sequencing the exonic and flanking intronic regions of a panel of genes related to rickets or hypophosphatemia (CLCN5, CYP27B1, dentin matrix acidic phosphoprotein 1, ENPP1, FAM20C, FGFR1, FGF23, GNAS, PHEX, SLC34A3, and VDR).

Results. We identified 14 index patients with hypophosphatemia and variants in genes related to phosphate metabolism. The phenotype of most patients was mild, but two patients with X-linked hypophosphatemia (XLH) due to novel PHEX mutations had marked skeletal abnormalities.

Conclusion. Genetic causes should be considered in children, but also in adult patients with hypophosphatemia of unknown origin. Our data are consistent with the conception that XLH is the most common cause of genetic hypophosphatemia with an overt musculoskeletal phenotype.

Keywords: familial hypophosphatemia, fibroblast growth factor 23, phosphate, vitamin D, X-linked hypophosphatemia

Introduction

Phosphate plays several functions in the homeostasis of the human body. Many intracellular activation cascades commonly add phosphate groups and accumulate ATP to store energy for various

cellular processes. Extracellular phosphate must be available to form the mineral phase of calcified tissues, such as bone and teeth, and to maintain their material properties. Therefore, hypophosphatemia may impair various cellular functions and the structural properties of the skeleton [1].

Hypophosphatemia is not uncommon. It frequently accompanies severe acute disorders. It may be present in approximately 5% of

*Present address: Servicio de Medicina Interna, Hospital U M Valdecilla, Universidad de Cantabria, Instituto de Investigación Valdecilla (IDIVAL), Santander, Spain
Nuria Puente Ruiz is the alternative proofreader.

hospitalized patients and up to 60% of those admitted to intensive care units. Acute hypophosphatemia may cause muscle weakness, respiratory insufficiency, myocardial dysfunction, and neurological and hematological disorders. Thus, hypophosphatemia is associated with poor patient outcomes [2, 3]. In chronic hypophosphatemia, skeletal manifestations may appear, such as bone pain and deformity, and complete and incomplete fractures [4–6]. However, most “routine” metabolic panels do not include phosphate. Therefore, hypophosphatemia may go unrecognized without proper awareness of this diagnosis by clinicians facing patients with musculoskeletal complaints and other nonspecific conditions.

Parathyroid hormone (PTH), calcitriol (1,25-dihydroxyvitamin D; $1,25(\text{OH})_2\text{D}$), and several phosphatonins—in particular, fibroblast growth factor 23 (FGF23)—maintain phosphate balance by regulating intestinal absorption and renal reabsorption. PTH and FGF23 tend to lower serum phosphate, whereas the actions of $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ in the intestine and the kidney increase serum phosphate levels. In turn, serum phosphate can regulate the production of PTH, $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, and FGF23 [7–10] by feedback mechanisms.

Chronic hypophosphatemia may be caused by a variety of acquired disorders, such as malnutrition, intestinal malabsorption, and alcoholism. Sometimes, the decrease in serum phosphate has genetic causes [1, 11, 12]. Those cases are usually diagnosed in infancy because they typically show retarded growth and rickets manifestations. X-linked hypophosphatemia (XLH) is considered the most common genetic hypophosphatemia, with a prevalence of about 1/20,000 [4, 12, 13]. However, the generalization of new DNA sequencing technologies is revealing that a significant proportion of hereditary diseases may present a mild phenotype that may become evident only in adulthood [14–16]. Thus, hypophosphatemia may go unrecognized, and genetic causes may be disregarded, particularly in adult patients [1, 17]. The motivation for this study was to obtain a better knowledge of the prevalence of genetic hypophosphatemia in the population.

Materials and methods

Study design and subjects

We conducted the study at the Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, a tertiary care center

in Cantabria, a region in Northern Spain with a population of 550,000. The hospital serves as the primary care center for a population of approximately 320,000 and as the reference center for the rest of the region, which is also served by two community hospitals.

The study included both a retrospective and a prospective arm. In the retrospective arm, we performed a computerized search of the laboratory database between October 2002 and January 2020. We sought patients 17–55 years old with at least one determination of serum phosphorus <2.4 mg/dL. We excluded inpatients and outpatients from medical services likely having secondary hypophosphatemia (eating disorders and alcohol disorder units, gastrointestinal surgery, transplant, antiretrovirals drugs, and iron infusions).

We conducted the prospective arm between January 2020 and March 2021. Within that period, a phosphorus test was added to all lab requests from patients between 17 and 55 years old. At this stage, we included all lab requests in the region of Cantabria, and inclusion criteria were equal to the retrospective arm. Thus, besides Hospital Marqués de Valdecilla, other public community hospitals participated in the study. This was done by implementing an algorithm within the common system for ordering lab tests.

We identified patients with hypophosphatemia from the retrospective and prospective arms, and we reviewed clinical records, paying particular attention to previous phosphorus tests, musculoskeletal manifestations, and other causes of secondary hypophosphatemia. Finally, those with persistent hypophosphatemia (i.e., at least one phosphorus ≤ 2.2 mg/dL and none within the reference range of 2.4–5.1 mg/dL), in the absence of disorders or drug therapies known to cause hypophosphatemia, were invited to attend our outpatient clinic for clinical evaluation and additional biochemical or genetic tests. This invitation was issued by telephone, or through a letter, if it was not feasible to contact them by phone.

