



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

# Cribado de hipofosfatasa en individuos con niveles de fosfatasa alcalina disminuida mediante la definición de percentiles de fosfatasa alcalina en una selección de centros sanitarios nacionales

Laura Castells Vilella

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

**SJD** Sant Joan de Déu  
Barcelona · Hospital

**“Cribado de hipofosfatasa en individuos con niveles de fosfatasa alcalina disminuida mediante la definición de percentiles de fosfatasa alcalina en una selección de centros sanitarios nacionales”**

Memoria de tesis doctoral presentada por **Laura Castells Vilella** para optar al grado de doctora por la Universidad de Barcelona.

Director y tutor:

**Dr. Jordi Antón López**

Profesor asociado del Departament de Cirurgia i Especialitats Medicoquirúrgiques de la Universitat de Barcelona  
Jefe de la Unidad de Reumatología Pediátrica  
Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona

Cordirectora:

**Dra. María Luz Couce Pico**

Catedrática de Pediatría. Universidad de Santiago de Compostela  
Jefe de Servicio de Neonatología  
Directora de la Unidad de Diagnóstico y Tratamiento de Enfermedades Metabólicas Congénitas  
Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela

Programa de Doctorado Medicina e Investigación Traslacional  
Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud. Universidad de Barcelona

Mayo de 2.025

## AUTORIZACIÓN DE LA PRESENTACIÓN DE LA TESIS

El Dr. Jordi Antón López, Profesor asociado del Departament de Cirurgia i Especialitats Medicoquirúrgiques de la Universitat de Barcelona con DNI 46.653.664-G y la Pfra. María Luz Couce Pico, Catedrática de Pediatría de la Facultad de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela con DNI: 76.341.512-G,

### DECLARAN QUE:

La memoria de tesis presentada por la Sra. Laura Castells Vilella con título “Cribado de hipofosfatasa en individuos con niveles de fosfatasa alcalina disminuida mediante la definición de percentiles de fosfatasa alcalina en una selección de centros sanitarios nacionales”, ha sido realizada bajo nuestra dirección y que autorizamos su depósito para ser defendida y juzgada por un tribunal.

Firmado el día 28 de mayo de 2.025.

**JORDI ANTON  
LOPEZ - DNI  
46653664G**

Firmado digitalmente  
por JORDI ANTON  
LOPEZ - DNI 46653664G  
Fecha: 2025.05.29  
21:52:44 +02'00'

Firmado por COUCE PICO MARIA  
DE LA LUZ - \*\*\*4151\*\* el día  
29/05/2025 con un certificado  
emitido por AC FNMT Usuarios

Director

Directora

## DECLARACION DE AUTORIA DE LA TESIS

La doctoranda Sra. Laura Castells Vilella, con DNI: 36.517.618-N

### DECLARA QUE

Es autora de la tesis doctoral titulada “Cribado de hipofosfatasa en individuos con niveles de fosfatasa alcalina disminuida mediante la definición de percentiles de fosfatasa alcalina en una selección de centros sanitarios nacionales”.

Firmado el día 28 de mayo de 2.025.

Laura  
Castells  
Vilella



Signat  
digitalment per  
Laura Castells  
Vilella  
Data: 2025.05.29  
21:48:47 +02'00'

La doctoranda

## DECLARACIÓN DE LA PERSONA DOCTORANDA Y DE LA PERSONA/S QUE DIRIGE/N DE LA ORIGINALIDAD Y BUENAS PRÁCTICAS DE LA TESIS

El Dr. Jordi Antón López, Profesor asociado del Departament de Cirurgia i Especialitats Medicoquirúrgiques de la Universitat de Barcelona, y la Pfra. María Luz Couce Pico, Catedrática de Pediatría de la Facultad de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela con DNI: 76.341.512-G, y la doctoranda Laura Castells Vilella con DNI: 36.517.618-N

### DECLARAN QUE

La tesis doctoral, con título "Cribado de hipofosfatasa en individuos con niveles de fosfatasa alcalina disminuida mediante la definición de percentiles de fosfatasa alcalina en una selección de centros sanitarios nacionales", es original, conteniendo resultados e información fruto de investigación propia, y que no contiene plagios de otras tesis, publicaciones o investigaciones de otros autores. Asimismo, confirman que se han seguido los códigos éticos y de buenas prácticas, para su elaboración.

Manifiestan que consienten que la memoria de tesis pueda ser sometida a procedimientos para la comprobación de su originalidad.

Para que así conste, firman el día 28 de mayo de 2.025.

JORDI ANTON  
LOPEZ - DNI  
46653664G

Firmado digitalmente  
por JORDI ANTON  
LOPEZ - DNI  
46653664G  
Fecha: 2025.05.29  
21:53:15 +02'00'

Director

Firmado por COUCE PICO  
MARIA DE LA LUZ -  
\*\*\*4151\*\* el día  
29/05/2025 con un  
certificado emitido por

Directora

Laura  
Castells  
Vilella

Signat digitalment  
per Laura Castells  
Vilella  
Data: 2025.05.29  
21:49:12 +02'00'

Doctoranda

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera dar mi agradecimiento a los directores de este proyecto de Tesis de Doctoral. A la Pfra. María Luz Couce, por haberme impulsado en esta aventura y confiado en mí desde el primer momento. Siempre estaré agradecida de que me acogieras en mis inicios en la investigación y me hayas acompañado en cada etapa de este camino. Al Dr. Jordi Antón por estar ahí siempre que le he necesitado y por transmitirme su paz. A ambos os agradezco todo vuestro esfuerzo, vuestra calidez y ánimo continuo durante estos años.

También quiero agradecer a Pia Cassanello por empezar conmigo este camino ese mes de septiembre cuando cuidamos y sufrimos la pérdida de Biel junto a sus padres, nuestro ángel protagonista y la semilla de esta historia. A ellos, también gracias.

A Rocío Díaz, a Isabel Merino y a Matías Gámez, gracias por ser fundamentales en la recogida de datos para este estudio.

A mi mentor como pediatra, mi jefe, mi compañero, mi paño de lágrimas en tantas ocasiones, Félix Muñiz, a quien le debo demasiado. Sin ti, esta tesis tampoco hubiera llegado a su fin.

A mis "Nuris", Núria Gorina y Nuri Pumares, mis amigas y compañeras de profesión, gracias por aguantar mis dolores de cabeza, mis malos momentos y por tantas sesiones de psicoterapia de amigas.

A Rosa, mi Rous, por estar siempre ahí, remando juntas para conseguir nuestro doctorado.

A mis amigas, por estar siempre ahí, por vuestra amistad, por tantas cenas, sesiones de risoterapia y tantos viajes juntas.

A mi padre, que desde el cielo me has dado la fuerza para poder seguir adelante en mis momentos duros, y por enseñarme en la tierra los valores del trabajo y la perseverancia. A mi madre, por tu cariño, por tus abrazos, por tus besos y por darme la vida.

A mis hermanos, en especial a Lali, mi inseparable hermana, mi confidente y mejor amiga, por los audios eternos que hemos compartido, por tus consejos, por tus recetas para subir el ánimo, gracias por ser como eres.

A mi familia, sobre todo a mi marido Ramon, por tus consejos siempre tan sensatos, a mis tres hijos, Ramon, Eugènia y Mariona, gracias por vuestra comprensión, vuestro soporte incondicional, por aguantar mi mal humor cuando el trabajo me superaba, por vuestra paciencia diaria y por sacarme siempre una sonrisa. No hay palabras para tanto agradecimiento ni para describir lo importantes que sois para mí. No puedo ser más feliz a vuestro lado.

A todos, muchas gracias.

## FINANCIACIÓN

Para el primer artículo se obtuvo financiación del grupo de investigación C012 del IDIS.

Para la realización de la base de datos del estudio se obtuvo financiación estadística del grupo Quirónsalud.

No se ha obtenido financiación para el segundo artículo.

## 1. INTRODUCCIÓN > 21

### 1.1. Marco histórico > 22

### 1.2. Hipofosfatasa > 25

#### 1.2.1. Concepto > 25

#### 1.2.2. Fisiopatología > 25

#### 1.2.3. Prevalencia > 29

#### 1.2.4. Presentación clínica > 30

##### 1.2.4.1. HPP perinatal grave o letal > 32

##### 1.2.4.2. HPP perinatal benigna > 33

##### 1.2.4.3. HPP del lactante > 34

##### 1.2.4.4. HPP infanto-juvenil > 35

##### 1.2.4.5. HPP del adulto > 36

##### 1.2.4.6. Odontohipofosfatasa o HPP dental > 37

##### 1.2.4.7. Pseudohipofosfatasa > 38

#### 1.2.5. Diagnóstico de HPP > 38

##### 1.2.5.1. Hipofosfatemia > 38

##### 1.2.5.2. Acúmulo de sustratos de la TNSALP > 40

##### 1.2.5.3. Hallazgos radiológicos > 43

##### 1.2.5.4. Signos de alerta diagnóstica de HPP > 46

##### 1.2.5.5. Diagnóstico genético > 47

##### 1.2.5.6. Diagnóstico prenatal > 48

#### 1.2.6. Tratamiento de la HPP > 49

#### 1.2.7. Registro Global de HPP > 51

### 1.3. Fosfatasa alcalina como parámetro de laboratorio > 54

#### 1.3.1. Medición de la FA > 54

#### 1.3.2. Valores de normalidad de FA > 56

#### 1.3.3. Intervalos de referencia > 58

## **2. HIPÓTESIS > 60**

## **3. OBJETIVOS > 62**

## **4. MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS > 64**

### **4.1. Material y métodos > 65**

- 4.1.1. Participantes del estudio > 65
- 4.1.2. Procedimientos analíticos > 66
- 4.1.3. Análisis estadístico y cálculo de percentiles > 67

### **4.2. Resultados > 68**

- 4.2.1. Distribución de percentiles > 69

## **5. DISCUSIÓN > 78**

- 5.1. Justificación e importancia de la publicación de nuestro caso y revisión de la enfermedad. > 79
- 5.2. Infradiagnóstico de la HPP y necesidad de definir los valores de referencia de la FA. > 83
- 5.3. Definición de intervalos de referencia y gráficos de percentiles de la FA en población española. > 86
  - 5.3.1. Selección de la población de referencia. > 87
  - 5.3.2. Características demográficas y geográficas. > 87
  - 5.3.3. Método estadístico. > 87
  - 5.3.4. Estandarización y metodología analítica. > 87
  - 5.3.5. Consideración de factores fisiológicos. > 88
  - 5.3.6. Validación y revisión continua. > 88
- 5.4. Identificación de pacientes con hipofosfatasemia y realización de diagnóstico diferencial. > 90
  - 5.4.1. Medición de la actividad de la FA. > 91
  - 5.4.2. Evaluación clínica y radiológica. > 91
  - 5.4.3. Exclusión de otras causas de hipofosfatasemia. > 91
  - 5.4.4. Análisis de sustratos de la FA. > 92

- 5.4.5. Estudio genético. > 92
- 5.5. Algoritmo diagnóstico para la detección de pacientes con HPP y confirmación diagnóstica. > 93
- 5.6. Fortalezas de la tesis doctoral. > 95
- 5.7. Limitaciones de la tesis doctoral. > 96
- 5.8. Perspectivas futuras y posibles líneas de investigación. > 96

## **6. CONCLUSIONES > 98**

## **7. BIBLIOGRAFÍA > 100**

## **8. ANEXOS > 113**

- 8.1. ANEXO 1: "Neonatal lethal hypophosphatasia: A case report and review of literature." > 114
- 8.2. ANEXO 2: "Age- and Sex-Dynamic Fluctuations and Reference Intervals for Alkaline Phosphatase Among the Spanish Population." > 119

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1** > 26 Identidades, asignaciones cromosómicas y principales expresiones fisiopatológicas de los genes que codifican para las FA humanas.
- Figura 2** > 27 Esquema fisiopatología de la TNSALP en individuos sanos.
- Figura 3** > 28 Esquema fisiopatología de la TNSALP en individuos afectados de HPP.
- Figura 4** > 28 Esquema fisiopatología de la TNSALP en el sistema nervioso central.
- Figura 5** > 31 Representación esquemática de la clasificación actual de los pacientes con HPP según la edad de los primeros síntomas y la herencia.
- Figura 6** > 33 Paciente con HPP neonatal grave.
- Figura 7** > 37 Piezas dentales en la en la odontohipofosfatasa.
- Figura 8** > 42 Fisiopatología de la hipofosfatasaemia y su consecuente acúmulo de sustratos.
- Figura 9** > 45 Hallazgos radiológicos en un paciente con HPP neonatal grave.
- Figura 10** > 69 Diagrama de flujo de la base de datos.
- Figura 11** > 73 Gráfico de percentiles de FA para hombres menores de 90 días.
- Figura 12** > 73 Gráfico de percentiles de FA para mujeres menores de 90 días.
- Figura 13** > 74 Gráfico de percentiles de FA para hombres menores de 1 año.
- Figura 14** > 74 Gráfico de percentiles de FA para mujeres menores de 1 año.
- Figura 15** > 75 Gráfico de percentiles de FA para hombres de 2 a 18 años.
- Figura 16** > 75 Gráfico de percentiles de FA para mujeres de 2 a 18 años.
- Figura 17** > 76 Gráfico de percentiles de FA para hombres mayores de 18 años.
- Figura 18** > 76 Gráfico de percentiles de FA para mujeres mayores de 18 años.
- Figura 19** > 77 Gráfico de percentiles de FA para hombres de todas las edades.
- Figura 20** > 77 Gráfico de percentiles de FA para mujeres de todas las edades.
- Figura 21** > 80 Árbol genealógico familiar.
- Figura 22** > 94 Algoritmo diagnóstico de pacientes con hipofosfatasaemia con o sin signos de HPP.

## ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1** > 40 Causas de hipofosfatemia.
- Tabla 2** > 43 Diagnóstico diferencial de la HPP perinatal según datos bioquímicos.
- Tabla 3** > 44 Diagnóstico diferencial de HPP según la edad de presentación y los hallazgos radiológicos.
- Tabla 4** > 47 Signos clínicos y manifestaciones en las que se debe considerar el diagnóstico de HPP
- Tabla 5** > 66 Hospitales participantes y tipo de analizador usado.
- Tabla 6** > 71 Percentiles de la FA en hombres acorde a la edad.
- Tabla 7** > 72 Percentiles de la FA en mujeres acorde a la edad.

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AD	autosómico dominante
AMP	2-amino-2-metil-1-propanol
AR	autosómico recesivo
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
FA	fosfatasa alcalina
HPP	hipofosfatasa
IFCC	Federación Internacional de Química Clínica
IR	intervalos de referencia
PEA	fosfoetanolamina
Pi	fosfato inorgánico
PINP	propéptido N-terminal del colágeno tipo I
PLP	piridoxal-5'-fosfato
PPi	pirofosfato inorgánico
PTH	hormona paratiroidea
TNSALP	fosfatasa alcalina no específica de tejido
TRE	terapia de reemplazo enzimático

## ENUMERACIÓN DE LOS ARTÍCULOS DE LA TESIS

La presente Tesis Doctoral titulada **“Cribado de hipofosfatasa en individuos con niveles de fosfatasa alcalina disminuida mediante la definición de percentiles de fosfatasa alcalina en una selección de centros sanitarios nacionales”** realizada por **Dña. Laura Castells Vilella**, bajo la dirección del Dr. Jordi Antón López y la Dra. María Luz Couce Pico, corresponde a una **Tesis en formato clásico con dos artículos anexados**.

La tesis consta de un objetivo principal y tres objetivos secundarios, y dos artículos publicados en revistas científicas de prestigio internacional e indexadas en el *Journal Citation Reports*.

## **ARTÍCULO 1**

*Autores:*

**Laura Castells**, Pía Cassanello, Felix Muñiz, María José de Castro, María Luz Couce.

*Título:*

**“Neonatal lethal hypophosphatasia. A case report and review of literature.”**

*Revista:*

Medicine (Baltimore)

*Referencia completa:*

Castells L, Cassanello P, Muñiz F, de Castro MJ, Couce ML. Neonatal lethal hypophosphatasia: A case report and review of literature. *Medicine (Baltimore)*. 2018 Nov;97(48):e13269. doi: 10.1097/MD.00000000000013269. PMID: 30508915; PMCID: PMC6283130.

Factor de impacto y cuartil según Journal Citation Report (JCR):

Journal Impact Factor 2018: 1,870. *Medicine, General & Internal* 69/160 Q2.

## ARTÍCULO 2

*Autores:*

**Laura Castells Vilella**, Paula Sánchez-Pintos, José Félix Muniz Llama, Matías Gámez Martínez, María Luz Couce, Jordi Anton.

*Título:*

**“Age- and Sex-Dynamic Fluctuations and Reference Intervals for Alkaline Phosphatase Among the Spanish Population.”**

*Revista:*

Archives of Pathology and Laboratory Medicine

*Referencia completa:*

Castells Vilella L, Sánchez-Pintos P, Muñiz Llama JF, Gámez Martínez M, Couce ML, Antón J. Age- and Sex-Dynamic Fluctuations and Reference Intervals for Alkaline Phosphatase Among the Spanish Population. Arch Pathol Lab Med. 2025 Jan 1;149(1):e19-e25. doi: 10.5858/arpa.2023-0335-OA. PMID: 38797525.

