



La variante c.1304T>G p.(Met435Arg) en el gen *PHEX* probablemente esté relacionada con raquitismo hipofosfatémico.

Javier López Montiel⁽¹⁾, Sara Franco Freire⁽²⁾, Carmen Palma Milla⁽¹⁾, José Miguel Lezana Rosales⁽¹⁾, Sandra M^a Carmona Tamajón⁽¹⁾, Carmen Torres Fernández⁽¹⁾, Carlos Sánchez Linares⁽¹⁾, Julio Torres González⁽¹⁾, Lucas David Andrés Garrido⁽¹⁾, Carmen Benito López⁽²⁾, Vidal Pérez Valero⁽²⁾, Juan López Siles⁽¹⁾
⁽¹⁾C.B.M. Genetaq, ⁽²⁾Hospital Regional Universitario Carlos Haya

Introducción

El espectro fenotípico de la hipofosfatemia ligada al cromosoma X (XLH) comprende desde una hipofosfatemia aislada a un arqueamiento severo de las extremidades inferiores. El XLH frecuentemente se manifiesta en los dos primeros años de vida, cuando el arqueamiento empieza a ser evidente. Sin embargo, en ocasiones no se presenta hasta la edad adulta con una estatura corta no evaluada previamente. En adultos, la entesopatía (calcificación de los tendones, ligamentos y cápsulas de las articulaciones) puede ser la presentación inicial e ir asociada a dolor articular y defecto en la movilidad. Las personas afectas son propensas a tener abscesos dentales espontáneos y pérdida de audición neurosensorial. El modo de herencia es dominante ligado al cromosoma X.

El diagnóstico de XLH se lleva a cabo cuando aparecen estas características clínicas, junto con la presencia de evidencias radiológicas y baja concentración de fosfato en suero acompañado de una reducida resorción tubular de fosfato. El análisis genético molecular del gen *PHEX* confirma el diagnóstico. Dicho gen codifica una proteína de función desconocida (posiblemente una endopeptidasa), presente en huesos y dientes.

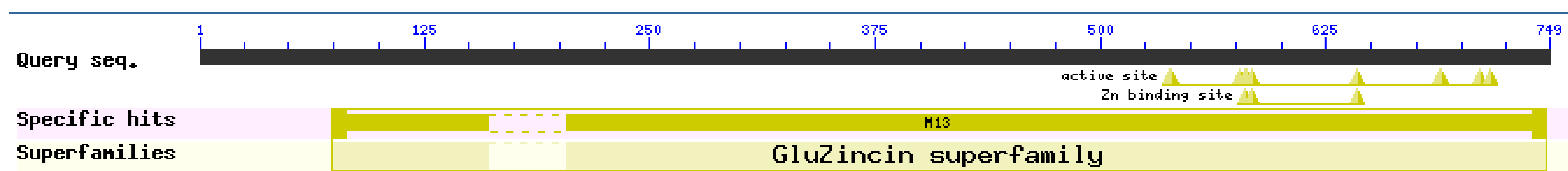


Figura 1: Dominios conservados del gen *PHEX*, de acuerdo a la secuencia de referencia NP_000435.3 (NCBI).

Objetivos

Se presenta un caso familiar de raquitismo hipofosfatémico. Dada la sospecha clínica familiar, se pretende confirmar molecularmente a los pacientes afectos, así como asesorar genéticamente a la familia.

Material y método

Los dos únicos miembros afectos, la paciente probando y su hija, tienen arqueamientos en ambas piernas. Talla de la probando: 150 cm, su madre falleció por insuficiencia renal. El estudio en la paciente probando se llevó a cabo por amplificación de los 22 exones codificantes del gen *PHEX* por PCR con *primers* intrónicos específicos (según la secuencia de referencia NM_000444.5). Posterior secuenciación en doble sentido de los productos de amplificación obtenidos mediante secuenciador automático ABI 3130XL de *Applied Biosystems*. Estudio de las secuencias obtenidas con el *software* SeqScape v.2.5, Para el resto de familiares se amplificó y secuenció únicamente el exón de interés (12), por tecnología Sanger o por secuenciación masiva (*MiSeq*, *Illumina*).