Laboratory procedures

Serum samples were obtained in the morning after an overnight fast. We analyzed creatinine, calcium, phosphorus, alkaline phosphatase, albumin, and intact PTH in the Atellica CH&IM

platform (Siemens Healthcare Diagnostics, Malvern, PA, USA), 25-hydroxycholecalciferol (calcidiol) levels by an automated competitive chemiluminescence assay (Liaison XL, DiaSorin Inc, Stillwater, MN, USA), and FGF23 levels by Human FGF23 (Intact) ELISA (Immunotopics International, San Clemente, CA, USA). This FGF23 ELISA kit has a sensitivity <1 pg/mL and 3.5% intra-assay and 6.3% inter-assay reproducibility, and it does not have cross-reactivity with N-terminal (25–179) or C-terminal (180–251) fragments. We included nine subjects (mean age 39 ± 12) with normal phosphorus levels as a control group for FGF23 results. We used the following formula to calculate tubular reabsorption of phosphate (TRP): $1 - [(\text{urine P} \times \text{serum creatinine}) / (\text{serum P} \times \text{urine creatinine})] \times 100$, and the Walton–Bijvoet nomogram to estimate tubular maximum reabsorption of phosphate per volume of filtrate (TmP/GFR) [18].

In patients undergoing genetic study, we analyzed a custom panel of 12 genes related to phosphorus metabolism (ALPL, CLCN5, CYP27B1, dentin matrix acidic phosphoprotein 1 [DMP1], ENPP1, FAM20C, FGF23, FGFR1, GNAS, PHEX, SLC34A3, and VDR). We prepared DNA libraries with the SureSelect QXT kit (Agilent) and sequenced them in the MiSeq platform (Illumina). Base calling was established with a Q30 $> 90\%$, and reads were aligned to the GRCh37 reference genome. For the filtering and analysis of variants, we used the Alissa platform (Agilent), and variants were classified according to the criteria of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) [19]. We performed copy number variation analysis with DECoN v1.0.2 software [20]. We used the combined annotation-dependent depletion (CADD) as a predictor algorithm to measure the deleteriousness of genetic variants. A CADD score > 15 is expected to identify the potentially deleterious variants in the genome [21].

Ethical statements

The study was approved by the institutional review board Comité de Ética de Investigación con Medicamentos de Cantabria. All patients evaluated at the clinic signed informed consent.

Results

In the retrospective phase, we reviewed 631,855 analyses of serum phosphorus (performed in 208,245 patients between October 2002 and January 2020). Among them, 2928 analyses in 1350

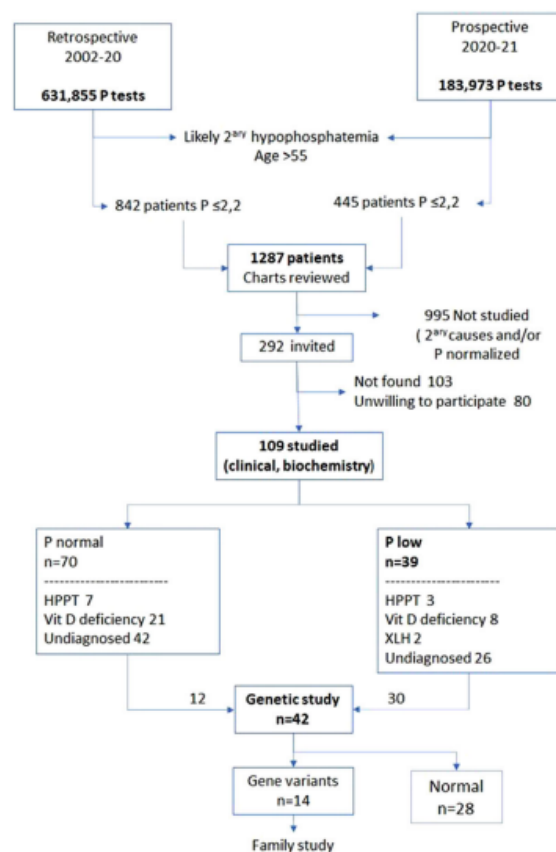


Fig. 1 Study flow. HPPT, hyperparathyroidism; P, serum phosphate; XLH, X-linked hypophosphatemia.

patients who fulfilled the inclusion criteria were below the 2.4 mg/dL lower limit of the normal range; 842 patients had a phosphorus level ≤ 2.2 mg/dL at least once.

In the prospective study, the phosphorus tests performed as part of this study, along with other phosphorus tests directly requested by attending physicians, included 183,973 phosphorus analyses. Among those tests, we identified 445 patients with at least 1 phosphorus test ≤ 2.2 mg/dL (Fig. 1).

Thus, we reviewed the charts of 1287 patients with at least 1 phosphorus ≤ 2.2 mg/dL. The mean age of patients was 45 ± 8 years. In 995 cases, other phosphorus analyses were within the reference range, or existing underlying disorders explained hypophosphatemia. The most common causes were hyperparathyroidism, vitamin D

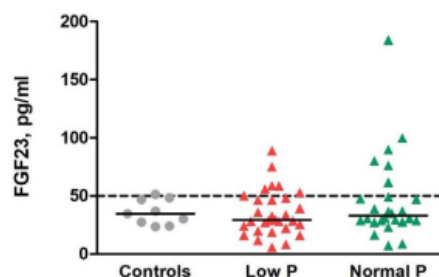
Table 1. Characteristics of patients with hypophosphatemia at the study visit

Parameter	N (%)
Sex	
Male	30 (77)
Female	9 (23)
Alcohol	
Daily consumption	10 (26)
Weekly consumption	12 (31)
Former drinker	17 (43)
History of fracture	24 (61)
Nontraumatic fracture	1 (3)
Dental problems	15 (39)
Hypercalcemia (>10.4 mg/dL)	1 (3)
High PTH (>88 pg/mL)	7 (18)
25 hydroxyvitamin D, ng/mL	
>30	6 (15)
30–20	18 (46)
<20	15 (39)
1,25 hydroxyvitamin D, pg/mL	
≥66	0
66–26	15 (39)
≤25	13 (33)
Fibroblastic grow factor, pg/mL	
>50	7 (18)
31–50	7 (18)
≤30	16 (41)

Abbreviation: PTH, parathyroid hormone.

deficiency, excess alcohol intake, and organ transplantation. We selected the remaining 292 patients for clinical interviews, physical examinations, and further tests. We were not able to contact 103 patients by telephone or postal mail (most of them from the retrospective study arm), and 80 declined to participate.