Factor de impacto y cuartil según Journal Citation Report (JCR):

Journal Impact Factor 2023: 3,7.

Medical Laboratory Technology (Q1); Medicine (miscellaneous) (Q1); Pathology and Forensic Medicine (Q1)

## RESUMEN DE LA TESIS

## **“CRIBADO DE HIPOFOSFATASIA EN INDIVIDUOS CON NIVELES DE FOSFATASA ALCALINA DISMINUIDA MEDIANTE LA DEFINICIÓN DE PERCENTILES DE FOSFATASA ALCALINA EN UNA SELECCIÓN DE CENTROS SANITARIOS NACIONALES”**

### **INTRODUCCIÓN:**

La hipofosfatasa (HPP) es una enfermedad rara hereditaria progresiva y sistémica del metabolismo calcio-fósforo, caracterizada por un déficit de actividad de la fosfatasa alcalina (FA) debida a variantes en el gen *ALPL* que la codifica. La expresión de la enfermedad es muy variada, pero con una característica común, el déficit de mineralización ósea y/o dental. Existen diferentes formas de presentación según la edad del paciente, siendo peor el pronóstico en las de inicio más precoz. El diagnóstico se basa en la demostración de unos niveles bajos de FA junto con la sospecha clínico-radiológica, y se confirma mediante la secuenciación del gen responsable.

### **HIPÓTESIS:**

La definición de unos percentiles adecuados de FA para nuestra población, de acuerdo con la edad y sexo, puede permitir reconocer individuos con cifras bajas de FA e identificar a pacientes con HPP.

### **OBJETIVOS:**

El objetivo principal es definir los percentiles de la FA, correlacionados según edad y sexo, en nuestra población española.

Los objetivos secundarios son facilitar la identificación de individuos con niveles bajos de FA con el fin de detectar pacientes con afecciones no diagnosticadas previamente como la HPP, así como revisar los casos de HPP graves descritos en la literatura.

### METODOLOGÍA UTILIZADA:

Se llevó a cabo un estudio observacional multicéntrico durante el período del 1 de enero de 2020 al 30 de junio de 2022, en 9 centros de atención terciaria en 6 Comunidades Autónomas de España. Se analizaron las mediciones de la actividad de la FA realizadas durante la atención clínica de pacientes hospitalizados y ambulatorios de todas las edades en los hospitales incluidos. Para su determinación se utilizó el método estandarizado para ello y los mismos analizadores de laboratorio. Se realizó el análisis estadístico utilizando el software estadístico R, versión 4.2.2, en el entorno de Rstudio. Se utilizó el método "Loess" para estimar las curvas que siguen los percentiles (p2.5, p5, p50, p95 y p97.5) del nivel de FA para ambos sexos, y según varios grupos de edad.

### RESULTADOS PRINCIPALES:

Se definen los valores de referencia de FA de nuestra población española, ajustados a edad y sexo.

Se han obtenido esos valores de referencia y gráficos de percentiles de la FA, ajustados por edad y sexo, y adecuados a la población española.

### CONCLUSIONES:

La actividad de la FA sigue una fluctuación dependiente de la edad y el sexo. Se han obtenido los valores de referencia y gráficos de percentiles de la FA, ajustados por edad y sexo, y adecuados a la población española. Es fundamental disponer de valores de referencia para cada población ya que existen diferencias étnicas y geográficas. Esto permite una interpretación diagnóstica correcta y precoz de las enfermedades relacionadas con las anomalías de la FA como la HPP.

### PALABRAS CLAVE:

Fosfatasa alcalina, Hipofosfatasa, Percentiles, Valores de referencia.

## **“CRIBRATGE D’HIPOFOSFATÀSIA EN INDIVIDUS AMB NIVELLS DISMINUÏTS DE FOSFATASA ALCALINA MITJANÇANT LA DEFINICIÓ DE PERCENTILS DE FOSFATASA ALCALINA EN UNA SELECCIÓ DE CENTRES SANITARIS NACIONALS”**

### INTRODUCCIÓ:

L’hipofosfatàsia (HPP) és una malaltia rara hereditària, progressiva i sistèmica del metabolisme calci-fòsfor, caracteritzada per un dèficit d’activitat de la fosfatasa alcalina (FA) degut a variants en el gen *ALPL* que la codifica. L’expressió de la malaltia és molt variable, però amb una característica comuna: el dèficit de mineralització òssia i/o dental. Hi ha diferents formes de presentació segons l’edat del pacient, amb un pitjor pronòstic en els casos d’inici més precoç. El diagnòstic es basa en la demostració de nivells baixos de FA juntament amb la sospita clínica-radiològica, i es confirma mitjançant la seqüenciació del gen responsable.

### HIPÒTESI:

La definició de percentils adequats de FA per a la nostra població, d’acord amb l’edat i el sexe, pot permetre reconèixer individus amb xifres baixes de FA i identificar pacients amb HPP.

### OBJECTIUS:

L’objectiu principal és definir els percentils de la FA, correlacionats segons edat i sexe, en la nostra població espanyola.

Els objectius secundaris són facilitar la identificació d’individus amb nivells baixos de FA amb la finalitat de detectar pacients amb afeccions no diagnosticades prèviament com l’HPP, així com revisar els casos greus d’HPP descrits a la literatura.

### METODOLOGIA UTILITZADA:

Es va dur a terme un estudi observacional multicèntric durant el període de l'1 de gener de 2020 al 30 de juny de 2022, en 9 centres d'atenció terciària de 6 Comunitats Autònomes d'Espanya. Es van analitzar les mesures de l'activitat de la FA realitzades durant l'atenció clínica de pacients hospitalitzats i ambulatoris de totes les edats als hospitals inclosos. Per a la seva determinació es va utilitzar el mètode estandarditzat corresponent i els mateixos analitzadors de laboratori. L'anàlisi estadística es va realitzar utilitzant el programari estadístic R, versió 4.2.2, en l'entorn de RStudio. Es va utilitzar el mètode "Loess" per estimar les corbes que segueixen els percentils (p2.5, p5, p50, p95 i p97.5) del nivell de FA per a ambdós sexes, i segons diversos grups d'edat.

### RESULTATS PRINCIPALS:

Es defineixen els valors de referència de FA de la nostra població espanyola, ajustats per edat i sexe.

S'han obtingut aquests valors de referència i gràfics de percentils de la FA, ajustats per edat i sexe, i adequats a la població espanyola.

### CONCLUSIONS:

L'activitat de la FA presenta una fluctuació dependent de l'edat i el sexe. S'han obtingut els valors de referència i els gràfics de percentils de la FA, ajustats per edat i sexe, i adequats a la població espanyola. És fonamental disposar de valors de referència per a cada població, ja que existeixen diferències ètniques i geogràfiques. Això permet una interpretació diagnòstica correcta i precoç de les malalties relacionades amb anomalies de la FA com l'HPP.

### PARAULES CLAU:

Fosfatasa alcalina, Hipofosfatàsia, Percentils, Valors de referència.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. MARCO HISTÓRICO

La fosfatasa alcalina (FA) fue descubierta en 1923 por Robert Robison, quien sugirió que esta enzima tenía un papel fundamental en la mineralización esquelética liberando fosfato inorgánico (Pi) para facilitar la formación de cristales de hidroxapatita(1–7). Robison demostró el peculiar pH alcalino óptimo de esta enzima. Sin embargo, reconoció que esto no era fisiológico y por tanto nunca se refería a “fosfatasa alcalina” y llamó a su descubrimiento “fosfatasa ósea”(7).

Al inicio de la década de 1930, se obtuvo un conocimiento clínico significativo al medir la FA en suero y evidenciar que la hiperfosfatemia generalmente indicaba enfermedad esquelética o enfermedad hepatobiliar (7).

En 1948, el médico canadiense John C. Rathbun acuñó el término "hipofosfatasa" (HPP) para describir la anomalía del desarrollo que llevó a la muerte a un paciente de 2 meses de edad que presentaba raquitismo y convulsiones, y tenía una actividad de FA baja en suero, así como en el hueso y en otros tejidos objetivados en la autopsia(3,8,9). Fue entonces cuando se describió por primera vez la HPP como una enfermedad caracterizada por un defecto en la mineralización ósea y dentaria, secundaria a una actividad baja de la FA. Poco después, se hizo evidente que esta enfermedad era una condición hereditaria.

Existen, no obstante, varios casos reportados de hasta 20 años previos a la fecha del descubrimiento de Rathbun que indudablemente correspondían a la misma entidad(10). En 1929, Huhne describe a un paciente con un síndrome claramente reconocible como HPP(11). En 1938, Kubatsch describió el caso de un paciente con lagunas óseas en el cráneo, cuyos padres presentaban sinostosis(12). Anspach en 1939, evidenció hipercalcemia con alteraciones óseas sugestivas de HPP en un niño(13). En ninguno de estos casos constaba el valor de FA.

Macey describió en 1940 a dos hermanos con HPP que presentaban raquitismo severo y múltiples fracturas en la edad adulta(14). En 1953, Sobel realizó grandes avances en el conocimiento de esta enfermedad(15). La pérdida prematura de los dientes permanentes emergió como una característica típica en los niños afectados que, junto

con la deficiente actividad de la FA en los tejidos como hueso, cartílago, hígado y dientes, estableció a la HPP como un error innato del metabolismo y, por lo tanto, vinculó la enzima a la mineralización esquelética, tal y como postuló en 1923 su descubridor Robert Robison(3,15).

Fue en 1955 cuando Fraser y McCance descubrieron que la excreción en orina de fosfoetanolamina (PEA) era un factor integral en esta enfermedad. Mostraron que los pacientes con HPP solían tener niveles elevados en orina, aunque también podía detectarse en niveles normales en pacientes afectados(16,17).

En 1960, la microscopía electrónica rejuveneció la hipótesis de Robison cuando se descubrieron los primeros cristales de hidroxapatita dentro de las vesículas matriciales óseas(7,18). Estas vesículas presentes en la superficie de condrocitos, osteoblastos y odontoblastos son ricas en varios fosfolípidos, colágeno y FA, entre otros. La mineralización ósea ocurre en dos etapas(19). La primera comienza con la formación de cristales de hidroxapatita dentro de las vesículas de matriz. En la segunda etapa, el cristal formado penetra la membrana de la vesícula de la matriz y se elonga dentro del espacio extracelular de la matriz. El líquido extracelular contiene calcio y fósforo inorgánico suficientes para soportar la formación continua de nuevos cristales de hidroxapatita. Ésta se propaga en acúmulos alrededor de las vesículas de matriz rellenando el espacio entre las fibrillas de colágeno presentes en la matriz. Para que la mineralización normal continúe se necesita un ajustado balance entre los niveles de Pi y de pirofosfato inorgánico (PPi) extracelular. El PPi antagoniza la habilidad del Pi para cristalizar con el calcio y formar hidroxapatita y, por lo tanto, suprimir la propagación del cristal de hidroxapatita. Se han identificado tres moléculas que son reguladores centrales de los niveles extracelulares de PPi y Pi, siendo una de ellas, la FA no específica de tejido (TNSALP, por sus siglas en inglés)(19,20).

En estudios post-mortem realizados hace años en pacientes con HPP, mostraron deficiencia de la actividad de FA en hueso, hígado y riñón, mientras que se encontró actividad normal de FA en intestino y placenta(7,21–23). Posteriormente, la información obtenida de péptidos de FA purificados de órganos sanos, indicaron la deficiencia selectiva de las isoformas de la TNSALP en la HPP(6). Por lo tanto, se estableció que la HPP es un error innato del metabolismo y se pudo predecir su base genética(3,6).

En 1988, se reportó la secuencia de nucleótidos de la TNSALP, y ese mismo año, a partir de la investigación de HPP, también se identificó la primera mutación de *TNSALP*, también conocido como *ALPL*(24). Actualmente, se han catalogado más de 400 mutaciones de la TNSALP a partir del estudio de casos de HPP(3,6,25–27). Los casos esporádicos son raros(3,6). La transmisión autosómica dominante (AD) y autosómica recesiva (AR) de entre estas mutaciones típicamente sin sentido o *missense* que ocurren en la TNSALP, explican en gran medida la HPP leve frente a la grave respectivamente, así como la extraordinaria y amplia variabilidad clínica y gravedad de la HPP(5,6,9,28).

## 1.2. HIPOFOSFATASIA

### 1.2.1. Concepto.

La HPP se define como un error innato del metabolismo, de herencia AD o AR, con un extraordinario rango de gravedad, caracterizado por unos niveles séricos bajos de FA debidos a variantes patógenas en el gen *ALPL* que codifica la TNSALP(3,5,6,25,29,30). Se trata de una enfermedad “rara” del metabolismo fosfocálcico, hereditaria, progresiva, sistémica y de gran heterogenicidad clínica, que va desde formas extremadamente graves y mortales como las de debut neonatal, diversas formas de afectación de la mineralización ósea, hasta adultos jóvenes con pérdida dental prematura sin ningún otro síntoma.

### 1.2.2. Fisiopatología.

La FA es una enzima esencial en el proceso de mineralización ósea y dental. En los seres humanos, cuatro genes son responsables de codificar la FA. Tres genes (*ALPI*, *ALPP* y *ALPPL2*) codifican las tres isoenzimas específicas de tejido (intestinal, placentaria y de células germinales específicas de tejido, respectivamente), mientras que el cuarto gen (*ALPL*) codifica la TNSALP que es abundante en el esqueleto, hígado, riñones y dientes en desarrollo, representando el 95% de la actividad sérica total de la FA (3,31,32). Aunque el nombre de este gen humano es *ALPL*, el cual denota FA del hígado (del inglés, *liver alkaline phosphatase*), se desconoce si la TNSALP tiene alguna función en el hígado. En realidad, la TNSALP es una familia de isoformas que se diferencian por modificaciones postraduccionales de las proteínas(32).

Los términos isoenzimas, formas múltiples e isoformas, se usan indistintamente en la bibliografía. De forma más rigurosa la palabra “isoenzima” se aplica a las proteínas especializadas como enzimas, que catalizan la misma reacción, tienen similar especificidad de sustrato y diferente estructura molecular, y se las reconoce como formas múltiples de una enzima. Así pues, las isoenzimas están codificadas por diferentes genes, mientras que las “isoformas” son productos del mismo gen con modificaciones después de la traducción(32).

Concretamente, la FA presenta cuatro isoenzimas según el tejido donde se exprese: no específica de tejido (TNSALP), intestinal (IALP), placentaria (PALP) y de origen neoplásico (32). Los loci para las isoenzimas TNSALP se encuentran cerca del extremo distal del brazo corto del cromosoma 1 (p36.1-p34) y para las isoenzimas IALP y PALP están ubicados cerca del extremo del brazo largo del cromosoma 2 (**Figura 1**)(32,33).

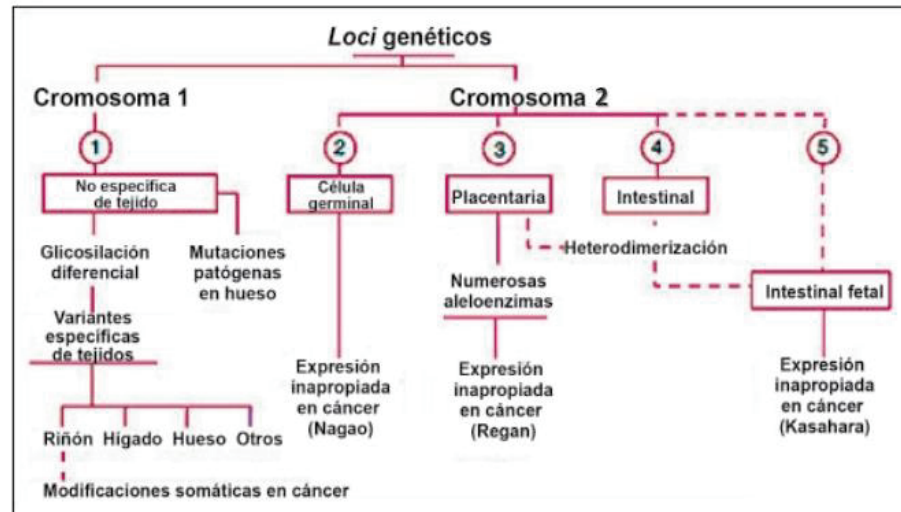
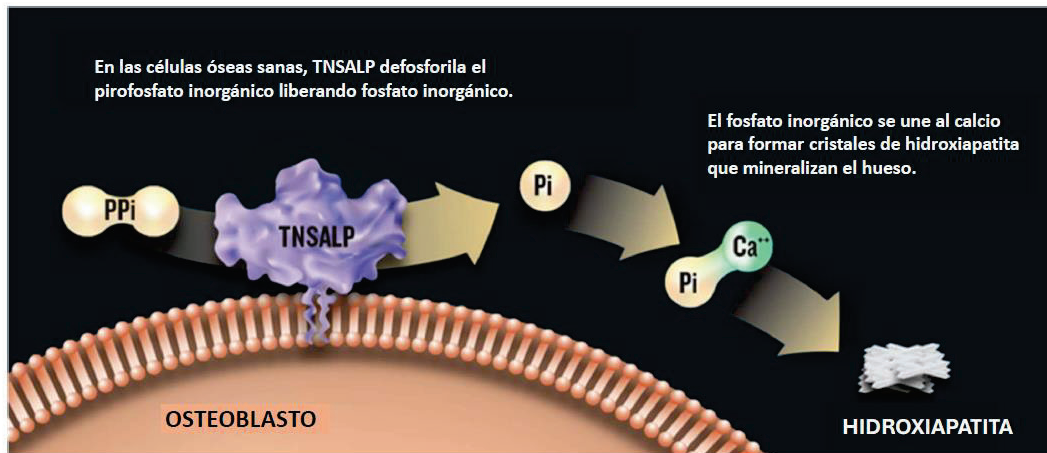


Figura 1. Identidades, asignaciones cromosómicas y principales expresiones fisiopatológicas de los genes que codifican para las FA humanas. Fuente: adaptado y modificado de referencias (32,33).