Figura 2: *workflow* para el análisis de todos los exones codificantes del gen *PHEX* y el estudio familiar dirigido al exón 12,

Resultados

Se detectó en la paciente probando la variante de significado clínico incierto c.1304T>G p.(Met435Arg) en el exón 12 en heterocigosis. Este cambio *missense* no ha sido descrito hasta la fecha y su frecuencia alélica en bases de población control (ExAC y 1000 genomas) es nula. El nucleótido timina1304 de este gen está altamente conservado en la filogenia, constituyendo la segunda base del inicio del exón, la cual es conservada en las secuencias donadoras de *splicing*. El aminoácido metionina435 se encuentra en el dominio conservado de metalopeptidasa 13.

Los predictores *in silico* aplicados no llegan a un consenso en cuanto a la posible patogenicidad de la variante (ver tabla 1). Se realizó un estudio familiar de la variante, se analizaron los dos hijos de la paciente probando, sus dos hermanos y su padre. Únicamente se detectó la variante en la hija de la probando, también afecta. El resto de familiares, todos ellos asintomáticos, fueron negativos para el estudio genético.

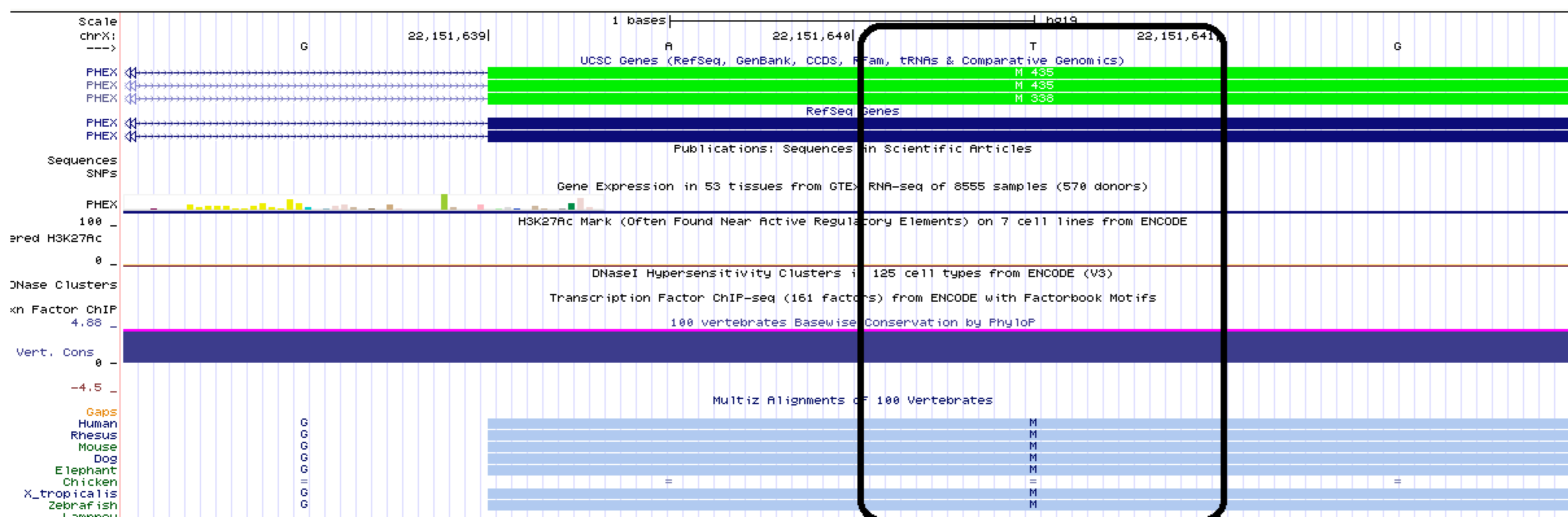


Figura 3: En la imagen se señala el nucleótido y aminoácidos afectados por la variante. La barra morada indica la conservación nucleotídica relativa, estando es su valor máximo. Debajo puede apreciarse una comparativa a lo largo de la filogenia del aminoácido metionina435, conservado en todas las especies. Se detalla además la proximidad del nucleótido afectado con la región intrónica (es la segunda base del exón).