Finally, 109 patients with prior hypophosphatemia attended the clinic for the study visit (Fig. 1). The new analyses revealed normal levels of serum phosphorus in 70 cases and confirmed hypophosphatemia in 39 patients. Of the 70 patients with normal serum phosphorus, 7 were diagnosed with primary hyperparathyroidism and 21 with vitamin D insufficiency. Among the 39 patients with hypophosphatemia (Table 1), 3 had primary hyperparathyroidism, 8 had vitamin D deficiency, 2 had a previous clinical diagnosis of XLH, and the cause of hypophosphatemia was unknown in 26 cases. We measured serum FGF23 in 54 patients. In 26

**Fig. 2** Fibroblast growth factor 23 (FGF23) levels in patients attending the study visit. A control group is shown for comparison.**Table 2.** Index patients and relatives with mutations.

Gene	Index patients	Relatives
SLC34A3	3	3
VDR	3	1
PHEX	2 ^a	
CYP27B1	1	2
DMP1	1	1
CLCN5	1	1
SMAD3	1	
FGFR1	1	
ENPP1	1	
Total	14	8

Abbreviations: DMP1, dentin matrix acidic phosphoprotein 1; XLH, X-linked hypophosphatemia.

^aTwo sisters with known XLH.

cases, it was above 30 pg/mL, which is usually regarded as the upper limit of the normal range [22, 23]. However, there was a marked overlap between groups (Fig. 2).

Overall, 42 patients underwent genetic analysis (30 with low serum phosphorus at the study visit and 12 with normal phosphorus at the study visit but previously unexplained low phosphorus levels). In 28 cases, the results were normal, whereas 13 patients carried potentially pathogenic (likely pathogenic or unknown significance) variants of genes related to phosphorus metabolism (including two with normal serum phosphorus at the study visit). The genes with allelic variants are shown in Table 2, and individual biochemical and genetic details are shown in Table 3. Variants of *SLC34A3*, *VDR*, and *PHEX* were the most common, each being present in three and two patients. One patient with low serum phosphorus without clear cause had an *SLC34A3* variant classified as likely

Table 3. Index patients with genetic variants.

Family	Sex	Age	Gene	Variant	CADD score	ACGM classification	Serum phosphorus		PTH, ng/mL	25(OH)D, pg/mL	1,25(OH) ₂ D, pg/mL	FGF23, pg/mL
							at study visit, mg/dL	Lowest serum phosphorus, mg/dL				
1	F	52	SLC34A3	Tyr414Ter	40	LP	2.1	2.1	95	25	21	38
2	M	52	VDR	Ala303Ala ^a	-	VUS	2.3	2.3	69	30	46	52
3	M	49	CYP27B1	Arg104Trp	24.2	VUS	2.6	2.1	62	12	12	200
4	M	51	VDR	Asp65Gly	23.6	VUS	2.2	1.7	95	23	30	46
5	F	53	SLC34A3	Arg485His	27.2	LB	1.8	1.6	47	21	14	20
6	M	49	DPM1	Asp478Ala	22.7	VUS	2	1.9	56	31	-	6
7	M	43	SLC34A3	c.1094-14G > A (p.?) ^a	-	VUS	2.1	1.8	55	16	7	29
8	F	43	SMAD3	Glu52Lys	25.9	VUS	2.7	2.1	59	36	-	7
9	M	41	CLCN5	Val699Ile	22.2	VUS	2	1.8	58	24	23	53
10	M	27	VDR	Met1	24	VUS	1.5	1.5	52	11	33	22
11	M	50	FGFR1	Ser219Phe	26.8	VUS	1.8	1.8	55	11	35	28
12a	F	32	PHEX	Phe654Ser	-	LP	2.2	2.2	85	8	19	89
12b ^b	F	33	PHEX	Phe654Ser	29.7	LP	1.7	1.9	100	25	28	50
13	F	44	ENNP1	His535Arg	25.5	VUS	2.3	2.1	38	26	71	36

Abbreviations: CADD, combined annotation-dependent depletion; LB, likely benign; LP, likely pathogenic; PTH, parathyroid hormone; VUS, variant of unknown significance.

^aPossible splicing interference.

^bPatients 12a and 12b are siblings.

benign (Table 3). We also studied 10 relatives of six patients with gene variants; 8 of them also carried the variant present in the index individual (Table 2). Pedigree details are shown in Table S1 and Fig. S1.

Most patients were asymptomatic or had mild manifestations, including mild dental problems ($n = 10$), osteoarthritis ($n = 5$), and tendinopathy ($n = 1$). One patient with an *SLC34A3* variant had mild hypercalciuria and a small kidney stone. One patient with an *SMAD* variant had suffered a hip fracture after a minor trauma.