La TNSALP tiene numerosas propiedades en los tejidos mineralizados, como controlar la concentración de PPI y contribuir a la mineralización de la matriz extracelular. Las funciones de la TNSALP en los tejidos extracalcificados son poco conocidas. La TNSALP metaboliza los lipopolisacáridos y participa en la desintoxicación de estos. Y como ya se ha mencionado, se expresa esencialmente en células residentes en los dientes y los huesos, en el hígado, el riñón y el cerebro. La enzima está presente tanto anclada en la superficie externa de las células como los osteoblastos como en la circulación. Otras dos isoformas contribuyen a los niveles circulantes medidos de FA total, la placentaria y la intestinal. La FA placentaria es insignificante, y la FA intestinal representa aproximadamente el 20 % de la FA sérica adulta(25,34). En los niños, especialmente en los lactantes y adolescentes que crecen rápidamente, la isoforma ósea predomina

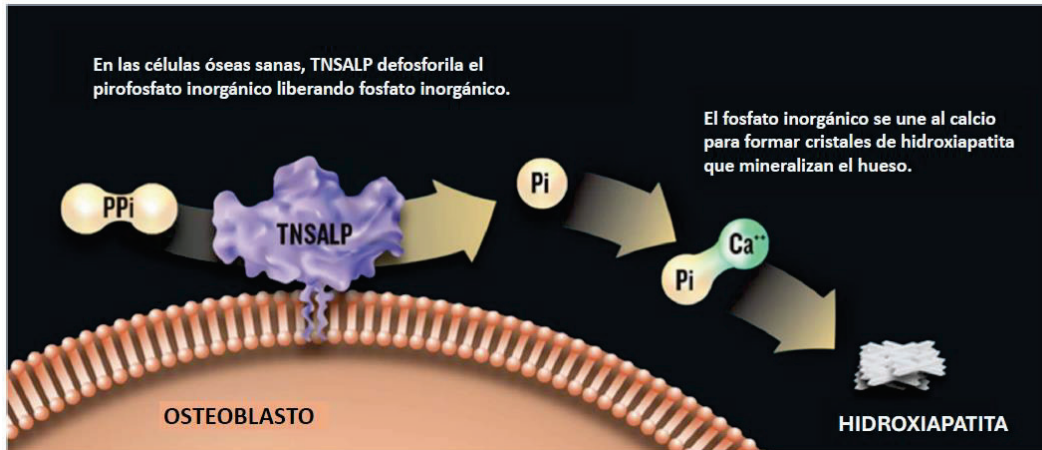
cuando se mide en el suero; en los adultos, tanto la TNSALP hepática como la ósea están presentes en cantidades aproximadamente equivalentes.

Los principales sustratos de TNSALP son el piridoxal 5'-fosfato (PLP), PPI y la PEA, considerándose los dos primeros los principales sustratos fisiológicos(25,35–40). La enzima TNSALP inicia el proceso de mineralización de la matriz extracelular mediante la degradación enzimática del PPI extracelular, un potente inhibidor de la mineralización, en Pi (**Figura 2**). TNSALP también puede desfosforilar la osteopontina, disminuyendo así su función inhibidora de la mineralización. La enzima se expresa en la superficie externa de los osteoblastos y condrocitos, así como en sus vesículas de matriz(25).



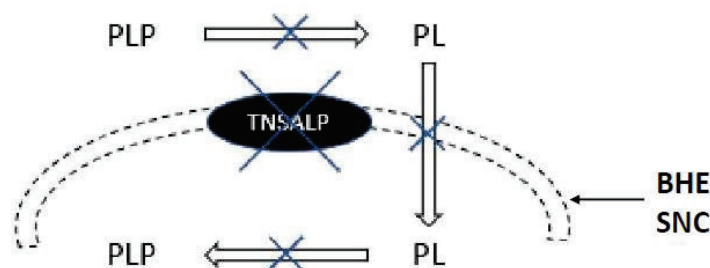
**Figura 2.** Esquema fisiopatología de la TNSALP en individuos sanos. *Fuente propia.*

En pacientes con HPP, la actividad deficiente de la enzima determina el acúmulo de dichos sustratos y el desarrollo de las manifestaciones de la enfermedad(3,37). Así pues, la acumulación extracelular de PPI inhibe la formación de cristales de hidroxiapatita, induciendo a una mineralización defectuosa con consecuentes alteraciones esqueléticas como raquitismo y osteomalacia, así como pérdidas dentales (**Figura 3**).



**Figura 3.** Esquema fisiopatología de la TNSALP en individuos afectados de HPP. *Fuente propia.*

Por otro lado, el PLP es el metabolito activo de la vitamina B<sub>6</sub> o piridoxina, cofactor esencial de neurotransmisores inhibidores cerebrales(20,41,42). La TNSALP interviene en la defosforilación del PLP a piridoxal, necesario para que pueda atravesar la barrera hematoencefálica (**Figura 4**). El PLP es un cofactor esencial de neurotransmisores inhibidores como el ácido gamma-aminobutírico(20,26,43–45) . El déficit de actividad de TNSALP conllevaría por tanto, a una deficiencia central de vitamina B<sub>6</sub> pese al acúmulo plasmático de PLP, produciendo las características convulsiones piridoxín-dependientes de las formas clínicas neonatales y del lactante(29).



**Figura 4.** Esquema de la fisiopatología de la TNSALP en el sistema nervioso central. (BHE: barrera hematoencefálica; PL: piridoxal; PLP: piridoxal 5'-fosfato; SNC: sistema nervioso central; TNSALP: fosfatasa alcalina no específica de tejido). *Figura original modificada a partir de Reis 2023(43).*

En pacientes afectados de HPP, se han encontrado niveles elevados de PEA en orina(3,5,37,40,46). Aunque su metabolismo exacto por TNSALP no se ha dilucidado por completo, su determinación en orina podría servir también como marcador de la enfermedad aunque menos confiable para el diagnóstico, ya que puede no elevarse en casos leve de HPP (25,28).

La mayor parte de la fisiopatología estudiada de la HPP se centra en los huesos y en los dientes, los principales órganos diana de la TNSALP(25). Es evidente que la enfermedad no se limita a estos tejidos, lo que dificulta su reconocimiento clínico para los médicos. Muchos otros tejidos y órganos se ven afectados, pero su fisiopatología subyacente sigue siendo desconocida(25,28).

### 1.2.3. Prevalencia.

La prevalencia de la enfermedad no se ha determinado claramente debido a la dificultad para establecer el diagnóstico en pacientes con formas leves (formas dominantes con fenotipo dental o óseo aislado, por ejemplo) o formas benignas prenatales(25). La HPP se distribuye en todo el mundo, aunque con una prevalencia muy variable.

La prevalencia estimada y comúnmente citada en la literatura en Europa es de 1 caso/300.000 nacimientos en las formas graves de HPP, y particularmente alta en Canadá con 1 caso por cada 100.000 nacimientos(6,25,28,47). En cuanto a las formas menos graves, incluidas las de los adultos, la prevalencia es difícil de estimar, debido a la variedad de presentación clínica y la frecuencia de casos no diagnosticados.

En 2011, Mornet *et al.* (26) propusieron un modelo genético mediante la experiencia del análisis de *TNSALP*, basado en la proporción de mutaciones dominantes entre los alelos “graves” y en la penetrancia estimada de la enfermedad en heterocigotos para las mutaciones dominantes, estimando la prevalencia de las formas moderadas o leves en la población europea de 1 de cada 6.370 nacimientos (3,9,25,26,28,29,47). No obstante, se han publicado estimaciones adicionales en poblaciones étnicas más prevalentes en HPP como la población menonita de Canadá donde se estima que 1 de cada 25 individuos son portadores de una variante de *TNSALP* y aproximadamente 1 de cada 2.500 recién nacidos vivos manifiesta HPP en su forma más grave y las formas

perinatales letales en Japón(3,6,29,41). En los Estados Unidos, la HPP parece ser más frecuente en personas de raza blanca que en personas de raza negra, tal vez explicado en parte por dos variantes prevalentes de *TNSALP* que causan HPP AD en los blancos(6). Puede ser que varios miles de niños estadounidenses estén afectados, pero predominantemente con enfermedad leve(6,44).

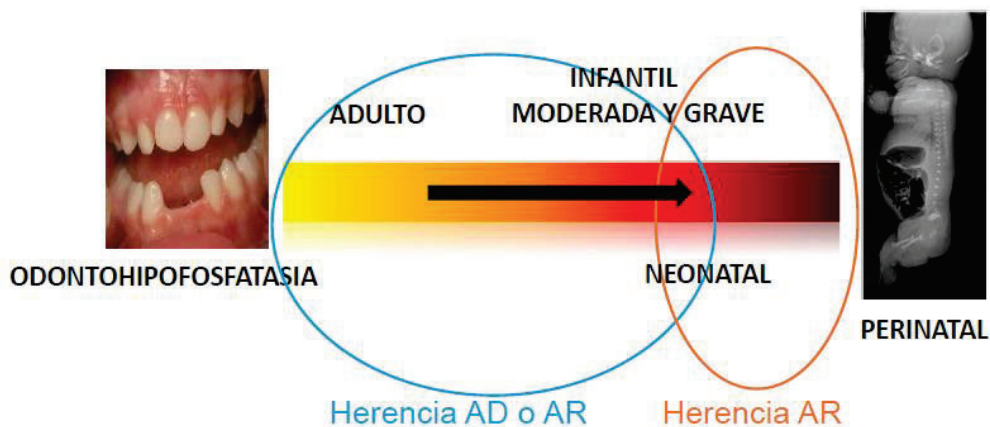
#### 1.2.4. Presentación clínica.

La HPP es una enfermedad heterogénea que puede manifestarse a cualquier edad y con amplio rango de gravedad. El diagnóstico puede realizarse en el periodo prenatal, al nacimiento, durante la infancia o la adolescencia, o en la edad adulta, por ejemplo, por una fractura atípica. Existe pues una amplia variabilidad clínica de la enfermedad, incluso entre individuos con el mismo genotipo o dentro de la misma familia, desde casos de muerte intraútero por alteración severa de la hipomineralización ósea, a casos de caída precoz de la dentición en la edad adulta exclusivamente(26,48–52). No obstante, ciertos signos, síntomas o complicaciones de la HPP pueden ser más comunes según la edad del paciente. Su pronóstico está condicionado principalmente por las alteraciones esqueléticas, que generalmente reflejan la edad del paciente en el momento de la presentación.

La nosología clínica iniciada por Fraser en 1957 se ha ampliado y refinado(3,10). Tradicionalmente se clasifica en una forma de afectación odontológica exclusivamente o odontohipofosfatasa, y en 5 subtipos de afectación sistémica dependiendo del momento del inicio de los síntomas, con severidad y pronósticos muy diferentes: cuatro formas pediátricas que son perinatal letal, perinatal “benigna”, infantil, juvenil, y una adulta(29,31,51–54). Sin embargo, estos subtipos pueden solaparse, por ejemplo, la HPP infantil y la juvenil comparten algunos síntomas clínicos, y los pacientes con HPP del adulto a menudo ya tenían algunos síntomas clínicos en la niñez. Además, esta clasificación es muy útil debido a su simplicidad, pero no refleja el continuo fenotípico de la enfermedad y a menudo reduce a los pacientes adultos a formas “leves” aunque pueden presentar complicaciones incapacitantes de su enfermedad(25). Esta clasificación omite la evolución de la enfermedad en cuanto a carga de enfermedad a lo

largo de la vida. Pacientes aparentemente no afectados durante su infancia, pueden desarrollar más tarde afecciones reumatológicas, ortopédicas y metabólicas que conducen a una discapacidad severa(25).

La **Figura 5** muestra una representación esquemática de la clasificación actual de los pacientes con HPP según la edad de los primeros síntomas y la herencia. La gravedad de la enfermedad está determinada por la edad en el que aparecen los primeros síntomas, así pues, a menor edad de inicio de los síntomas, mayor es la gravedad(26,48,55–57). Una excepción es la HPP benigna prenatal donde los primeros síntomas son concomitantes con la forma letal perinatal de HPP, pero regresan espontáneamente a una forma no letal de HPP. La odontohipofosfatasa puede ocurrir a cualquier edad(6,43,51,58).



**Figura 5.** Representación esquemática de la clasificación actual de los pacientes con HPP según la edad de los primeros síntomas y la herencia. *Figura original.*

La herencia recesiva se puede observar en pacientes con todas las formas clínicas, mientras que la herencia dominante se observa sólo en pacientes con formas menos graves (formas benignas infantiles, adultas y odontológicas)(3,28,41,55,58). El límite entre el fenotipo HPP más leve y el fenotipo normal es vago, particularmente para

adultos que son heterocigotos para una mutación ALPL recesiva y pueden expresar síntomas inespecíficos, como osteoporosis, dolor musculoesquelético y calcificaciones, que son comunes en la población general y no necesariamente atribuibles a esta heterocigosidad(26).

Recientemente se ha descrito otra entidad llamada pseudohipofosfatasa que se asemeja a la forma infantil, pero con una actividad normal o incluso ligeramente aumentada de la FA, que podría deberse a circunstancias intercurrentes(3,6,29,54,56,59).

#### 1.2.4.1. HPP perinatal grave o letal.

Las formas de inicio precoz o las de debut neonatal suelen ser de peor pronóstico y potencialmente letales, debido a las alteraciones esqueléticas graves que producen, así como las manifestaciones extrasistémicas como las convulsiones.

La forma perinatal letal es la forma más grave de la enfermedad, con herencia AR exclusivamente, y rara, afectando a 1 de cada 300.000 recién nacidos vivos en Europa, 1 de cada 182.000 en Japón, y 1 de cada 100.000 en Canadá, con la excepción de las familias menonitas de Manitoba, en quienes la prevalencia es alta (1/2.500) (3,6,30,41,43,53,60). Los signos ecográficos son observables ya intraútero, siendo la supervivencia mínima, frecuentemente con muerte fetal intrauterina o neonatal durante los primeros días o semanas(41,55). Lo más característico son las manifestaciones secundarias a la hipomineralización grave como reflejan las alteraciones esqueléticas con el típico acortamiento e incurvación de huesos largos (**Figura 6**), fragilidad ósea, ausencia de osificación de la bóveda craneal (o el llamado *caput membranaceum*), espolones osteocondrales, y deformidades torácicas similares al raquitismo con hipoplasia pulmonar secundaria. Otras manifestaciones típicas son el llanto agudo, las apneas periódicas con cianosis y bradicardia, la fiebre inexplicable, las convulsiones piridoxín-dependientes que responden a la vitamina B<sub>6</sub>, y en ocasiones hemorragia intracraneal(3,6,29,31,42,43,61). En consecuencia, se debe considerar la HPP en los recién nacidos que presentan convulsiones vitamina B<sub>6</sub>-dependientes.



**Figura 6.** Neonato con HPP perinatal grave. Deformidad severa de extremidades superiores e inferiores, con pliegues cutáneos en acordeón, secundarios a hipomineralización ósea subyacente. *Material propio autorizado.*

El hallazgo de los espolones osteocondrales, que pueden perforar la piel y protruir lateralmente en la diáfisis del cúbito o del peroné, ya sea mediante ecografía prenatal como al evidenciarlos al nacimiento, suelen ser patognomónicos de HPP(44,59).

Algunos neonatos afectados viven unos días, pero el compromiso respiratorio progresivo debido a las malformaciones torácicas y los pulmones hipoplásicos suele ser la causa de la muerte.