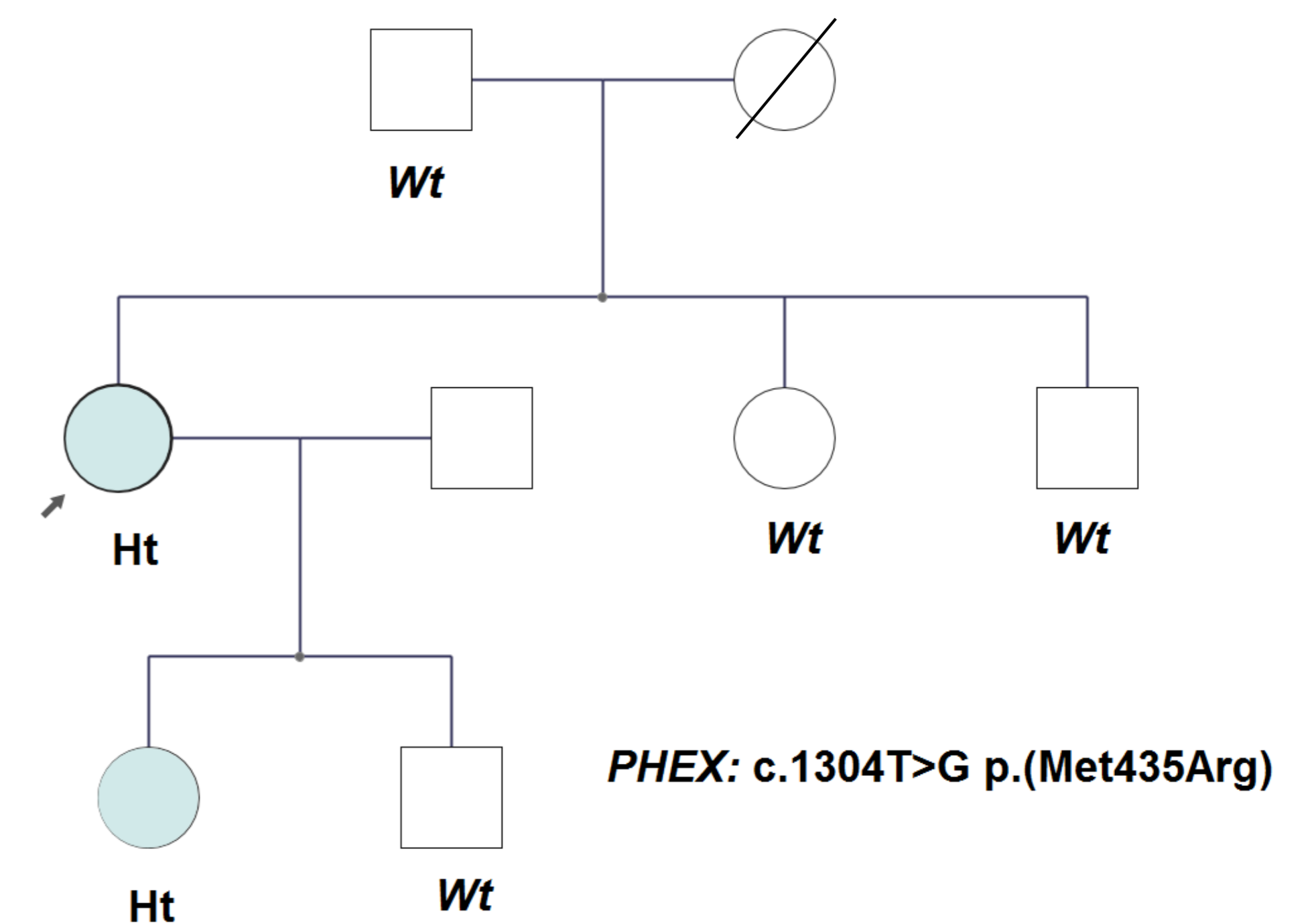


Figura 4: Pedigrí familiar. En verde son marcados los pacientes afectados. Ht: heterocigoto para la variante. Wt: wild type (genotipo silvestre). La paciente probando es señalada con una flecha.