The two sister patients with *PHEX* mutations had a severe skeletal phenotype with short stature (132 and 135 cm, respectively) and, in one case, severe leg deformities that required corrective surgery. We observed a mild increase in FGF23 levels (50 and 89 pg/mL, respectively). We presumed that the father had transmitted the variant to his offspring because their mother had a normal phenotype, whereas the father was referred to as having short stature, but we could not study him. These two patients had a novel *PHEX* missense variant (Phe654Ser) that had not been previously reported. Several bioinformatic predictors considered it damaging, and no predictor considered it benign. In addition, an alternative variant at the same residue (Phe654Ile) has been reported in ClinVar as likely pathogenic. Therefore, the Phe654 variant was classified as likely pathogenic.

Discussion

The main objective of this study was to uncover genetic causes of hypophosphatemia in adults by performing a retrospective and prospective search of laboratory databases targeting over 200,000 patients in a region with roughly 470,000 individuals over 17 years of age. By using a stepwise approach, we identified 14 individuals with persistent hypophosphatemia presumably related to allelic variants of genes related to phosphate metabolism (Table 2).

Allelic variants in *SLC43A3* and *VDR* were the most frequent (each found in three patients). *SLC43A3* encodes the renal sodium–phosphate cotransporter NPTC2. Biallelic mutations cause hypophosphatemic rickets with hypercalciuria, whereas heterozygous individuals may show mild hypophosphatemia or hypercalciuria [24].

The possibility of performing segregation analyses was limited. Nevertheless, one 17-year-old son of the index patient of family 1 carried the *SLC34A3* nonsense variant and had a phosphate level of 3.5 mg/dL, which may be difficult to interpret before finishing the growth period. Two relatives of the index patient of family 7 carried the same *SLC34A3* mutation and had serum phosphate close to the lower limit of the normal range (2.5 and 2.7 mg/dL). TRP was inappropriately normal, and TmP/GFGR was below normal limits. We could not study any relative of the index patient in family 5, who carried a missense variant.

VDR encodes the vitamin D receptor, which mediates the classical effects of vitamin D metabolites—specifically 1,25(OH)₂D, the most active one. Biallelic pathogenic variants of *VDR*, either single-nucleotide or structural, cause vitamin D-dependent rickets type 2A [25]. Three patients with mild hypophosphatemia were heterozygous carriers of variants of unknown significance (VUS) in *VDR*, without other relevant clinical manifestations or compensatory increases in 1,25(OH)₂D. Thus, the exact role of the heterozygous genetic variants is unclear. A son of the patient of family 4 had normal serum phosphate despite carrying the allelic variant, a result that does not support its functional relevance. The insufficient 25-hydroxyvitamin D levels in one patient may have contributed to hypophosphatemia.

CYP27B1 encodes the 1 α -hydroxylase that converts 25-hydroxyvitamin D into 1,25(OH)₂D. Pathogenic variants of *CYP27B1* cause the autosomal recessive disease called vitamin D-dependent rickets type 1A. In our series, one patient (in family number 2) carried a monoallelic VUS in this gene. The low circulating levels of 1,25(OH)₂D are consistent with diminished enzymatic activity. However, FGF23 serum levels were increased, which was unexpected, as 1,25(OH)₂D is a positive regulator of FGF23 expression [26]. By contrast, two family members who carried the same mutation had normal phosphate and FGF23 levels. Although the exact pathogenic mechanism of hypophosphatemia in this patient is unclear, it could be FGF23-mediated, in relation to an unidentified disorder causing high FGF23 levels. It should be highlighted that we did not find any evidence of oncogenic osteomalacia, a disorder usually related to excess FGF23 [7].

Homozygous mutations of the *DMP1* gene cause autosomal recessive hypophosphatemic rickets type 1 and may be associated with enthesopathy. *DMP1* is critical for osteoblast–osteocyte differentiation, which is important for mineralization. *DMP1* deficiency increases *FGF23* levels by poorly understood mechanisms [27]. The index patient in family 6 had a *DMP1* missense variant of unknown significance (Arg478Ala). Serum *FGF23* levels were within the normal range, and a sibling carrying the same variant had normal phosphate and *FGF23* levels. Both findings argue against the pathogenic role of the Arg478Ala variant.

Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 (*ENPP1*) catalyzes the hydrolysis of ATP/GTP to AMP/GMP, thus generating pyrophosphate. Alkaline phosphatase hydrolyzes pyrophosphate to form two phosphate molecules that the mineralizing osteoid incorporates. Overall, *ENPP1* activity increases phosphate levels by providing a source of phosphate, as well as decreasing its urinary elimination by inhibiting *FGF23*. Pathogenic variants of *ENPP1* may have various phenotypic consequences, such as arterial calcification, hearing loss, ossification of the posterior longitudinal ligament, pseudoxanthoma elasticum, or autosomal recessive hypophosphatemic rickets type 2 [28].

It has been recently described that *ENPP1* exerts a gene dose effect that may be responsible for a mild disease with hypophosphatemia and early onset osteoporosis in individuals heterozygous for *ENPP1* variants [29]. That might be the case for one patient in our series, but it was not possible to perform a segregation analysis.

Dent disease type 1 is renal tubular dysfunction, characterized by proteinuria, hypercalciuria, nephrocalcinosis, nephrolithiasis, and hypophosphatemia, among other manifestations [30]. It is caused by pathogenic variants of *CLCN5*. This gene encodes a voltage-dependent chloride/proton exchanger, and it is located on Xp11.23. As an X-linked disease, it manifests in hemizygous men. Female carriers are usually asymptomatic, but some may have mild manifestations due to skewed X-chromosome inactivation. An index patient in this series and his brother, both with persistent hypophosphatemia, carried a *CLCN5* variant. However, another noncarrier brother had normal serum phosphorus. Thus, although classified as VUS, the missense Val699Ile variant seems to be functionally relevant.