#### 1.2.4.2. HPP perinatal benigna

La forma neonatal menos grave o mal llamada “benigna”, de herencia AR o AD a diferencia de la forma letal, se caracteriza también por las mencionadas alteraciones esqueléticas por hipomineralización, también visibles prenatalmente, pero con una mejoría espontánea tras el parto con un pronóstico favorable, aunque se desconoce la evolución natural a largo plazo(62). Tal y como se ha mencionado previamente, el diagnóstico prenatal de HPP generalmente sugiere su forma grave, pudiendo conducir a una interrupción de la gestación, una muerte fetal intraútero o al nacimiento de un recién nacido afectado por la forma grave de la enfermedad. A diferencia de las formas graves, en fetos con HPP benigna prenatal, la ecografía fetal también muestra huesos largos más cortos y arqueados, pero no van acompañados de espolones osteocondrales o fracturas(26,63). Los neonatos afectos presentan pues acortamiento y arqueamiento

de las extremidades, y a menudo hoyuelos superpuestos a las deformidades de los huesos largos. Sin embargo, se han descrito varios casos de mejoría espontánea durante el tercer trimestre del embarazo o en los primeros meses o años de vida. El análisis cuidadoso de las ecografías prenatales, las radiografías postnatales, y los marcadores bioquímicos y moleculares son necesarios para discriminar una HPP perinatal benigna de una forma letal de la enfermedad(25,26).

#### 1.2.4.3. HPP del lactante

La forma del lactante, con debut clínico antes de los 6 meses de vida es de herencia AR. Su expresividad clínica es especialmente amplia. Los signos más característicos de la HPP del lactante son los dolores osteomusculares, con o sin fractura, deformidades esqueléticas similares a las observadas en el raquitismo, fallo de medro, debilidad muscular o hipotonía y retraso de adquisiciones motoras(31). Las alteraciones esqueléticas secundarias a la hipomineralización, pueden ser leves o graves, con tórax raquítrico, incurvación de huesos largos, fracturas óseas y alteraciones craneofaciales (3,25,31). Las suturas craneales pueden percibirse amplias, las cuales son una ilusión causada por la disminución de la osificación del cráneo, produciéndose una craneosinostosis funcional con abultamiento de la fontanela anterior y un aumento de la presión intracraneal con papiledema. Las escleróticas pueden ser azules. Estas formas clínicas pueden incluir también convulsiones dependientes de vitamina B<sub>6</sub> e hipotonía grave. La aparición de convulsiones, que a veces se manifiestan antes de los cambios esqueléticos, sugieren un resultado letal, así como el empeoramiento de la enfermedad esquelética porque eventualmente causará complicaciones respiratorias(6).

La hipercalcemia e hipercalciuria, secundarias a una reducción de la secreción de hormona paratiroidea (PTH) y al bloqueo de la entrada de minerales al esqueleto, pueden inducir vómitos recurrentes, nefrocalcinosis y compromiso renal(3,6,43). En estos casos será necesario un seguimiento ecográfico periódico.

El pronóstico de la HPP del lactante es variable en función de la gravedad de las manifestaciones clínicas, siendo peor si se presentan convulsiones. Así pues, el fenotipo

de las formas más graves de este tipo de HPP se solapa frecuentemente con la forma perinatal letal(29).

Aunque la forma del lactante suele ser menos grave que la perinatal, los cambios radiográficos también pueden ser patognomónicos(3). Puede verse una transición abrupta de diáfisis normales a metafisis mal calcificadas, sugiriendo un deterioro metabólico repentino(6), una mineralización defectuosa del esqueleto, o bien una desmineralización gradual, así como fracturas y deformidades óseas.

#### 1.2.4.4. HPP infanto-juvenil

Los niños afectados del subtipo infanto-juvenil, de herencia tanto AR como AD, debutan después de los 6 meses de vida, mayoritariamente tras el primer año de vida. Los síntomas varían mucho en esta forma de HPP infantil, sin una característica clínica única, y con una gravedad variable(43). También presentan alteraciones esqueléticas y deformidades raquílicas, fracturas recurrentes, fallo de medro, talla baja, fatigabilidad exagerada y las manifestaciones descritas de la forma del lactante. La baja estatura y la debilidad muscular contribuyen al retraso del desarrollo motor. La debilidad muscular, que se asemeja a una miopatía no progresiva, puede causar rigidez, retraso en la marcha y un andar errático o “marcha de pato”(3). El dolor esquelético también puede ser significativo.

Por lo general, las radiografías de los principales huesos largos revelan defectos focales característicos del cartílago que se proyectan desde las placas de crecimiento hacia las metafisis. Estos a menudo se describen como “lenguas” de radiolucencia (3,6,7,28,41,43,64,65). Esto puede diferenciar la HPP de otras formas de raquitismo y displasias metafisarias(3,6). En ocasiones, estas manifestaciones de este subtipo de HPP pueden mejorar o incluso remitir en la edad adulta, quizás debido a la fusión de las placas de crecimiento(6).

En esta forma clínica, son características las alteraciones dentales como el retraso en la erupción y pérdida prematura de la dentición, es decir, antes de los 5 años, sin dolor, sin reabsorción radicular debido al poco cemento que recubre la raíz (signo muy característico), con agrandamiento de las cámaras pulpares y pérdida del hueso

alveolar(3,25,29,43). Los dientes de leche se desprenden sin sangrado y, sorprendentemente, con la raíz intacta. Esta pérdida prematura de algunos dientes temporales ocurre casi invariablemente, pudiendo ser en su totalidad en las formas más graves(3). Si bien el pronóstico para la dentición permanente es mejor, problemas posteriores mal caracterizados pueden reaparecer y provocar el uso de prótesis en la vida adulta(6).

En este subtipo, los niños afectados también suelen tener niveles de PTH y vitamina D normales, por lo que raramente presentarán hipercalcemia o hipercalciuria.

A diferencia de la HPP del lactante, la forma infantojuvenil no causa convulsiones dependientes de la vitamina B<sub>6</sub>.

En todas las formas de presentación en la edad pediátrica deberá siempre considerarse el riesgo de craneosinostosis recomendándose seguimiento neurológico hasta la adolescencia.

#### 1.2.4.5. HPP del adulto

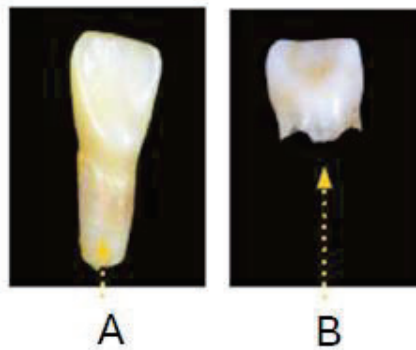
Las formas de HPP del adulto suponen un desafío ya que sus manifestaciones a menudo se atribuyen a otras patologías, o bien su expresión clínica es más leve que en el niño y pasan desapercibidas. Suele presentarse típicamente durante la mediana edad. No obstante, algunos pacientes relatan caída dental precoz o historia de raquitismo en la infancia(6). En la HPP del adulto, es característico el dolor músculoesquelético, la condrocalcinosis por depósito de pirofosfato cálcico o pseudogota, las fracturas recurrentes o las pseudofracturas por estrés del metatarsiano, fractura femoral subtrocantérea, condrocalcinosis, entesopatías o periartritis calcificadas(3,6,28).

Las pseudofracturas femorales generalmente ocurren proximal y lateralmente en la región subtrocantérea en adultos con hipofosfatasa, a diferencia de su predilección por el cuello femoral en otras osteomalacias(6,39,43,56,58). De esta manera, estas fracturas se parecen a las lesiones prodrómicas que a veces se encuentran con la terapia antirresortiva para la osteoporosis(6,66).

La HPP en adultos, debido a fracturas recurrentes, dolor óseo y articular, y la debilidad muscular, puede ser en ocasiones muy incapacitante(27,28,41,46,59,67,68).

#### 1.2.4.6. Odontohipofosfatasa o HPP dental

La odontohipofosfatasa, la forma más leve de la enfermedad y probablemente la más frecuente, corresponde a la forma clínica manifestaciones exclusivamente dentales, sin asociar alteraciones óseas ni articulares ni musculares, pudiendo presentarse a cualquier edad tras el inicio de la dentición(3,6,43,51,58). El complejo dentoalveolar, es decir, el diente y los tejidos conectivos periodontales, incluye cuatro tejidos únicos: esmalte, dentina, cemento y hueso alveolar, los cuales pueden verse todos afectados en la HPP(51). Como ya se ha comentado en la forma infantojuvenil donde es característica la pérdida de piezas dentales, ésta se produce de forma prematura, sin dolor, y con la raíz del diente intacta, ya que la deficiencia característica de cemento mineralizado altera la unión de la raíz del diente con el ligamento periodontal (**Figura 6**) y es patognomónica de HPP(51). Por lo general, primero se caen los incisivos inferiores y luego los superiores. Por lo demás, las personas con la forma exclusivamente dental tienen buena salud.



**Figura 7.** Piezas dentales en la odontohipofosfatasa. Imagen característica de pieza dental tras caída en la HPP con raíz intacta (A), y en individuo sano (B). *Figura original.*

Como ya se ha comentado, esta forma clínica puede estar presente a cualquier edad. Su herencia es tanto AR como AD y su pronóstico es mejor al ser su manifestación clínica

menos grave. No obstante, se conoce que la gravedad de la enfermedad se relaciona con el número de piezas dentales perdidas y es inversamente proporcional a la edad de la primera pérdida(29). Debe hacerse un seguimiento en los cuadros clínicos compatibles inicialmente con esta forma de presentación ya que potencialmente podrían asociarse posteriormente con otras alteraciones y no ser realmente una odontohipofosfatasa.

#### 1.2.4.7. Pseudohipofosfatasa

La pseudohipofosfatasa es similar a la HPP infantil, excepto que la actividad de la FA sérica está dentro del rango normal o aumenta por las condiciones no fisiológicas utilizadas en los laboratorios clínicos para analizar esta enzima(3,6,54,56,61). Sin embargo, la mayoría de los informes de pseudohipofosfatasa parecen representar una falta de reconocimiento de la necesidad de rangos de referencia dependientes de la edad para evaluar la actividad de la FA sérica, tal vez una corrección transitoria de la HPP como resultado de una fractura o una enfermedad intercurrente, o un énfasis excesivo en relación con elevaciones leves en los niveles de sustratos de TNSALP(3,6).

#### 1.2.5. Diagnóstico de HPP.

El diagnóstico de HPP se basa fundamentalmente en la persistencia de hipofosfatemia (activada sérica baja de la FA), sin antecedentes de una determinación normal y fuera de una situación aguda, junto con una historia clínica y/o radiología compatible, aunque podría darse en ausencia de manifestaciones esqueléticas como en las formas paucisintomáticas(6,29,58,69). La elevación de los sustratos de la FA como el PLP, suele ser el parámetro que contribuye al diagnóstico junto con los niveles bajos de FA(70).

##### 1.2.5.1. Hipofosfatemia

La hipofosfatemia constituye el sello bioquímico para el diagnóstico de HPP y debería ser el primer escalón diagnóstico ante cualquier sospecha clínica. Debe tenerse en

cuenta que en formas leves de HPP, los niveles de actividad de FA pueden observarse tan solo ligeramente reducidos o incluso en el límite inferior de la normalidad. Además, existen otras muchas condiciones clínicas o patologías que pueden cursar con una actividad baja de la FA, por lo que deben identificarse y realizar un correcto diagnóstico diferencial antes de proceder al diagnóstico de HPP (**Tabla 1**). Siempre que sea posible, debe descartarse la deficiencia de zinc o de magnesio. El hipotiroidismo y el hipoparatiroidismo también contribuyen a una disminución de la FA. Las situaciones clínicas con impacto nutricional marcado como la desnutrición, la celiaquía, la deficiencia de vitamina C y la inmovilización prolongada pueden disminuir la FA y presentar síntomas similares a los de la HPP. Del mismo modo, tratamientos prolongados de resorción ósea como los bifosfonatos, frecuentemente prescritos inadecuadamente para las fracturas relacionadas con la fragilidad ósea y atribuidas a osteoporosis primaria en pacientes con HPP, disminuyen los niveles de FA. Además, una evaluación de la función hepática, renal y hematológica también es necesaria, ya que la anemia perniciosa, la enfermedad de Wilson, la intoxicación por vitamina D, el síndrome de Cushing, entre otras condiciones, podrían cursar con hipofosfatemia (3,6,28,43,45,56,69,70). Las transfusiones de sangre o plasma y la cirugía cardíaca también pueden disminuir los valores de FA(45,71,72).

Existen otras dos situaciones que requieren una atención particular. La primera es la interpretación de los valores de la FA durante el periodo neonatal, en el que los valores de FA varían mucho durante los primeros tres meses de vida y pueden ser de difícil interpretación, y más aún en el recién nacido prematuro. La segunda situación para tener en cuenta son aquellas patologías que alteren significativamente la masa ósea del lactante donde los niveles de FA también pueden estar disminuidos, como sucede en la osteogénesis imperfecta severa, sobre todo el tipo II, en la que las manifestaciones clínicas pueden ser muy similares a las formas neonatales severas de la HPP. En estos casos, será de gran ayuda, y deberá considerarse, la determinación de los sustratos de la FA, siendo el PLP el más accesible a nivel de laboratorio.

CAUSAS DE HIPOFOSFATASEMIA	
<b>CAUSAS PRIMARIAS O HIPOFOSFATASEMIA PERSISTENTE</b>	
Hipofosfatasa Displasia Cleidocraneal Osteogénesis Imperfecta tipo II Hipofosfatemia Benigna Familiar	
<b>CAUSAS SECUNDARIAS O HIPOFOSFATASEMIA TRANSITORIA</b>	
Trastornos endocrinos Síndrome de Cushing Hipotiroidismo Hipoparatiroidismo Alteraciones hematológicas Anemia severa Anemia perniciosa Transfusión masiva reciente Mieloma múltiple Deficiencias nutricionales Malnutrición Inmovilización prolongada Déficit de Vitamina C, Zinc o Magnesio Hipervitaminosis D Síndrome Milk-alkali Causas técnicas Muestra inadecuada (oxalato, EDTA) Rangos normales inadecuados	Fármacos Bifosfonatos Clofibrato Corticoterapia Tamoxifeno Denosumab Quimioterapia Miscelánea Enfermedad celíaca Enfermedad de Wilson Hemocromatosis Osteodistrofia renal Enfermedad inflamatoria intestinal Cirugía de by-pass cardíaco Metales pesados radioactivos

Tabla 1. Causas de hipofosfatemia

#### 1.2.5.2. Acúmulo de sustratos de la TNSALP

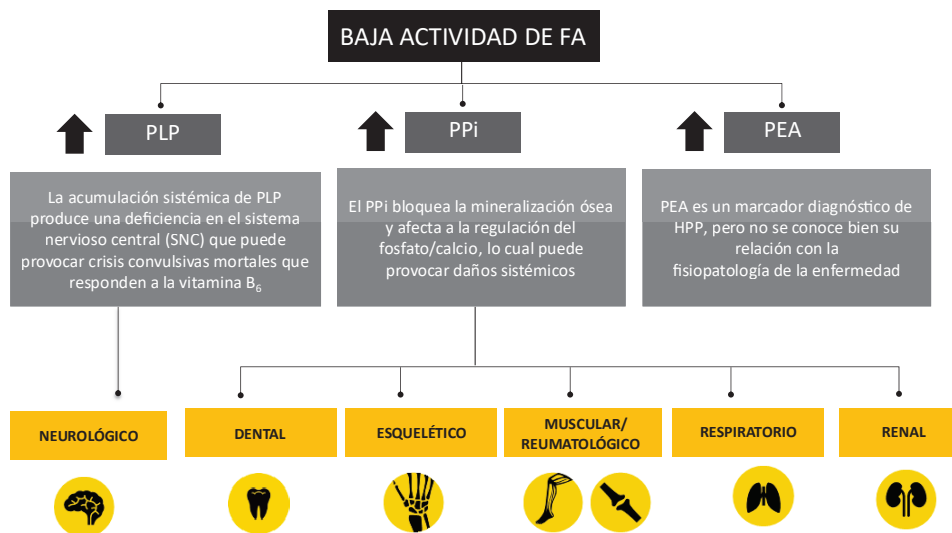
La actividad baja de la FA conlleva la acumulación de sus sustratos: el PLP, el PPi y la PEA(7,37,73,74).

El PLP, la forma circulante de la vitamina B<sub>6</sub> o piridoxina, y el sustrato extracelular fisiológico de la FA, es actualmente el parámetro que más contribuye al diagnóstico de la HPP, en asociación con la FA (**Figura 8**)(70). La desfosforilación del PLP a piridoxal mediante la acción de la TNSALP es necesaria para que la piridoxina pueda travesar la

membrana celular o la barrera hematoencefálica. Luego se fosforila a PLP en el medio intracelular, donde actúa como cofactor en numerosas reacciones enzimáticas. El PLP es un cofactor esencial de neurotransmisores inhibidores como el ácido gamma-aminobutírico. Así pues, el PLP está involucrado en varias complicaciones de la HPP, particularmente en las convulsiones neonatales que dependen de la piridoxina como ya se ha comentado en las formas graves de la enfermedad, debido a la síntesis defectuosa de neurotransmisores a nivel neuronal, pese al acúmulo plasmático de PLP. Por tanto, en niños afectados de HPP, la magnitud del aumento de los niveles plasmáticos de PLP, en ausencia de suplementación de vitamina B<sub>6</sub>, se correlaciona con la gravedad de la enfermedad, siendo éste el marcador de mayor sensibilidad diagnóstica, con un elevado valor predictivo positivo para HPP en la infancia(3). No obstante, la ausencia de niveles elevados de PLP o de otros sustratos, no permiten descartar el diagnóstico(29). Es decir, en un individuo con clínica compatible de HPP y niveles bajos de FA sérica, en ausencia de otras causas, con o sin sustratos elevados, conviene descartar otras patologías más frecuentes que puedan confundirse con la HPP(40). A su vez, valores bajos de FA y elevados de PLP también pueden observarse en la odontohipofosfatasa aunque su expresión clínica sea exclusivamente odontológica(3).