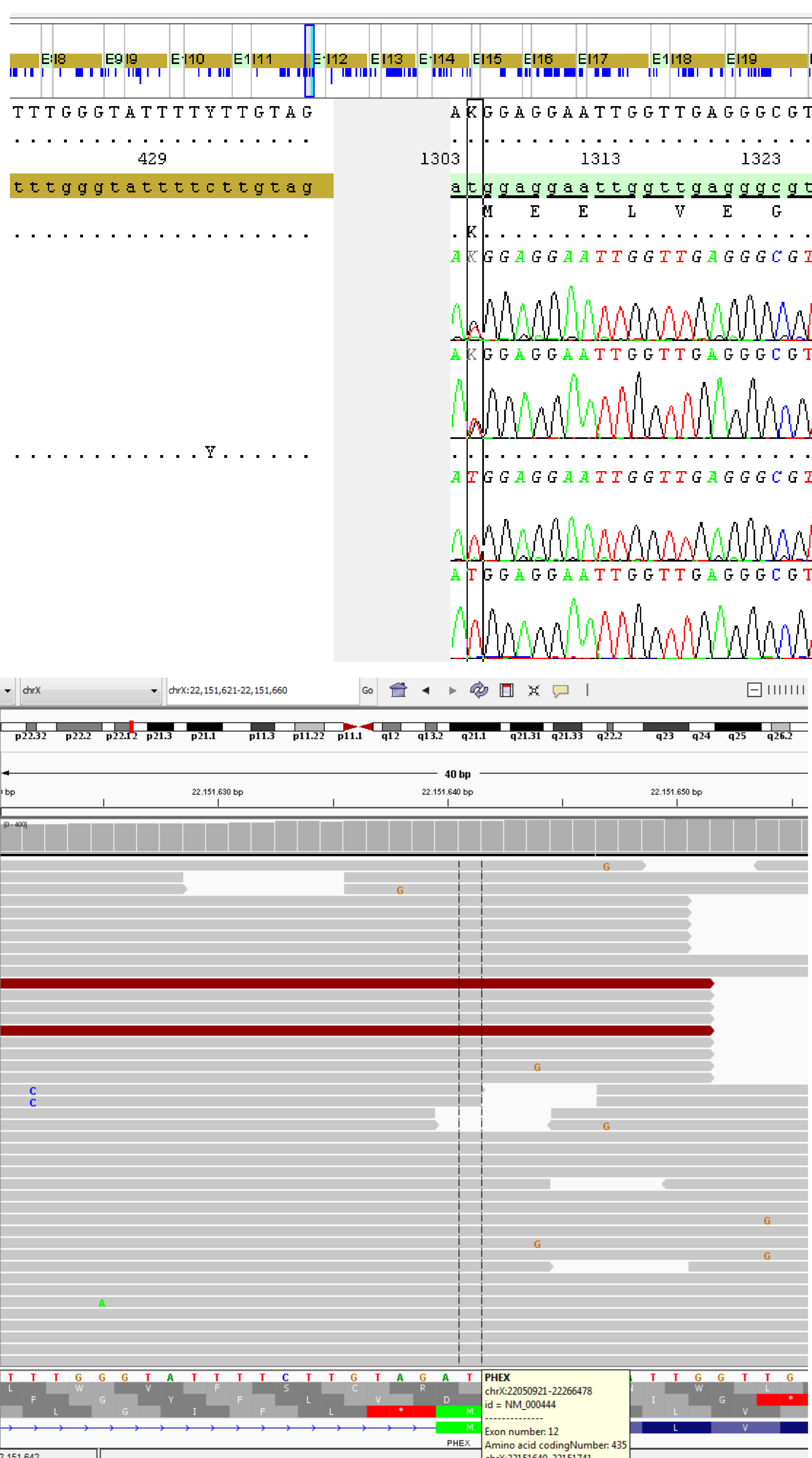


Figura 5: Arriba: Electroferograma de la secuenciación Sanger de la variante c.1304T>G en el gen *PHEX*. En la parte superior se muestra un familiar heterocigoto y en la inferior un caso negativo. En la imagen inferior se muestra un caso negativo secuenciado por *Next Generation sequencing* y visualizado mediante IGV.

HERRAMIENTA	PHEX: c.T1304G:p.M435R
SIFT	Deletéreo
Polyphen 2 HVar	Benigno
LTR	Deletéreo
Mutation Taster	Deletéreo
Mutation Assessor	Bajo riesgo
FATHMM	Tolerado
SVM	Tolerado
LR	Tolerado
Human Splice Finder	Activación de un sitio aceptor críptico exónico. Potencial alteración de <i>splicing</i>
Conservación	
PhyloP	Totalmente conservado
Dominio de la proteína	Familia peptidasa M13

Tabla 1: Predicciones *in silico* de la variante detectada. Los predictores para variantes *missense* no son unánimes en cuanto al impacto que pueda tener el cambio sobre la proteína, sin embargo el predictor de *splicing* apunta a un efecto potencial deletéreo.

Conclusión

La co-segregación obtenida entre la presencia de la variante c.1304T>G p.(Met435Arg) en el gen *PHEX* con el fenotipo clínico en esta familia, junto con la ausencia de frecuencia alélica en población control, el posible efecto en un dominio conservado de la proteína y/o un posible impacto en el *splicing*, parecen indicar que este cambio *missense* puede estar relacionado con la patología. Sin embargo, estudios adicionales a nivel de ARN y proteína deberían realizarse para confirmar su implicación clínica.