TGF β is known to have complex effects on skeletal homeostasis, and *SMAD3* mutations have been associated with the Loey–Dietz syndrome and other skeletal phenotypes [31–33]. A 43-year-old woman with spondyloarthropathy and an atraumatic hip fracture carried a VUS in the *SMAD3* gene, which encodes a protein involved in *TGF β* signaling. The patient in this series presented intermittent hypophosphatemia, with serum values between 2.1 and 2.7. A patient's daughter who did not carry the variant had normal phosphate. Thus, although there is no reported association between *SMAD3* variants and hypophosphatemia, this issue merits further investigation.

Pathogenic variants of *FGFR1* have been associated with several skeletal phenotypes [34]. An Ser219Phe variant of the fibroblast growth factor receptor 1 (*FGFR1*) was observed in a 50-year-old man with asymptomatic persistent hypophosphatemia (1.8–2.4 mg/dL) and low TRP. The variant was present in 16% of reads, thus suggesting mosaicism. It had not been previously reported and was classified as VUS. Some patients also present hypophosphatemia, due to increased urinary losses. The mechanism has not been fully elucidated, but it may include the klotho-induced conversion of *FGFR1* into a *FGF23* receptor [35]. Mosaic status in this patient might explain the mild phenotype.

PHEX gene is located on the short arm of the X chromosome and encodes an endopeptidase expressed mainly in osteoblasts, osteocytes, and teeth. More than 800 different mutations have been found. In most cases, it is inherited with an X-linked dominant pattern, but about one third of patients may be due to “de novo” mutations, as they lack a family history [36, 37]. Two patients with typical XLH due to *PHEX* mutations were also identified in our study. They had short stature and variable bone deformities. They had been diagnosed in infancy but had been lost to follow-up. The Phe654Ser variant, presumably of paternal origin, had not been previously reported.

Most of the patients in this series, other than those with *PHEX* mutations, either had no symptoms or had minor ailments such as enthesopathy and slightly premature tooth loss, which cannot be linked with certainty to hypophosphatemia. Thus, the clinical relevance of the mutations found is unclear despite their association with low serum phosphate. Nevertheless, we do not

know if those may be evolving disorders with more clinical manifestations appearing with aging.

Two patients with XLH showed important clinical manifestations, including short stature, bone deformities, and musculoskeletal pain because of rickets, despite having been treated with active vitamin D and phosphate supplements since childhood. Burosumab availability will certainly improve the prognosis of patients in the future [38]. XLH is considered the most frequent genetic origin of hypophosphatemia. Given our data, this concept seems questionable. However, XLH certainly seems to be the most common genetic cause of clinically significant hypophosphatemia. The frequency has been estimated at 1/25,000 live births [37], but the prevalence would be considerably lower in our study (roughly 1/200,000). Although we may have missed some patients, the number is unlikely to rise until those figures are retrieved. Therefore, XLH is less frequent in our region than in other regions, such as the United Kingdom, with an estimated prevalence of 15 cases per million people [39]. However, it is not very different from prevalence reported in other countries, such as Norway, where Rafaelsen et al. identified about four cases per million inhabitants (1 per 60,000 children) [40].

Interestingly, several individuals with hypophosphatemia intermittently showed serum phosphate levels within the normal range (although usually within the lower region of the reference range). Serum phosphate depends on meal ingestion and other factors. So, we do not know if those changing values are due to incomplete fasting or reflect changes in the homeostatic status. Whatever the cause may be, it has important practical implications, both for the clinic and further epidemiological studies, as isolated phosphate values within the normal range should not be considered a strong argument against a genetic abnormality or other underlying disorder causing hypophosphatemia.

A major strength of this study derives from the large database, which included various individuals identified over a long period. However, it also has some limitations. The retrospective nature of the first phase and the pragmatic approach of the prospective one limited the clinical data available. A significant proportion of patients were lost to follow-up or elected not to participate in the study. None of them had severe skeletal manifestations

that could have suggested the existence of overt rickets history or osteomalacia. In addition, some patients lacked biochemical urinary parameters because we focused on serum biochemical tests and genetic analysis, given the primary objective of the study. Moreover, the absence of enough relatives with and without hypophosphatemia limited the possibility of performing segregation analysis and the elucidation of the pathogenicity of some allelic variants, consequently.

In conclusion, after an extensive search of laboratory databases, we identified 14 index patients with hypophosphatemia and variants in genes related to phosphate metabolism. The phenotype of most patients was mild, but two patients with XLH due to novel PHEX mutations had marked skeletal abnormalities. Although the frequency of XLH seems to be lower in our region than in other populations, our data are consistent with the conception that XLH is the most common cause of genetic hypophosphatemia with an overt musculoskeletal phenotype, and other mild phenotype hereditary diseases are being uncovered thanks to the use of new DNA sequencing techniques.

Author contributions

Supervision; data curation; investigation; formal analysis; resources; writing—original draft; writing—review and editing; visualization; project administration: Nuria Puente-Ruiz. *Data curation; investigation; formal analysis; resources; writing—review and editing; visualization:* Pablo Docio. *Conceptualization; methodology; supervision; writing—review and editing; visualization; funding acquisition; project administration:* María T. García Unzueta. *Data curation; resources; writing—review and editing; visualization:* Bernardo A. Lavín. *Investigation; writing—review and editing; visualization:* Ainhoa Maiztegi. *Data curation; investigation; writing—review and editing; visualization:* Ana Isabel Vega. *Resources; writing—review and editing; visualization:* María Piedra. *Conceptualization; methodology; writing—review and editing; visualization:* Leyre Riancho-Zarrabeitia. *Investigation; writing—review and editing; visualization:* Fátima Mateos. *Data curation; writing—review and editing; visualization:* Domingo Gonzalez-Lamuño. *Writing—review and editing; visualization:* Carmen Valero. *Conceptualization; methodology; supervision; formal analysis; writing—original draft; writing—review and editing; visualization; fund-*

ing acquisition; project administration: José A. Riancho.