La PEA es otro sustrato potencial de la FA, no analizado de forma rutinaria, pero se utiliza principalmente para la investigación clínica y se analiza generalmente en la orina. La documentación de un nivel elevado de PEA en sangre u orina respalda el diagnóstico de HPP(3). Sin embargo, la excreción de PEA está condicionada por la edad, la dieta y el ritmo circadiano, y puede ser anodina en la HPP leve y estar elevado en otras enfermedades óseas metabólicas. Además, los problemas relacionados con la recogida de orina, la disponibilidad limitada del método y la escasez de rangos normales publicados, son los motivos por los que este sustrato contribuya poco al diagnóstico de HPP.

Lo mismo sucede con el PPI, sustrato fisiológico de la FA involucrado en la fisiopatología de la enfermedad por su efecto inhibidor en la mineralización, y actualmente solo analizado con fines de investigación(3,6,70).



FA: fosfatasa alcalina; PLP: piridoxal5'- fosfato; PPi: pirofosfato inorgánico; PEA: fosfoetanolamina

**Figura 8.** Fisiopatología de la hipofosfatemia y su consecuente acúmulo de sustratos. *Figura original.*

Además de la determinación de FA y de sus sustratos, puede ser de gran utilidad el análisis de otros parámetros de laboratorio como el calcio y el fósforo. En niños, la HPP puede manifestarse con raquitismo con niveles de calcio y fósforo elevados. Los niveles de calcio y fósforo proporcionan información diagnóstica importante, especialmente en las formas neonatales graves o en el lactante, permitiendo el diagnóstico diferencial con otras entidades como el raquitismo carencial, el raquitismo hipofosfatémico y la osteogénesis imperfecta (**Tabla 2**). La mineralización defectuosa debido a la deficiente actividad de FA osteoblástica impide la función normal de calcio y fosfato para formar los cristales de hidroxapatita. Así pues, en niños, se puede observar una tendencia hacia la hipercalcemia y la hiperfosforemia, junto con hipercalciuria y niveles suprimidos de PTH. Los valores bajos de PTH suelen estar asociados con niveles bastantes altos de 25-OH-vitamina D debido a una hidroxilación defectuosa de 1,25-OH<sub>2</sub>-vitamina D. La situación suele normalizarse después de algunos años de vida, excepto si se mantiene

una ingesta nutricional excesiva de calcio/25-OH-vitamina D. La hipercalcemia rara vez se observa en niños mayores o adultos(6).

	HPP	RAQUITISMO NUTRICIONAL	RAQUITISMO HIPOFOSFATÉMICO NUTRICIONAL	OSTEOGÉNESIS IMPERFECTA
FA	↓	↑	↑	Normal
PLP	↑	--	↓	--
Calcio	↑ o Normal	↓	Normal	Normal
Fosfato	↑ o Normal	↓	↓	Normal
PTH	↓ o Normal	↑	↑ o Normal	Normal
Vitamina D	Normal	↓	↓ o Normal	Normal

**Tabla 2.** Diagnóstico diferencial de la HPP perinatal según datos bioquímicos. (FA: fosfatasa alcalina; HPP: hipofosfatasia; PLP: piridoxal-5'-fosfato; PTH: hormona paratiroidea)

En general, descartando otras causas, valores repetidamente bajos de FA, asociados con niveles altos de PLP, posiblemente con un perfil calcio-fosfato sugestivo, nos debe sugerir un diagnóstico de HPP y resultar en la confirmación mediante pruebas genéticas(70).

El diagnóstico de la HPP supone pues un reto por su baja prevalencia, por el solapamiento fenotípico con otras patologías y por el escaso valor conferido a una FA disminuida.

### 1.2.5.3. Hallazgos radiológicos.

La radiología es uno de los pilares fundamentales para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes con HPP(68,69). Los principales hallazgos radiológicos sugerentes de HPP

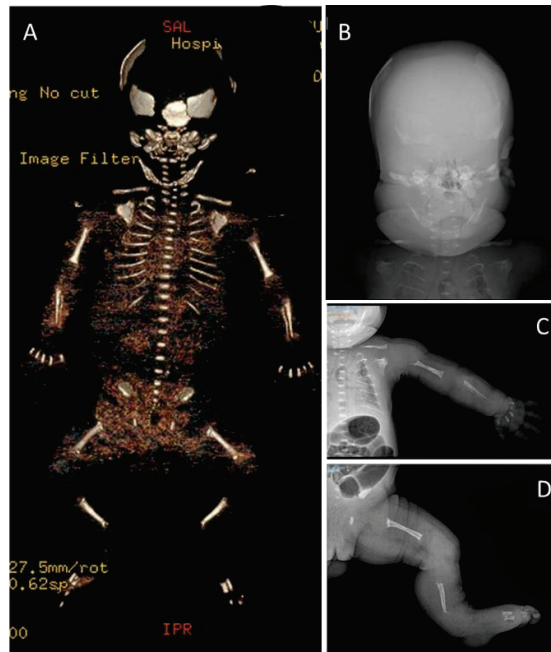
son la mineralización alterada, las “lenguas” metafisarias radiolúcidas, deformidades óseas, fracturas y pseudofracturas(3,7,28,41,43,45,65,68,69,75). Existen hallazgos radiológicos típicos por grupo de edad, y en la **Tabla 3** se muestran los diagnósticos diferenciales por subgrupo de forma clínica.

ETAPA	DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL
Perinatal	Osteogénesis imperfecta tipo II Displasia campomélica Sd. Caffey-Silverman Displasia tanatofórica Acondrogénesis Condrodisplasia con hipomineralización Displasia cleidocraneal Sd. Stüve Wiedemann
Pediátrica	Raquitismo Acondroplasia Displasia metafisaria Osteogénesis imperfecta tipo III o IV Osteoporosis idiopática Displasia cleidocraneal Sd. Cole-Carpenter Sd. Hadju-Cheney Mucopolisacaridosis tipo II Osteomielitis multifocal o crónica recurrente
Adulto	Osteoporosis Osteogénesis imperfecta Condrocalcinosis Hipofosfatemia ligada al X Osteomalacia Osteoartritis precoz Enfermedad de Forestier

**Tabla 3.** Diagnóstico diferencial de HPP según la edad de presentación y los hallazgos radiológicos. (Sd: Síndrome)

Las radiografías óseas revelan cambios patognomónicos en la HPP perinatal, infantil y grave en la niñez. No obstante, no solo deben realizarse para buscar signos típicos de HPP, sino para descartar otros trastornos.

Como ya se ha comentado en los subtipos clínicos, en niños, el esqueleto da una impresión global de desmineralización ósea (**Figura 9**). Las metáfisis están agrandadas de forma irregular, simulando raquitismo. Los defectos focales en la zona central de las metáfisis de los huesos largos, denominados "lenguas" radiolúcidas, son un hallazgo típico de la enfermedad(3,7,28,41,43,45,65,68,69,75). Estas características predominan en las metáfisis y, por lo tanto, se curan y desaparecen hacia el final de la adolescencia, excepto el defecto de mineralización. Las diáfisis pueden mostrar fracturas y/o regiones irregulares de diversas radiointensidades con zonas de osteosclerosis. El cráneo, que suele ser dolicocefálico, está submineralizado en su conjunto, luego las suturas se fusionan dando lugar una craneosinostosis con el aspecto típico del cráneo de "cobre golpeado" (del inglés *copper beaten skull*), un signo de presión intracraneal elevada(5,6,25,43,59,62,73).



**Figura 9.** Hallazgos radiológicos en un paciente con HPP neonatal grave. A. TAC postmortem que muestra hipomineralización grave generalizada. B. Ausencia de osificación de la bóveda craneal (*caput membranaceum*) excepto algunas lagunas óseas. C y D. Acortamiento e incurvación de huesos largos, con "lenguas" metafisarias patognomónicas. *Material propio autorizado.*

La hipofosfatasa en adultos se caracteriza por osteopenia, fracturas por estrés de los metatarsianos que cicatrizan mal y pseudofracturas que comúnmente afectan la región subtrocantérea lateral de los fémures(3,25,28). Las imágenes deben incluir ambas rodillas en las proyecciones anteroposterior y lateral, dado que así se visualizarán mejor las características típicas de radiolucidez en las metáfisis. A su vez, las metáfisis están ensanchadas, son irregulares y con flecos. Otras anomalías radiográficas incluyen adelgazamiento de las diáfisis, hipomineralización ósea difusa, deformidades de los huesos largos, pseudofracturas y retraso en la curación posterior a la fractura. Las pseudofracturas, un defecto localizado en el tejido óseo debido a la hipomineralización, se presentan con una apariencia radiológica similar a la de una fractura(66,67,76). La biopsia de la cresta ilíaca del hueso no desmineralizado puede mostrar una distribución alterada del calcio dentro de la matriz ósea mineralizada, exceso de osteoide, microarquitectura trabecular alterada y aumento del número de osteoblastos. Estos hallazgos pueden no estar presentes en los casos leves.

La gammagrafía ósea revelará fracturas y pseudofracturas, y puede ayudar a detectar la craneosinostosis las primeras etapas de la vida(6,25,28). La resonancia magnética es útil a identificar el síndrome de edema de médula ósea, poco frecuente y doloroso, en niños con HPP(6). La ortopantomografía es útil para delinear algunas de las características dentales(28).

#### 1.2.5.4. Signos de alerta diagnóstica de HPP

La identificación temprana de la HPP resulta esencial para establecer un manejo clínico adecuado y prevenir complicaciones a corto y largo plazo. Dada la heterogeneidad de sus manifestaciones clínicas, es fundamental considerar un conjunto de signos y síntomas que deben alertar al clínico sobre la posible presencia de esta patología. La **Tabla 4** recoge los principales signos de sospecha que, en el contexto adecuado, deben hacer sospechar la presencia de HPP y orientar hacia una evaluación diagnóstica adecuada.

Signos de alerta sugestivos de HPP
FA persistentemente baja e inexplicable
Pérdida dental temprana con raíz intacta
Dolor crónico muscular y/o óseo
Debilidad muscular y marcha anómala
Retraso motor
Fracturas metatarsianas por estrés
Fracturas femorales atípicas o pseudofracturas
Fracturas recurrentes y de mala curación
Signos radiológicos de raquitismo
Nefrocalcinosis
Calcificaciones ectópicas o pseudogota

Tabla 4. Signos clínicos y manifestaciones en las que se debe considerar el diagnóstico de HPP. Fuente original a partir de Montero-López et al. (67)

#### 1.2.5.5. Diagnóstico genético

La HPP es un error innato del metabolismo caracterizado por una baja actividad de la FA debido a mutaciones de pérdida de función en el gen *ALPL* que codifica la isoenzima inespecífica de tejido de la FA (TNSALP), tal y como demostró Weiss *et al.* en 1988(24).

La HPP se deriva de cualquier variante patógena en el gen *ALPL* ubicado en el brazo corto del cromosoma 1p36.1 que causa una disminución de la actividad de TNSALP y un aumento de los niveles de sus sustratos(3,7,26,28,31). Todos los pacientes afectados son portadores de una o dos variantes patógenas que involucran el gen *ALPL*(6). Se han identificado y reportado más de 400 mutaciones, de todo tipo, en la base de datos de mutaciones de *ALPL* en pacientes norteamericanos, japoneses y europeos, lo que indica una heterogeneidad alélica muy fuerte de la enfermedad(27). Esta variedad de mutaciones resulta en una expresión clínica altamente variable y en un gran número de genotipos heterocigotos compuestos. En las formas leves de la enfermedad, hay una pérdida funcional de una de las copias del gen, lo que lleva a una herencia AD. En las formas graves, las mutaciones afectan a ambos alelos del gen, ya sea a través de la transmisión AR o debido a una mutación AD con un efecto dominante negativo. La mayoría de las mutaciones conocidas son mutaciones puntuales de sentido erróneo (del inglés *missense mutation*), y el resto está compuesto por mutaciones de empalme (del inglés *splicing mutation*), mutaciones sin sentido (del inglés *nonsense mutation*), y una

sustitución de nucleótidos que afecta al principal sitio de inicio de la transcripción(9). Por lo tanto, el diagnóstico definitivo se logra mediante la secuenciación del gen *ALPL*.

La alta variabilidad clínica de la enfermedad está correlacionada con el patrón de herencia y depende del gran número de mutaciones de sentido erróneo y su efecto variable sobre la actividad de TNSALP(3). Las mutaciones de sentido erróneo que interfieren con la formación del dímero de TNSALP pueden disminuir la función enzimática de forma considerable y resultar en un efecto dominante negativo, lo que explicaría los casos de HPP perinatal AD. Presentaciones fenotípicas significativamente diferentes de la enfermedad pueden incluso ocurrir dentro de una misma familia(9).

El hallazgo de mutaciones patogénicas en *ALPL* permite establecer un diagnóstico definitivo de HPP, aunque algunos expertos refieren que ante una sospecha clínica firme, unos hallazgos analíticos y una radiología compatible, una constatación de una alteración genética no sería imprescindible. No obstante, esta información es fundamental para comprender los patrones de herencia y el riesgo de recurrencia en futuras gestaciones(6). Además, en la actualidad, las nuevas técnicas genéticas que utilizan la secuenciación de los genes proporcionan una rápida confirmación del diagnóstico. Por ello, en la HPP, al disponer de una terapia de reemplazo enzimático (TRE) que ha logrado aumentar la supervivencia, es de suma importancia llegar a un diagnóstico preciso(7,28,43,53,64).

#### 1.2.5.6. Diagnóstico prenatal.

Varias displasias esqueléticas se presentan prenatalmente con arqueamiento de las extremidades como la osteogénesis imperfecta (tipo II y III), la displasia tanatofórica o la campomélica, y la HPP(57,65). En la HPP, la ecografía fetal muestra además, típicamente, una hipomineralización esquelética, huesos largos cortos y/o arqueados y proyecciones en forma de espolón de los huesos largos, comentados previamente en las formas de HPP neonatal(57,65). Las radiografías realizadas a fetos nacidos muertos o neonatos gravemente afectados muestran metafisis irregulares, muy cortas y profundas en forma de copa, irregulares y bífidas(25). Las diáfisis son delgadas y algunos huesos pueden ser hipoplásicos o estar ausentes, así como la bóveda craneal, que muestra un

grave defecto de mineralización. Las clavículas suelen ser visibles y estar conservadas(25). Así pues, la HPP puede diagnosticarse prenatalmente mediante ecografía fetal centrándose en las extremidades y el cráneo. Sin embargo, aunque inicialmente se creía que las anomalías esqueléticas detectadas intraútero predecían un desenlace fatal, una investigación realizada en 2011 sobre HPP prenatal benigna mostró que incluso la herencia AR de la HPP o las anomalías esqueléticas en la ecografía del primer trimestre no predicen de manera confiable la letalidad(3,57). La delimitación de la HPP prenatal benigna ha revelado importantes incertidumbres sobre los resultados, especialmente cuando están presentes dos alelos defectuosos de TNSALP(3).

La cordocentesis para cuantificar la FA circulante fetal y el PLP está controvertida para el diagnóstico prenatal de HPP. El líquido amniótico contiene predominantemente FA intestinal fetal y, por lo tanto, no es adecuado su análisis. Algunos investigadores descartaron el uso de los valores de FA maternos dado que existe un aumento natural de los valores maternos de FA durante el tercer trimestre de gestación, tanto en casos normales como en casos de HPP fetal, debido a la secreción de FA de la isoenzima placentaria(3). Un estudio reciente muestra que los valores de FA en sangre de los padres proporcionan una herramienta de apoyo para identificar casos que pueden beneficiarse de un examen diagnóstico adicional y la preparación para la TRE poco después del parto(77). Aunque el muestreo de sangre del cordón umbilical para FA fetal y el análisis genético de los padres podrían permitir un diagnóstico prenatal preciso, ambos métodos no son fáciles de realizar como pruebas de detección de rutina en casos de extremidades fetales cortas debido a su costo e invasividad(77).

Como ya se ha comentado, los desarrollos médicos recientes, como la TRE, han aumentado la supervivencia, de ahí la importancia de poder alcanzar un diagnóstico preciso incluso en la etapa prenatal. Sin embargo, debido a las muchas variaciones y limitaciones de la radiología fetal, aún no se han establecido criterios de imagen exactos para el diagnóstico de HPP(77).