Conflict of interest statement

NPR, DGL, and JAR have received research grants or speaker fees from Kyowa-Kirin. Other authors declare that they have no conflict of interests.

Funding information

This study was funded by Kyowa Kirin Co., Ltd.

References

- Tebben PJ. Hypophosphatemia: a practical guide to evaluation and management. *Endocr Pract.* 2022;**28**:1091–9.
- Wozniak H, Dos Santos Rocha A, Beckmann TS, Larpin C, Buetti N, Quintard H, et al. Hypophosphatemia on ICU admission is associated with an increased length of stay in the ICU and time under mechanical ventilation. *J Clin Med.* 2022;**11**:581.
- Thongprayoon C, Cheungpasitporn W, Hansrivijit P, Thirunavukkarasu S, Chewcharat A, Medaura J, et al. Impact of serum phosphate changes on in-hospital mortality. *BMC Nephrol.* 2020;**21**:427.
- Ruppe MD, Jan de Beur S. Disorders of phosphate homeostasis. In: *Primer on the metabolic diseases and disorders of mineral metabolism*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley and Sons; 2019. p. 674–83.
- Che H, Roux C, Etcheto A, Rothenbuhler A, Kamenicky P, Linglart A, et al. Impaired quality of life in adults with X-linked hypophosphatemia and skeletal symptoms. *Eur J Endocrinol.* 2016;**174**:325–33.
- Wharton B, Bishop N. Rickets. *Lancet.* 2003;**362**:1389–400.
- Kritmetapak K, Kumar R. Phosphatonins: from discovery to therapeutics. *Endocr Pract.* 2022;**7**:69–79.
- Quarles LD. Evidence for a bone-kidney axis regulating phosphate homeostasis. *J Clin Invest.* 2003;**112**:642–6.
- Weber TJ, Quarles LD. Molecular control of phosphorus homeostasis and precision treatment of hypophosphatemic disorders. *Curr Mol Biol Rep.* 2019;**5**:75–85.
- Michigami T. Advances in understanding of phosphate homeostasis and related disorders. *Endocr J.* 2022;**69**:881–96.
- Koumakis E, Cormier C, Roux C, Briot K. The causes of hypo- and hyperphosphatemia in humans. *Calcif Tissue Int.* 2021;**108**:41–73.
- Marik B, Bagga A, Sinha A, Khandelwal P, Hari P, Sharma A. Genetic and clinical profile of patients with hypophosphatemic rickets. *Eur J Med Genet.* 2022;**65**:104540.
- Emma F, Cappa M, Antoniazzi F, Bianchi ML, Chiodini I, Eller Vainicher C, et al. X-linked hypophosphatemic rickets: an Italian experts' opinion survey. *Ital J Pediatr.* 2019;**45**:67.
- Kingdom R, Tuke M, Wood A, Beaumont RN, Frayling TM, Weedon MN, et al. Rare genetic variants in genes and loci linked to dominant monogenic developmental disorders cause milder related phenotypes in the general population. *Am J Hum Genet.* 2022;**109**:1308–16.
- Kingdom R, Wright CF. Incomplete penetrance and variable expressivity: from clinical studies to population cohorts. *Front Genet.* 2022;**13**:920390.
- Magrinelli F, Balint B, Bhatia KP. Challenges in clinicogenetic correlations: one gene – many phenotypes. *Mov Disord Clin Pract.* 2021;**8**:299–310.
- Rush ET, Johnson B, Aradhya S, Beltran D, Bristow SL, Eisenbeis S, et al. Molecular diagnoses of X-linked and other genetic hypophosphatemias: results from a sponsored genetic testing program. *J Bone Miner Res.* 2022;**37**:202–14. <https://doi.org/10.1002/jbmr.4454>
- Walton RJ, Bijvoet OLM. Nomogram for derivation of renal threshold phosphate concentration. *Lancet (London, England).* 1975;**2**:309–10.
- Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;**17**:405–24.
- Fowler A. DECoN: a detection and visualization tool for exonic copy number variants. *Methods Mol Biol.* 2022;**2493**:77–88.
- Rentsch P, Schubach M, Shendure J, Kircher M. CADD-Splice-improving genome-wide variant effect prediction using deep learning-derived splice scores. *Genome Med.* 2021;**13**:31.
- Hartley IR, Gafni RI, Roszko KL, Brown SM, de Castro LF, Saikali A, et al. Determination of FGF23 levels for the diagnosis of FGF23-mediated hypophosphatemia. *J Bone Miner Res.* 2022;**37**:2174–85.
- Heijboer AC, Cavalier E. The measurement and interpretation of fibroblast growth factor 23 (FGF23) concentrations. *Calcif Tissue Int.* 2022;**112**:258–70.
- Chen A, Ro H, Mundra VRR, Joseph K, Brenner D, Carpenter TO, et al. Description of 5 novel SLC34A3/NPT2c mutations causing hereditary hypophosphatemic rickets with hypercalciuria. *Kidney Int Rep.* 2019;**4**:1179–86.
- Demir K, Zou M, Al-Rijjal RA, BinEssa H, Acar S, Durmaz E, et al. Novel VDR mutations in patients with vitamin D-dependent rickets type 2a: a mild disease phenotype caused by a novel canonical splice-site mutation. *Endocr Pract.* 2020;**26**:72–81.
- Portales-Castillo I, Simic P. PTH, FGF-23, klotho and vitamin D as regulators of calcium and phosphorus: genetics, epigenetics and beyond. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022;**13**:992666.
- Ni X, Li X, Zhang Q, Liu C, Gong Y, Wang O, et al. Clinical characteristics and bone features of autosomal recessive hypophosphatemic rickets type 1 in three Chinese families: report of five Chinese cases and review of the literature. *Calcif Tissue Int.* 2020;**107**:636–48.
- Choe Y, Shin CH, Lee YA, Kim MJ, Lee YJ. Case report and review of literature: autosomal recessive hypophosphatemic rickets type 2 caused by a pathogenic variant in ENPP1 gene. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022;**13**:91672.
- Oheim R, Zimmerman K, Maulding ND, Stürznickel J, von Kroge S, Kavanagh D, et al. Human heterozygous ENPP1 deficiency is associated with early onset osteoporosis, a phenotype recapitulated in a mouse model of ENPP1 deficiency. *J Bone Miner Res.* 2020;**35**:528–39.
- Burballa C, Cantero-Recasens G, Prikhodina L, Lugani F, Schlingmann K, Ananin PV, et al. Clinical and genetic characteristics of Dent's disease type 1 in Europe. *Nephrol Dial Transplant.* 2022;**16**:518–24.