Un mejor conocimiento de los hallazgos ecográficos prenatales y la medición de la FA en ambos progenitores podría ayudar en el diagnóstico de HPP y evitar otras pruebas diagnósticas prenatales más invasivas o costosas. Además, brinda más oportunidades de asesoramiento para los padres, permite reunir y preparar un equipo de atención

multidisciplinario en el momento del parto, así como tiempo adicional para considerar y discutir las opciones de tratamiento, con el objetivo de mejorar la duración y la calidad de vida o minimizar el sufrimiento innecesario para el niño afectado y su familia(65).

#### 1.2.6. Tratamiento de la HPP.

El tratamiento de la HPP está orientado a mejorar los síntomas y reducir las complicaciones. La participación de un equipo multidisciplinario con experiencia en enfermedades óseas metabólicas y el manejo individualizado son fundamentales(25,48,78). Dependiendo de las manifestaciones del paciente y edad del paciente, las siguientes medidas pueden formar parte del tratamiento: apoyo respiratorio, piridoxina para las convulsiones, restricción dietética de calcio, medicamentos para el manejo del dolor, cirugía para la craneosinostosis, inmovilización de fracturas, fisioterapia motora y respiratoria, y cuidado e higiene dental. Los niveles de vitamina D deben mantenerse dentro de los niveles normales para prevenir el desarrollo de hiperparatiroidismo secundario y se deben evitar dosis excesivas de vitamina D, ya que empeorarían la hipercalcemia.

Además, en el caso de su forma clínica más grave, la perinatal, por su sintomatología y mal pronóstico, se recomienda su tratamiento y seguimiento en un hospital que disponga de una unidad de cuidados intensivos neonatales por la posibilidad de desarrollar insuficiencia respiratoria grave secundaria a la hipoplasia pulmonar, así como monitorización de la función cerebral por el riesgo de convulsiones.

No existe un tratamiento único ni curativo para los pacientes afectados de HPP, aunque históricamente se han empleado diferentes estrategias con resultados variables. Con el objetivo de disminuir la resorción ósea se empleó la calcitonina, aunque sin buenos resultados. Los antiinflamatorios no esteroideos han mostrado utilidad para el control del dolor óseo y el tratamiento de las calcificaciones extraarticulares. Los bifosfonatos, como ya se ha comentado, pueden ser perjudiciales en la HPP, ya que al ser análogos del PPI, contribuye a inhibir la formación de hidroxapatita, y pueden inhibir la poca actividad residual de TNSALP por su capacidad de unión a cationes de zinc y magnesio, empeorando aún más la mineralización y aumentando la incidencia de fracturas.

La TRE se realizó inicialmente mediante la administración de plasma sanguíneo de pacientes con enfermedad de Paget, con purificados de placenta humana o con trasplantes de médula ósea(3,29). Pese a los primeros éxitos de estos tratamientos en formas potencialmente mortales en 2003 y 2007, el deterioro esquelético con complicaciones respiratorias o convulsiones dependientes de vitamina B<sub>6</sub>, indicaba un desenlace fatal dentro del primer año de vida para la mayoría de pacientes con HPP infantil(3). No obstante, se han descrito algunos pacientes con HPP infantil que evolucionan bien y alcanzan una altura adulta normal. Tal vez, cualquier actividad endógena de TNSALP se vuelve más efectiva después del aumento particularmente rápido en el tamaño corporal que caracteriza a la infancia. En 2016, un estudio retrospectivo confirmó una alta mortalidad para la HPP perinatal e infantil si se manifiestan deformidades torácicas, dificultades respiratorias o convulsiones dependientes de vitamina B<sub>6</sub> antes de los 6 meses de edad. En la HPP infantil, los signos y síntomas típicamente persisten, pero a veces mejoran cuando las placas de crecimiento se fusionan. Sin embargo, eventualmente pueden surgir complicaciones por la consecuente osteomalacia(3).

Hasta el año 2015, el tratamiento clínico de la HPP se basaba principalmente en tratamiento de soporte de los síntomas de la enfermedad, pero no en el tratamiento de la causa subyacente. Fue en 2015 cuando se aprobó en Japón el uso de la asfotasa alfa (Strensiq®; Alexion Pharmaceuticals, Inc.), un análogo de la enzima TNSALP recombinante humano, como tratamiento para la HPP de inicio pediátrico. Poco después se aprobó su uso en Canadá, Europa y Estados Unidos para el tratamiento de las formas de HPP perinatal, infantil y grave de la infancia(3,29,61,79).

La asfotasa alfa es una copia modificada de la enzima FA humana, producida mediante ADN recombinante. Está compuesta por un dominio activo de TNSALP, un fragmento Fc de IgG1, que prolonga la vida media del medicamento en circulación, y un dominio de deca-aspartato para la unión de asfotasa alfa a la hidroxapatita. El primer estudio que mostró el beneficio del tratamiento con asfotasa alfa se publicó en 2012 y evaluó el tratamiento en 11 niños con HPP perinatal e infantil(64). Se evidenciaron mejoras clínicas y radiológicas después de 24 a 48 semanas de tratamiento. Asfotasa alfa mejoró la supervivencia general, la debilidad muscular, el dolor óseo, la mineralización ósea, la

función respiratoria, la altura, el peso, la movilidad, los signos radiográficos de raquitismo y la calidad de vida. Los pacientes mostraron una mejora sostenida en la mineralización y el crecimiento óseo, así como en la función respiratoria, cognitiva y motora. Además, la TRE podría también mejorar los problemas dentales en niños con HPP(80).

El uso de asfotasa alfa para tratar la forma pediátrica de HPP tiene beneficios incluso cuando el medicamento se inicia más tarde en la vida, incluso en la edad adulta, mejorando la función física y la calidad de vida. Si bien la eficacia de asfotasa alfa en el tratamiento de la HPP pediátrica está bien establecida, la evidencia de su impacto en la HPP de inicio en la edad adulta es aún limitada(67,81–83). Sin embargo, los estudios sugieren beneficios potenciales en el manejo de la HPP en todos los grupos de edad(84). Se necesitan más investigaciones para determinar la eficacia y seguridad a largo plazo en la HPP de inicio en la edad adulta, aunque ha mostrado beneficios en casos severos de la enfermedad.

#### 1.2.7. Registro Global de HPP.

Las enfermedades raras son un problema prioritario y creciente en salud pública. Son un grupo de aproximadamente 7.000 enfermedades crónicas, afectando en forma combinada a un 6-8% de la población, con elevada morbilidad y mortalidad precoz, que necesitan una mayor necesidad de apoyo a nuevas líneas de investigación y tratamiento(85,86). Además de una mala calidad de vida, los pacientes que las tienen presentan numerosas necesidades de distinta índole (sanitarias, sociales, psicológicas, económicas, educativas, etc.), la mayoría de las cuales no están cubiertas, a pesar de que están contempladas por nuestro Sistema Nacional de Salud(85).

La Unión Europea define como enfermedad rara a aquella de origen genético o adquirido, potencialmente mortal o que conlleva una invalidez crónica, y cuya prevalencia en la población general sea inferior a 5 de cada 10.000 individuos(86,87). No obstante, en general se trata de enfermedades con prevalencias aun menores, que incluso pueden ser inferiores a 1 de cada 1.000.000. Por ello, es comprensible que sea necesario su registro y análisis a través de redes que permitan aumentar el número de

casos detectados, consiguiendo así un mayor conocimiento de la enfermedad, su evolución y complicaciones(86).

En 2014 se creó el Registro Global de HPP para aumentar el conocimiento de la enfermedad y el impacto en los pacientes con HPP, y mejorar su manejo y calidad de vida. Es un registro global, multicéntrico, prospectivo y a largo plazo, que recoge datos epidemiológicos de la HPP, historia de la enfermedad, evolución clínica y carga de enfermedad de pacientes de todas las edades con un diagnóstico de HPP(30). Además, recopila datos sobre la eficacia, seguridad y tolerabilidad del tratamiento con asfotasa alfa como parte del compromiso postcomercialización para monitorizar la seguridad y el uso en el mundo real.

Los datos del registro de HPP ponen en evidencia la presencia de la enfermedad a cualquier edad y el frecuente retraso diagnóstico. Estos hallazgos ponen de manifiesto la necesidad de recopilar antecedentes médicos y familiares completos, y la importancia de reconocer las manifestaciones sistémicas de HPP para garantizar un diagnóstico precoz y oportuno. Se debería considerar la inclusión de HPP en los paneles de detección precoz de enfermedades congénitas y metabólicas en recién nacidos.

El registro mejorará aún más nuestra comprensión de la historia natural de la HPP y proporcionará datos longitudinales sobre la carga de enfermedad, incluidas las manifestaciones sistémicas, el uso de medicamentos concomitantes que controlan las manifestaciones y/o complicaciones de la enfermedad, y el impacto potencial sobre la función física y la calidad de vida. Una mejor comprensión nos permitirá explorar mejor las posibles diferencias geográficas, étnicas y genéticas en las manifestaciones de la enfermedad, y evaluar el impacto del único tratamiento aprobado, la asfotasa alfa(30).

### 1.3. FOSFATASA ALCALINA COMO PARÁMETRO DE LABORATORIO

La FA se refiere a un grupo de enzimas glicoproteicas ancladas en la superficie de la membrana celular que catalizan la hidrólisis de fosfoésteres a fosfato inorgánico. Es una isoenzima esencial para el proceso de mineralización ósea y dental, existiendo al menos 4 isoenzimas: TNSALP (95% de la actividad sérica total de la FA) y 3 isoenzimas específicas de tejido (intestinal, placentaria y de células germinales)(29). En humanos, se conocen cuatro genes que codifican la FA, tres (*ALPI*, *ALPP* y *ALPPL2*) codifican las FA del tejido intestinal, placenta y células germinales, respectivamente, mientras que el cuarto gen, *ALPL*, codifica la TNSALP (MIM 171760), expresado principalmente en hígado, hueso, riñón, músculo y en áreas sensoriales del córtex cerebral, habiéndose identificado alrededor de 400 mutaciones del mismo hasta la fecha(25,27,29,76). En 2005, se conoce la necesidad de la proximidad de la FA a las fibras de colágeno para la biomineralización, explicando así por qué otros tejidos ricos en FA como el hígado, intestino y placenta no se calcifican(3).

#### 1.3.1. Medición de la FA.

La FA sérica es un parámetro de laboratorio frecuentemente incluido en los paneles de estudio de la función hepática y las enfermedades esqueléticas. Como ya se ha comentado, niveles elevados de FA se deben habitualmente a tejidos funcionalmente alterados como en afectaciones hepáticas, o tejidos muy estimulados, como el hueso en crecimiento. Por otro lado, las concentraciones anormalmente bajas son mucho menos frecuentes y suelen estar más relaciones con deficiencias nutricionales o bien condiciones genéticas como la HPP.

La concentración catalítica de FA en suero representa la actividad de múltiples formas de la enzima(88). Mediante la técnica de enfoque isoeléctrico, se pueden detectar más de 17 isoformas de FA. La concentración de FA en el suero de adultos sanos proviene del hígado y de los huesos en proporciones similares. La FA del intestino delgado contribuye únicamente al 10% aproximadamente del total de FA en individuos sanos. Por tanto, el aumento de la FA en suero ocurrirá como consecuencia de enfermedades

del hígado y/o los huesos, a excepción de las situaciones fisiológicas como durante el crecimiento óseo y el embarazo.

La determinación de la actividad de la FA en suero depende en gran medida de los parámetros de medición elegidos. Entre estos, la elección del tampón es de gran importancia. En 1983, un grupo de expertos de la Federación Internacional de Química Clínica (IFCC) propuso un procedimiento de medición estandarizado para la FA. El principio de la reacción se basó en el uso de 2-amino-2-metil-1-propanol (AMP) y fosfato de 4-nitrofenilo. La temperatura de medición era de 30°C. Aunque este procedimiento para FA nunca fue respaldado como una recomendación oficial de la IFCC, muchos kits de prueba comerciales para FA utilizan actualmente el tampón AMP(88).

En 2011, la IFCC publicó un nuevo procedimiento de medición de referencia para la cuantificación de la fosfatasa mediante espectrofotometría(89). Los principales cambios en el procedimiento fueron el aumento de la temperatura de medición (de 30 °C a 37 °C) y el aumento de la concentración de AMP en la mezcla de reacción final (de 350 mmol/L a 750 mmol/L)(89). Este método consiste en la reacción catalizada por la FA presente en el material biológico que, a pH alcalino, a 37°C, y en presencia de Mg<sup>2+</sup>, hidroliza el para-nitrofenilfosfato, liberando p-nitrofenol y fosfato. La concentración de la enzima en la muestra se determina a partir de la velocidad de formación de p-nitrofenol medida a 405 nm. La hidrólisis a 37°C, determinada mediante la medición de la absorbancia del producto a 410/480nm, refleja la actividad de FA expresada en unidades por litro (U/L) con rango de referencia dependiente del test. Cabe señalar que el sustrato no es sustrato fisiológico de la enzima y que se determina la actividad y no la cantidad de la enzima. La muestra debe tomarse de un tubo que contenga suero o plasma y heparina de litio. Los anticoagulantes que contienen agentes quelantes de iones, como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) u oxalato, no son adecuados ya que la enzima requiere Mg<sup>2+</sup> como cofactor. La hemólisis también interfiere con el ensayo(70).

Como ya se ha mencionado, la propuesta de medición de 1983 nunca fue oficialmente respaldada por la IFCC, pero la mayoría de *kits* comerciales se basaban en él. Por otro lado, los intervalos de referencia (IR) para la FA sérica no se determinaron con ese procedimiento de medición. Por lo tanto, actualmente uno de los principales problemas

es que los IR en uso clínico siguen siendo diversos. Algunos laboratorios utilizan los IR ajustados a partir de intervalos antiguos o simplemente obtenidos de la literatura. Como consecuencia, los límites de referencia varían considerablemente de un laboratorio a otro. Además, la concentración sérica de FA difiere entre hombres y mujeres y entre diferentes grupos de edad, mientras que algunos IR no se ven influenciados ni por el género ni por la edad.

Por lo tanto, el establecimiento de mediciones confiables entre laboratorios clínicos sigue siendo un desafío(90,91). Así pues, a pesar de validarse las condiciones de muestreo y análisis bioquímico, la interpretación de la FA puede ser compleja, particularmente cuando los valores observados son bajos como sucede en la HPP.

### 1.3.2. Valores de normalidad de FA.

Los niveles de FA varían con la edad, el sexo, el estado hormonal, el ayuno y hasta según el grupo sanguíneo(92). Durante la infancia, los niveles son considerablemente más elevados que en la edad adulta, correlacionándose con el crecimiento óseo.

En el recién nacido y durante los primeros 3 meses de vida, los niveles de FA están ligeramente elevados en relación con los del adulto, aumentan 2-3 veces en la pubertad y permanecen por encima del nivel del adulto durante los siguientes uno o dos años.

Por tanto, la definición de IR, sobre todo en la edad pediátrica, y su interpretación, son una tarea difícil dado que los valores dependen de la edad y sexo, y varían a lo largo de la vida, particularmente durante la pubertad. Además, otras condiciones pueden alterar los valores de FA por lo que es imprescindible realizar un correcto diagnóstico diferencial de la hipofosfatemia como pueden ser determinados tratamientos, hipotiroidismo, desnutrición, etc...

La única forma de solventar esta complejidad es obtener IR sobre una amplia muestra de población(93). Actualmente, existen aún laboratorios que solo informan de los límites de referencias superiores debido a un enfoque en enfermedades caracterizadas por una actividad elevada de la FA. Sin embargo, este enfoque da como resultado una clasificación errónea de valores anormalmente bajos y puede ocasionar el

infradiagnóstico de enfermedades que conllevan una actividad reducida de la FA como la HPP.

A pesar de la baja prevalencia de valores bajos de la FA, existe una falta de reconocimiento de estos valores por parte del clínico junto con el desconocimiento de que valores bajos de la FA pueden conllevar patología(47,94). El enfoque más preciso para la interpretación de la actividad de la FA son los gráficos de percentiles ajustados por ejemplo a peso y talla para la edad, que permiten una consideración más precisa que una categorización relativa sólo a los límites del intervalo de referencia. Sin embargo, se necesitan grandes cantidades de muestras para crear representaciones continuas de IR y gráficos de percentiles. Como el acceso a muestras de sangre de niños sanos está restringido por objeciones éticas y prácticas, la disponibilidad de gráficos de percentiles e IR continuos para la FA desde el nacimiento hasta la edad adulta es limitada, lo que conlleva limitaciones al interpretar la actividad de la FA en la infancia(93,95).

Un estudio reciente mostró que los valores repetidamente bajos de FA, en ausencia de una causa evidente, y aun en ausencia de síntomas clínicos, deberían dar lugar a exámenes clínicos, radiológicos y genéticos adicionales para investigar una posible HPP(40). La anamnesis y las muestras de familiares, excepto para la confirmación genética de una anomalía, son importantes fuentes de información(70,77). Aunque se ha observado una correlación entre valores bajos de FA y severidad de la enfermedad, se pueden observar valores bajos de FA en portadores sanos. Es decir, que la anomalía genética puede estar presente, pero ser clínicamente relevante solo en algunos miembros de la misma familia.

La clasificación continua de los resultados de las pruebas con gráficos de percentiles desde el nacimiento hasta la edad adulta puede mejorar la utilidad de la actividad de la FA como marcador de detección de HPP y afecciones relacionadas(70,95).

Por lo tanto, para tomar una decisión clínica con respecto al establecimiento de un diagnóstico y la implementación del tratamiento, a menudo se realizan pruebas adicionales tras la historia y el examen físico de un determinado paciente. Los laboratorios clínicos suelen utilizar los IR proporcionados por los kits de laboratorio de

los fabricantes para la interpretación de las pruebas de laboratorio. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que existen varios factores que pueden cambiar los resultados de la prueba. Por lo tanto, es posible que los IR no sean los mismos al considerar diferentes poblaciones. De ahí la importancia de disponer de IR ajustados a cada población.

### 1.3.3. Intervalos de referencia

Un IR se define como el intervalo entre 2 valores dentro del cual caerían el 95% de los resultados de sujetos sanos, es decir, entre los percentiles 2,5 y 97,5 de los resultados de la prueba. Además, la división de los IR en grupos de edad y para cada sexo se utiliza para representar las diferencias por edad y sexo de los parámetros de laboratorio. Este ajuste es de suma importancia en pediatría, ya que los cambios fisiológicos tras del nacimiento y durante la adolescencia resultan en cambios en muchos valores de laboratorio. Sin embargo, la división por grupos de edad puede conllevar inexactitud, especialmente si se utilizan grupos de edad inapropiadamente amplios(96).

El establecimiento de un IR es un proceso complejo y que requiere mucho tiempo, especialmente para los niños. El proceso de establecimiento de IR se clasifica en cinco pasos: definición de una población de referencia, selección de los individuos de referencia, recolección de muestras de referencia, pruebas de laboratorio de las muestras de referencia según procedimientos operativos rutinarios y estandarizados, y aplicación de métodos estadísticos a los resultados de laboratorio generados en el paso(91).

Para los niños, la determinación de los IR es difícil porque requiere el reclutamiento de un número adecuado de niños sanos, la recolección de volúmenes de sangre relativamente grandes en proporción a la reserva sanguínea del paciente y una comprensión de los cambios fisiológicos en los biomarcadores asociados con el crecimiento y desarrollo normales.

Aunque los estudios actuales, incluida la Iniciativa del Laboratorio Canadiense sobre Intervalos de Referencia Pediátricos (CALIPER) y otros estudios realizados en población pediátrica en Alemania y otro en Brasil, han servido para reducir las brechas, todavía

sigue siendo necesario disponer de IR pediátricos basados en la población en diferentes grupos étnicos que se midan mediante métodos analíticos modernos(95,97,98).

Por lo tanto, la disponibilidad de IR finamente graduados y ajustados por edad y sexo mejora la utilidad diagnóstica de la FA como método de detección para la FA y otras enfermedades.

## 2. HIPÓTESIS

## HIPÓTESIS

La hipótesis de nuestro trabajo es que la definición de unos percentiles pormenorizados y detallados de fosfatasa alcalina para nuestra población española, de acuerdo con la edad y sexo, puede permitir reconocer a individuos con cifras bajas de fosfatasa alcalina e identificar a pacientes con hipofosfatasa.

### 3. OBJETIVOS

## OBJETIVOS

### 1. OBJETIVO PRINCIPAL

Establecer los intervalos de referencia y los gráficos de percentiles de la fosfatasa alcalina, correlacionados según edad y sexo, para la población española.

### 2. OBJETIVOS SECUNDARIOS

- Identificar individuos con niveles anormalmente bajos de fosfatasa alcalina y así poder realizar un diagnóstico diferencial de hipofosfatemia y detectar a pacientes con trastornos no diagnosticados previamente.

- Identificar pacientes con niveles bajos de fosfatasa alcalina y clínica sugestiva de hipofosfatemia, para proporcionarles un tratamiento adecuado a sus síntomas y evitar así tratamientos potencialmente dañinos que pudieran estar recibiendo.

- Crear un algoritmo diagnóstico para facilitar la identificación de pacientes con hipofosfatemia mediante datos bioquímicos y clínicos.

## 4. MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS

## 4.1. MATERIAL Y MÉTODOS

La descripción de la población estudiada, los criterios de inclusión y exclusión, la metodología empleada y los resultados obtenidos en el estudio se detallan a continuación, incluyendo la utilizada en los artículos publicados.

### 4.1.1. Participantes del estudio

Durante el período comprendido entre el 1 de enero de 2020 y el 30 de junio de 2022, se llevó a cabo un estudio observacional multicéntrico, en 9 centros de atención terciaria de 6 regiones de España (**Tabla 5**). Estos 9 hospitales españoles pertenecen al mismo grupo hospitalario privado y comparten la misma empresa de laboratorio. De este modo, nuestros resultados están bien alineados y son comparables.

Se analizaron las determinaciones de actividad de la FA realizadas durante la atención clínica de pacientes hospitalizados y ambulatorios de todas las edades en los hospitales incluidos. Las mediciones sanguíneas de FA se recuperaron de las bases de datos de los laboratorios participantes. La edad de los participantes abarcaba desde recién nacidos hasta los 99 años, diferenciados por sexo y por su patología.

Los criterios de exclusión incluyeron a aquellos participantes con enfermedades hepáticas, renales u óseas conocidas, o con resultados anormales en otras pruebas de evaluación del metabolismo hepático, renal u óseo, con el fin de asegurar que los datos utilizados como valores de referencia provinieran de una población sana, ya que estas condiciones pueden interferir en la medición de la FA.

Los intervalos de edad utilizados para calcular los valores de referencia y percentiles (2,5; 5; 50; 75 y 97,5), diferenciados por sexo, fueron los siguientes:

- Hasta los 3 meses de edad: [0, 15), (15, 30), (30, 45), (45, 60), (60, 75) y (75, 90) días
- De 3 meses a 1 año: [0, 3), (3, 6), (6, 9) y (9, 12) meses
- De 1 a 18 años: (1, 2), (2, 3), ..., hasta (17, 18) años
- Mayores de 18 años: (18, 20), (20, 30), (30, 40), ..., hasta (90, 100)

La investigación cumplió con toda la normativa nacional vigente y con los principios de la Declaración de Helsinki. El presente estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación Clínica de “Ibérica de Diagnóstico y Cirugía” Salud, en Cataluña, España (código núm. 2019/32-UPN-HUGC).

#### 4.1.2. Procedimientos analíticos.

La actividad de la FA (U/L) se determinó mediante el método enzimático colorimétrico en la plataforma Roche/Hitachi Cobas, utilizando amino-metil-propanol (AMP) como tampón, así como magnesio y zinc como cationes. Se emplearon los siguientes analizadores bioquímicos automáticos, todos ellos de Roche Diagnostics: Roche COBAS 6000 en 6 de los laboratorios participantes; Roche COBAS 8000 en 2 laboratorios; y Roche Integra 400 en el laboratorio restante, como muestra la **Tabla 5**. La misma plataforma y analizador Roche se utilizaron para el establecimiento de intervalos de referencia pediátricos en el estudio de referencia CALIPER(97). El método utilizado en este estudio está estandarizado según el procedimiento de la Federación Internacional de Química Clínica y Medicina de Laboratorio (IFCC) de 2011(88).

Nombre del Hospital	Tipo de Analizador Roche
Hospital Quirónsalud Albacete	COBAS 6000
Hospital Quirónsalud A Coruña	COBAS INTEGRA 400
Policlínica Gipuzkoa	COBAS 6000
Hospital Universitari General de Catalunya	COBAS 8000
Hospital Universitari Sagrat Cor	COBAS 6000
Hospital Quirónsalud Málaga	COBAS 6000
Hospital Quirónsalud Valencia	COBAS 6000
Hospital Quirónsalud Sevilla	COBAS 6000
Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz	COBAS 8000

**Tabla 5.** Hospitales participantes y tipo de analizador usado.

Para garantizar que los datos fueran comparables entre los distintos laboratorios, se eligió utilizar el período de estudio durante el cual se utilizó principalmente el mismo ensayo *in vitro* para la determinación cuantitativa de fosfatasa alcalina en suero y plasma humano (ALP2L: ACN 8683) en los analizadores de sistemas Roche COBAS. Además, los controles de calidad y la frecuencia de las calibraciones fueron los mismos para todos los laboratorios, ya que pertenecen a la misma empresa de laboratorio. De esta manera, los resultados obtenidos fueron más precisos y consistentes, y permitieron una interpretación óptima de los mismos para garantizar la exactitud de los resultados reportados y su comparabilidad<sup>4</sup>.

El rango de medición fue de 5 a 1200 U/L. El coeficiente de variación porcentual intraensayo (intra %CV) fue del 0,7% en concentraciones entre 83,7 y 84,9 U/L, del 0,5% en concentraciones entre 221 y 223 U/L, y del 0,3% en concentraciones entre 963 y 969 U/L. El coeficiente de variación porcentual interensayo (inter %CV) fue del 2,4% en concentraciones de  $92,8 \pm 2,2$  U/L, del 1,7% en concentraciones de  $224 \pm 4$  U/L, y del 0,9% en concentraciones de  $1.025 \pm 9$  U/L.

#### 4.1.3. Análisis estadístico y cálculo de percentiles.

El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el software estadístico R, versión 4.2.2,28 en el entorno Rstudio. Se utilizó el método "Loess" para estimar las curvas que siguen los percentiles (p2.5, p5, p50, p95 y p97.5) del valor de la FA para ambos sexos, según los grupos de edad establecidos. El método "Loess"<sup>30</sup> es un método robusto y no paramétrico de mínimos cuadrados locales que no requiere normalidad de los datos, produciendo un ajuste suave de las curvas de percentiles.

## 4.2. RESULTADOS

A continuación se describen los resultados obtenidos de nuestro estudio y que fueron publicados en el artículo adjunto en el **Anexo 2**.

Evaluamos la actividad de la FA en muestras de sangre tomadas de 847.862 pacientes ambulatorios y hospitalizados, con edades comprendidas entre 0 y 99 años, procedentes de 9 hospitales terciarios en España. Además, establecimos las curvas de percentiles continuas de la actividad de la FA, divididas por grupos de edad y diferenciadas por sexo.

Con estas 847,862 muestras, y tras diseñar la base de datos, se descartaron algunas determinaciones cuando se observaron errores en la fecha de nacimiento o en la fecha de extracción que resultaban en edades incongruentes, lo que representó el 0,2% del total de las muestras. Para los pacientes que tenían varias mediciones de la FA, se calculó y se utilizó la mediana, ya que es el valor más representativo de un conjunto de datos. Así mismo, se excluyeron las muestras de pacientes con criterios de enfermedad hepática, renal o metabólica.

De manera similar, en un primer análisis para establecer los percentiles (2.5, 5, 50, 75 y 97.5), los datos que excedían el percentil 97.5 y eran valores de FA de varios miles de unidades fueron considerados claramente erróneos y como valores atípicos (*outliers*). Para minimizar este efecto, estos valores atípicos, que representaban el 2,5% más alto de los datos, fueron eliminados de cada grupo de edad y sexo.

Finalmente, tras esta depuración de datos, tal y como muestra la **Figura 10**, se incluyeron 644.675 muestras en este estudio, de las cuales 23.672 (3,7%) correspondían a muestras pediátricas ( $\leq 18$  años), con un ligero predominio de mujeres (337.810 muestras; 52,4%). No se realizó diferenciación por etnia debido a que la población del estudio era mayoritariamente caucásica.

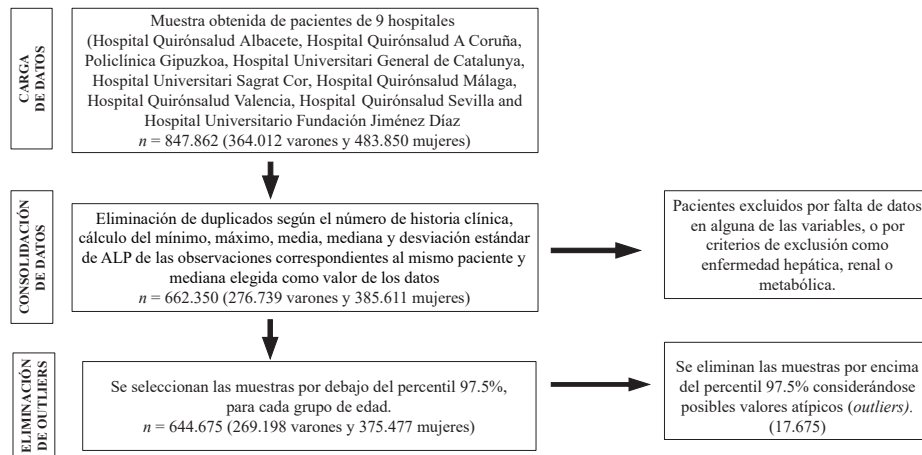


Figura 10. Diagrama de flujo que muestra la depuración de la base de datos.

#### 4.2.1. Distribución de percentiles.

Con los resultados obtenidos, creamos tablas de percentiles para la actividad de la FA en los participantes según el sexo y la edad que pueden utilizarse como intervalos de referencia (**Tablas 6 y 7**), así como los gráficos de percentiles de la FA para varones y mujeres por las franjas de edad definidas previamente, mostrando los percentiles de 2.5, 5, 50, 95 y 97.5, con intervalos de confianza del 95% (**Figuras 11-20**).

Como muestran las **Figuras 19 y 20**, los niveles más altos en ambos sexos durante la primera infancia se alcanzan durante el primer año, con un ligero aumento después de las primeras 2 semanas de vida (**Figuras 11 y 12**). En la pubertad, se observa una evolución diferencial en ambos sexos, con un marcado aumento en la actividad de la FA en los niños, alcanzando un pico entre los 10 y 13 años y con un valor ligeramente inferior entre los 13 y 15 años; en cambio, en las niñas la FA permanece estable entre los 10 y 13 años y disminuye a menos de la mitad de los niveles anteriores en los siguientes 2 años (**Figuras 15 y 16**).

Posteriormente, en los hombres, se observa una disminución gradual hasta el inicio de la treintena, y luego la FA permanece prácticamente inalterada hasta los 80 años (**Figura**

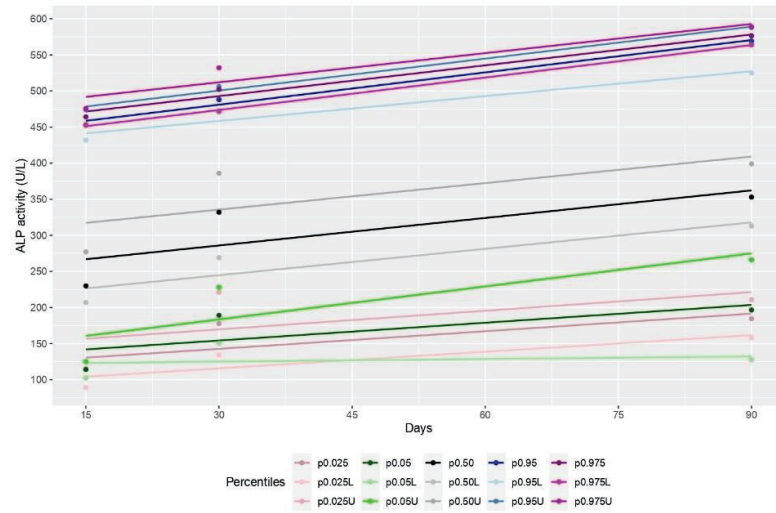
**17).** En las mujeres, después de una disminución progresiva hasta los 30 años de edad, los niveles permanecen estables durante 2 décadas, y posteriormente se observa un aumento hasta 75 U/L que se mantiene de los 50 a los 90 años, con un mínimo aumento posterior (**Figura 18**).

Se han encontrado diferencias significativas entre hombres y mujeres, siendo la mediana más alta en hombres entre los 20 y 49 años de edad y entre los 50 y 79 años de edad en mujeres, tal y como se muestra en las **Figuras 17 y 18**. Estas diferencias también fueron reportadas previamente en la literatura(89,99).