- 31 El-Gazzar A, Kang H, Fratzl-Zelman N, Webb E, Barnes AM, Jovanovic M, et al. SMAD3 mutation in LDS3 causes bone fragility by impairing the TGF- β pathway and enhancing osteoclastogenesis. *Bone Rep.* 2022;**17**:101603.
- 32 Kang H, Jha S, Ivovic A, Fratzl-Zelman N, Deng Z, Mitra A, et al. Somatic SMAD3-activating mutations cause melorheostosis by up-regulating the TGF- β /SMAD pathway. *J Exp Med.* 2020;**217**:e20191499.
- 33 Guo M, Liu N, Guo Z. MiR-221-5p/Smad3 axis in osteoclastogenesis and its function: potential therapeutic target for osteoporosis. *Steroids.* 2022;**185**:109063.
- 34 Marzin P, Baujat G, Gensburger D, Huber C, Bole C, Paniel M, et al. Heterozygous FGFR1 mutation may be responsible for an incomplete form of osteoglyphonic dysplasia, characterized only by radiolucent bone lesions and teeth retentions. *Eur J Med Genet.* 2020;**63**:103729.
- 35 Chen G, Liu Y, Goetz R, Fu L, Jayaraman S, Hu M-C, et al. α -Klotho is a non-enzymatic molecular scaffold for FGF23 hormone signalling. *Nature.* 2018;**553**:461–6.
- 36 Sarafrazi S, Daugherty SC, Miller N, Boada P, Carpenter TO, Chunn L, et al. Novel PHEX gene locus-specific database: comprehensive characterization of vast number of variants associated with X-linked hypophosphatemia (XLH). *Hum Mutat.* 2022;**43**:143–57.
- 37 Haffner D, Emma F, Eastwood DM, Duplan MB, Bacchetta J, Schnabel D, et al. Clinical practice recommendations for the diagnosis and management of X-linked hypophosphataemia. *Nat Rev Nephrol.* 2019;**15**:435–55.
- 38 Imel EA, Glorieux FH, Whyte MP, Munns CF, Ward LM, Nilsson O, et al. Burosumab versus conventional therapy in children with X-linked hypophosphataemia: a randomised, active-controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet.* 2019;**393**:2416–27.
- 39 Hawley S, Shaw NJ, Delmestri A, Prieto-Alhambra D, Cooper C, Pinedo-Villanueva R, et al. Prevalence and mortality of individuals with X-linked hypophosphatemia: A United Kingdom real-world data analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2020;**105**:e871–8.
- 40 Rafaelsen S, Johansson S, Ræder H, Bjerknes R. Hereditary hypophosphatemia in Norway: a retrospective population-based study of genotypes, phenotypes, and treatment complications. *Eur J Endocrinol.* 2016;**174**:125–36.

Correspondence: José A. Riancho, Servicio de Medicina Interna, Hospital U M Valdecilla, Universidad de Cantabria, Instituto de Investigación Valdecilla (IDIVAL), Santander, Spain.
Email: rianchoj@unican.es

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Supporting Information

Supporting Information ■



Volume 16S, May 2022

ISSN 2352-1872



Co-Editors-in-Chief: Jane Aubin and David B. Burr



European Calcified Tissue Society

Abstracts of the ECTS 2022 Congress
49th European Calcified Tissue Society Congress
7 – 10 May 2022

ND-P028**Disorders causing secondary hypophosphatemia in adult outpatients**

Nuria Puente^a, María T. García-Unzueta^b, Pablo Docio^c, Leyre Riancho-Zarrabeitia^d, Domingo González-Lamuño^e, Fátima Mateos^e, Bernardo A. Lavín^b, Ainhoa Maiztegi^b, Carmen Valero^a, José A. Riancho^a

^aHospital U M Valdecilla, Internal Medicine, Santander, Spain

^bHospital U M Valdecilla, Clinical Analysis, Santander, Spain

^cHospital U M Valdecilla, Pediatrics, Santander, Spain

^dHospital U Sierrallana, Rheumatology, Torrelavega, Spain

^eHospital U Sierrallana, Clinical Analysis, Torrelavega, Spain

Introduction: Acute severe disorders, such as acidosis, are well-known to cause a decrease in serum phosphorus that normalizes when patient recovers. Causes of persistent hypophosphatemia include different genetic and acquired disorders, but they are less recognized.

Purpose: The purpose of this study was to determine the most common disorders causing persistent hypophosphatemia in an outpatient setting.

Methods: We interrogated the Clinical Biochemistry database to identify phosphorus analyses in outpatients during years 2003 through 2019. An automatic algorithm were also implemented that prospectively added phosphorus to all serum chemistries requests for patients under 56 years of age, during a 14 month period in 2020-21. The clinical charts of patients with low serum phosphorus (<2.2 mg/dl) were reviewed.

Results: Total number of phosphorus analyses were 692,623 and 183,973 in the retrospective and prospective phases, respectively. Overall, 1,150 patients had at least one analysis with low serum phosphorus; 624 of them had normal value in later analyses, 108 had phosphorus analysed only once and 138 cases lacked relevant information. Of the remaining 280 cases, excessive alcohol consumption and hyperparathyroidism were the most common causes of hypophosphatemia; organ transplant was also frequent (23 renal, 5 bone marrow and 1 lung transplants). No secondary causes were found in 35 patients, thus suggesting a possible genetic cause (table).

Conclusion: Our data show that persistent hypophosphatemia in outpatients has a variety of causes. Excessive alcohol consumption, primary hyperparathyroidism, organ transplant, and some drug therapies (antiretrovirals and parenteral iron) are among the most frequent causes. In cases with hypophosphatemia of unknown origin, a genetic study could be considered.

Disorder	n	%
Primary hyperparathyroidism	48	17,0
Alcohol	43	15,4
Secondary hyperparathyroidism/VitaminD deficiency	42	15,0
Transplant	29	10,4
Antiretroviral drugs	26	9,3
Bariatric surgery	23	8,2
Intravenous iron	15	5,4
Eating disorders	5	1,8
Inflammatory bowel disease	3	1,1
Other disorders	11	3,9
Unknown cause	35	12,5
Total	280	100

doi:10.1016/j.bonr.2022.101557

ND-P029**Effects of Encaleret (CLTX-305) on Mineral Physiology in Autosomal Dominant Hypocalcemia Type 1 Demonstrate Proof-of-Concept: Early Results from a Phase 2B, Open-Label, Dose-Ranging Study [NCT04581629]**

Rachel Gafni^a, Iris Hartley^a, Kelly Roszko^a, Edward Nemeth^b, Karen Pozo^a, Ramei Sani-Grosso^c, Arun Mathew^c, Ananth Sridhar^c, Mary Scott Roberts^c, Jonathan Fox^c, Michael Collins^a

^aNational Institutes of Health, Skeletal Disorders and Mineral Homeostasis Section- NIDCR, Bethesda, United States

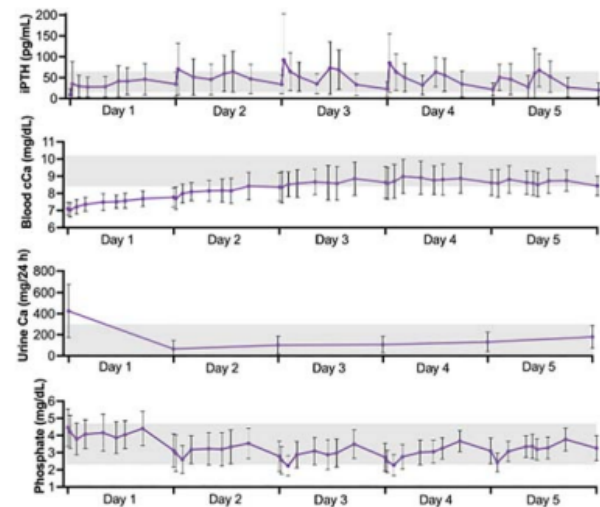
^bMetisMedica, MetisMedica, Toronto, Canada

^cCalcilytix Therapeutics- Inc, Calcilytix Therapeutics- Inc, San Francisco, United States

Introduction/Purpose: Autosomal dominant hypocalcemia type 1 (ADH1), caused by activating variants in the calcium-sensing receptor gene (CASR), is characterized by hypocalcemia, hyperphosphatemia, hypomagnesemia, low parathyroid hormone (PTH), and hypercalciuria. Conventional therapy with calcium and active Vitamin D worsens hypercalciuria, which may lead to renal morbidity. Encaleret is an investigational calcium receptor antagonist that decreases receptor sensitivity to extracellular calcium and normalizes blood and urine abnormalities in rodent ADH1 models.

Methods: Thirteen adults with ADH1 due to 9 distinct CASR variants were studied in a Phase 2b, open-label, dose-ranging study. Conventional therapy was discontinued prior to encaleret initiation. Period 1 was a 5-day inpatient dose-escalation course, which suggested general tolerability and preliminary efficacy (n=6). Period 2 (P2) was a 5-day inpatient course (n=13) in which doses were individually titrated to normalize albumin-corrected blood calcium (cCa) and minimize hypercalciuria and hypophosphatemia. During the study, participants remained off conventional therapy and underwent frequent biochemical testing.

Results: The mean±SD encaleret dose on P2 Day 5 (P2D5) was 94±64mg BID (range:10-180 BID). Serial sampling during P2 demonstrated correction of the biochemical abnormalities of ADH1 (Figure, mean±SD). Compared to baseline, 24-hour PTH had normalized by P2D5 (6.3±7.8pg/mL vs. 40.5±37.5, p<0.01, nl 10-65). Likewise, baseline hypocalcemia (cCa=7.1±0.4mg/dL [nl



Values below limit of assay quantitation were marked as "0." Gray area reflects normal ranges.