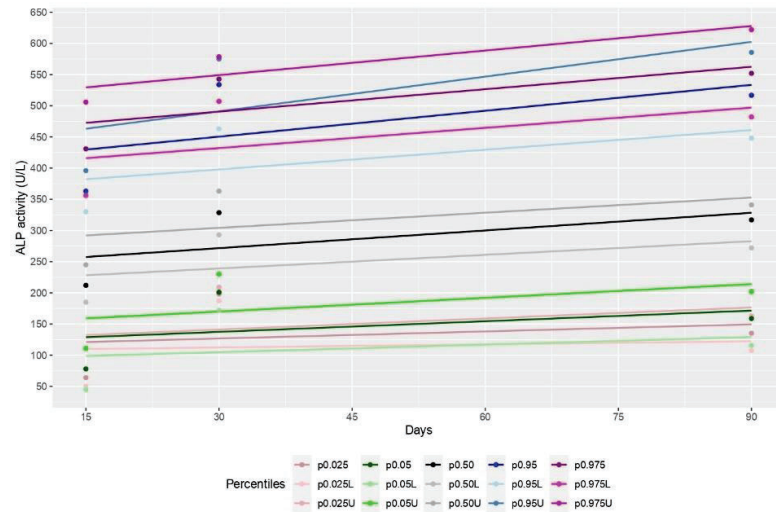
Tablas 6 y 7. Percentiles de la FA en hombres y en mujeres acorde a la edad. (n: número; FA: fosfatasa alcalina; p: percentil; U: superior; L: inferior)

Edad	Hombres																
	n	p2.5	p2.5L	p2.5U	p5	p5L	p5U	p50	p50U	p95	p95L	p95U	p97.5	p97.5L	p97.5U	Asimetría	Curtosis
≤ 15 días	114	102.4	89.2	115.7	114.0	103.1	125.0	230.0	207.0	277.0	453.0	473.9	464.1	452.5	475.8	0.5977	-0.1432
>15. ≤ 30 días	38	177.7	134.4	221.0	189.0	150.1	228.0	332.0	269.0	386.0	488.1	470.0	502.1	472.0	532.2	0.1206	-1.1321
> 30. ≤ 90 días	61	184.5	158.0	211.0	196.6	127.2	266.0	353.0	313.0	399.0	569.1	525.0	576.4	564.0	588.8	0.1871	-0.8087
> 3. ≤ 6 meses	73	161.0	144.0	178.0	176.4	144.0	209.0	290.0	268.0	309.0	449.0	404.0	465.0	445.0	485.0	0.3649	-0.6941
> 6. ≤ 9 meses	87	129.1	112.3	146.0	139.7	65.0	153.0	241.0	219.0	256.0	377.4	365.0	393.2	376.0	410.4	0.9933	2.6287
> 9. ≤ 12 meses	125	118.8	94.0	143.0	132.8	94.0	146.0	241.0	218.0	254.0	379.8	363.0	427.1	373.0	481.1	0.4357	-0.1791
> 1. ≤ 2 años	486	127.2	118.0	136.0	138.5	131.0	144.0	222.5	218.0	230.0	353.0	336.0	382.0	361.0	400.0	0.6347	0.3348
> 2. ≤ 3 años	401	130.0	101.0	137.0	141.0	133.0	149.0	220.0	213.0	228.0	309.0	298.0	327.0	317.0	355.0	0.1975	-0.2946
> 3. ≤ 4 años	446	124.1	110.0	136.0	139.2	132.0	147.0	218.0	213.0	224.0	329.0	312.0	342.9	333.0	363.0	0.3607	-0.1301
> 4. ≤ 5 años	412	135.2	127.0	141.0	143.2	135.0	151.0	229.0	221.0	235.0	322.5	314.8	337.5	325.0	349.0	0.1801	-0.6077
> 5. ≤ 6 años	424	128.1	117.0	138.0	144.0	129.0	152.3	236.0	229.0	241.0	334.0	329.0	346.9	337.0	363.0	0.0658	-0.5495
> 6. ≤ 6 años	439	141.9	130.0	150.0	153.7	142.0	163.5	240.0	235.0	246.0	340.0	332.0	345.2	340.0	355.0	0.0652	-0.4539
> 7. ≤ 8 años	455	138.3	102.0	143.0	155.7	140.0	162.0	239.0	231.0	245.0	344.6	331.0	373.7	360.0	392.0	0.1894	-0.0035
> 8. ≤ 9 años	453	135.9	123.0	147.0	153.0	143.0	161.0	239.0	232.0	245.0	348.2	338.0	371.5	361.0	405.0	0.3307	0.0318
> 9. ≤ 10 años	505	141.6	130.0	147.0	156.4	145.0	168.0	253.0	242.0	259.0	379.6	358.0	415.7	391.0	436.0	0.5257	0.2642
> 10. ≤ 11 años	507	124.7	108.0	144.0	154.6	128.0	162.0	260.0	252.0	270.0	385.4	374.0	407.7	391.0	423.0	0.0749	-0.1262
> 11. ≤ 12 años	567	149.1	137.5	159.5	174.6	156.0	181.0	274.7	266.0	281.5	445.0	422.0	474.4	461.0	500.0	0.5892	0.0366
> 12. ≤ 13 años	609	131.6	121.0	150.5	156.0	141.0	161.0	282.0	274.0	289.5	449.4	439.0	486.6	462.0	495.0	0.2820	-0.4675
> 13. ≤ 14 años	840	103.9	98.0	111.0	116.9	109.0	125.5	226.0	221.0	234.0	382.5	374.0	410.1	393.0	435.0	0.4733	-0.2680
> 14. ≤ 15 años	957	82.0	78.0	87.0	90.0	87.0	94.0	162.0	157.0	167.0	316.0	308.0	353.2	343.0	367.0	0.8151	0.0550
> 15. ≤ 16 años	1116	65.0	63.0	68.0	72.0	70.0	74.0	119.8	116.0	122.0	235.1	221.0	263.3	251.0	281.0	1.2130	1.4633
> 16. ≤ 17 años	1087	59.0	53.0	60.0	63.3	60.0	65.0	98.0	96.0	100.0	176.7	171.0	186.0	188.0	205.0	1.0559	1.0443
> 17. ≤ 18 años	1072	51.7	49.0	54.5	57.5	55.0	59.0	88.0	86.0	90.0	138.7	135.0	150.2	146.0	159.0	0.6735	0.2293
> 18. ≤ 20 años	2327	46.0	44.0	48.0	50.0	49.0	51.0	79.0	78.0	80.5	120.0	118.0	130.9	127.0	132.0	0.4956	0.0831
> 20. ≤ 30 años	18020	42.0	41.0	42.0	45.0	45.0	46.0	69.0	68.0	69.0	102.0	102.0	108.0	108.0	109.0	0.4290	-0.0955
> 30. ≤ 40 años	31470	41.0	40.0	41.0	44.0	44.0	45.0	68.0	67.0	68.0	103.0	102.3	110.0	110.0	111.0	0.5213	0.0281
> 40. ≤ 50 años	41787	41.0	40.0	41.0	44.0	44.0	45.0	69.0	68.0	69.0	108.0	107.0	116.0	116.0	117.0	0.6409	0.2831
> 50. ≤ 60 años	50124	40.5	40.0	41.0	44.0	44.0	45.0	69.5	69.0	70.0	112.0	111.0	123.0	122.0	123.0	0.7879	0.6815
> 60. ≤ 70 años	49370	39.6	39.0	40.0	43.0	43.0	44.0	69.0	69.0	69.0	113.0	112.6	124.0	123.0	125.0	0.8269	0.8223
> 70. ≤ 80 años	39480	39.4	39.0	40.0	44.0	44.0	44.0	71.0	71.0	71.0	120.7	120.0	134.0	133.0	135.0	0.9957	1.4036
> 80. ≤ 90 años	21364	42.0	41.0	42.0	46.0	46.5	46.5	75.7	75.0	76.0	135.0	133.0	154.3	152.0	156.5	1.2753	2.3761
> 90. ≤ 100 años	3982	43.0	42.0	45.0	48.0	47.0	49.0	80.0	79.0	81.0	159.2	154.0	188.0	183.0	198.0	1.7188	3.9368

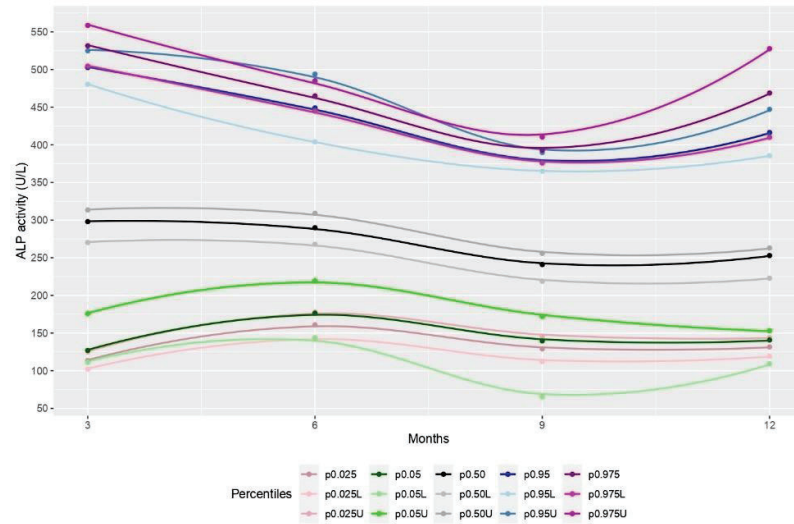
Edad	Mujeres																	
	n	p2.5	p2.5L	p2.5U	p5	p5L	p5U	p50	p50L	p50U	p95	p95L	p95U	p97.5	p97.5L	p97.5U	Asimetría	Curtosis
≤ 15 días	50	64.1	50.1	78.0	78.0	45.0	111.0	212.0	185.0	245.0	363.0	330.0	395.9	430.9	356.0	505.9	0,3735	-0,0941
>15. ≤ 30 días	45	198.1	187.2	209.0	201.0	172.0	230.0	328.5	293.0	363.0	533.8	493.0	574.6	542.8	507.0	578.5	0,5407	-0,3020
> 30. ≤ 90 días	47	135.2	107.4	163.0	158.8	115.6	202.0	317.0	272.0	341.0	516.8	448.0	585.6	552.0	482.0	622.0	0,2660	-0,4658
> 3. ≤ 6 meses	73	146.2	134.4	158.0	157.2	95.0	178.0	275.0	249.0	285.0	375.6	357.0	415.0	383.0	372.0	394.0	-0,1263	-0,6093
> 6. ≤ 9 meses	74	131.6	119.2	144.0	140.4	109.5	169.0	251.0	223.0	263.0	399.8	373.0	426.6	434.0	393.0	475.0	0,7440	0,1519
> 9. ≤ 12 meses	129	133.8	116.6	151.0	140.7	130.0	163.0	226.0	214.0	235.0	405.8	354.0	438.0	427.9	401.0	454.7	0,9613	0,7075
> 1. ≤ 2 años	350	123.6	100.0	134.0	136.0	125.0	144.0	223.0	214.0	231.0	353.0	342.0	377.0	378.1	355.0	412.0	0,5798	0,3528
> 2. ≤ 3 años	315	129.1	110.5	139.0	139.0	132.0	150.0	228.0	217.0	233.3	333.3	315.0	352.0	356.5	333.0	400.0	0,3960	-0,0606
> 3. ≤ 4 años	341	131.0	112.0	145.0	147.0	130.0	154.0	224.0	218.0	235.0	327.0	315.0	366.0	361.0	329.0	380.0	0,3248	0,0900
> 4. ≤ 5 años	377	129.0	117.0	142.0	143.0	134.0	150.0	230.0	222.0	242.0	337.6	328.0	360.0	364.2	341.0	391.0	0,1653	-0,0908
> 5. ≤ 6 años	399	131.9	113.0	145.0	148.0	132.0	159.5	239.0	232.0	245.0	338.3	329.0	353.0	355.2	346.0	376.0	0,0972	-0,3269
> 6. ≤ 6 años	463	136.6	116.0	144.0	153.0	137.0	155.0	247.0	238.0	252.0	373.9	352.0	395.0	396.4	382.0	423.0	0,3644	0,0086
> 7. ≤ 8 años	504	147.0	129.0	154.0	159.0	152.0	165.0	249.5	241.0	256.0	372.9	362.0	382.5	387.9	379.0	392.0	0,2084	-0,5402
> 8. ≤ 9 años	503	134.0	119.0	141.0	145.3	136.0	158.5	253.0	246.0	263.0	383.9	374.0	414.0	443.0	401.0	475.0	0,5187	0,6657
> 9. ≤ 10 años	525	149.2	126.0	157.0	161.8	153.0	174.0	268.0	262.0	275.0	404.0	392.0	425.0	429.9	418.0	441.0	0,3623	0,0039
> 10. ≤ 11 años	517	130.7	108.0	142.0	147.4	142.0	162.0	254.0	247.0	264.0	380.1	370.0	400.0	422.2	397.0	441.0	0,2407	-0,2343
> 11. ≤ 12 años	600	89.0	82.0	94.0	102.0	91.7	109.0	192.0	185.0	201.0	326.1	315.0	339.0	349.1	337.0	369.0	0,4570	-0,3225
> 12. ≤ 13 años	623	68.7	60.0	71.0	77.0	71.0	81.0	133.0	129.0	138.0	271.9	256.0	281.0	283.5	280.0	294.0	0,9533	0,3769
> 13. ≤ 14 años	997	58.0	54.0	61.0	64.0	61.0	66.0	99.0	97.0	101.0	171.0	164.0	174.0	181.0	173.5	186.0	0,9550	1,0556
> 14. ≤ 15 años	1142	51.0	47.0	53.0	56.0	54.0	57.0	84.0	82.0	85.7	130.0	128.0	135.0	140.0	136.0	145.0	0,6005	0,1270
> 15. ≤ 16 años	1291	44.3	42.0	46.0	48.0	47.0	49.0	74.0	73.0	76.0	111.0	109.0	113.0	117.0	114.0	119.0	0,3829	-0,3126
> 16. ≤ 17 años	1399	41.0	40.0	42.0	44.0	43.0	46.0	69.0	67.0	70.0	101.0	98.0	104.0	107.0	105.0	109.5	0,3755	-0,2214
> 17. ≤ 18 años	1634	39.0	37.0	41.0	43.0	42.0	44.0	65.0	64.0	65.0	96.0	94.0	97.0	102.0	98.0	103.0	0,3942	-0,0227
> 18. ≤ 20 años	3830	36.0	35.0	37.0	40.0	39.0	41.0	62.0	61.0	63.0	93.0	92.0	94.5	99.0	97.5	100.0	0,4357	-0,0112
> 20. ≤ 30 años	29489	34.0	34.0	34.0	37.0	37.0	37.0	57.0	57.0	57.0	90.0	90.0	91.0	99.0	98.0	99.0	0,6931	0,3938
> 30. ≤ 40 años	44516	34.0	34.0	34.0	37.0	37.0	37.0	59.0	59.0	59.0	101.0	100.0	101.0	112.0	111.0	112.0	0,9357	0,8538
> 40. ≤ 50 años	55358	35.5	35.0	36.0	39.0	39.0	39.0	62.0	62.0	62.0	104.0	103.3	104.5	113.0	113.0	114.0	0,7554	0,3393
> 50. ≤ 60 años	64756	43.0	43.0	44.0	48.0	48.0	48.0	77.0	76.0	77.0	121.0	121.0	122.0	131.0	130.0	131.0	0,5869	0,1566
> 60. ≤ 70 años	62364	44.0	43.3	44.0	48.0	48.0	48.8	76.0	76.0	76.0	120.0	119.0	120.0	129.6	129.0	130.0	0,6103	0,2697
> 70. ≤ 80 años	51650	42.0	41.5	42.0	46.0	46.0	47.0	74.0	74.0	75.0	119.0	118.0	119.0	129.0	128.0	130.0	0,6587	0,3631
> 80. ≤ 90 años	39993	41.0	40.5	41.0	45.0	45.0	46.0	75.0	75.0	75.0	126.0	125.0	127.0	138.5	137.6	139.3	0,8027	0,6720
> 90. ≤ 100 años	11123	42.0	41.0	43.0	47.0	46.0	47.3	78.0	77.0	78.0	135.3	134.0	137.1	150.0	148.0	152.0	0,9561	1,0663



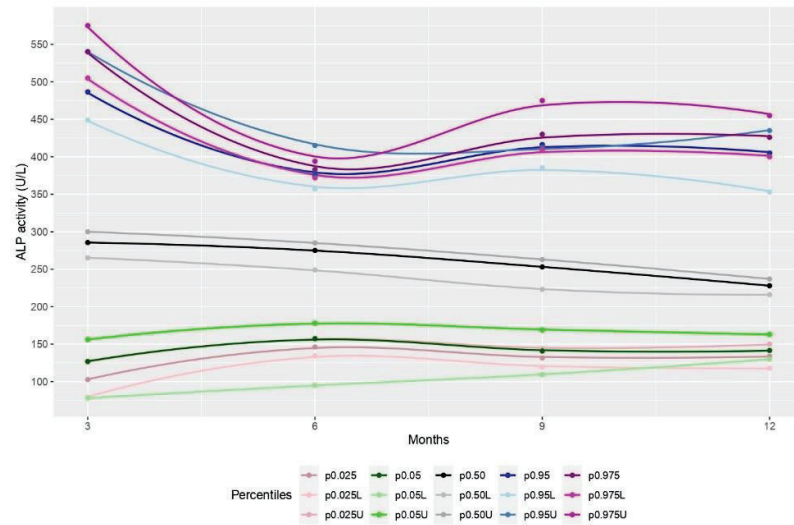
**Figura 11.** Gráficos de percentiles de FA para hombres menores de 90 días, mostrando los percentiles 2.5, 5, 50, 95 y 97.5, con intervalos de confianza del 95%. El eje x corresponde a la edad en días de vida, y el eje y la actividad de la FA expresada en U/L.



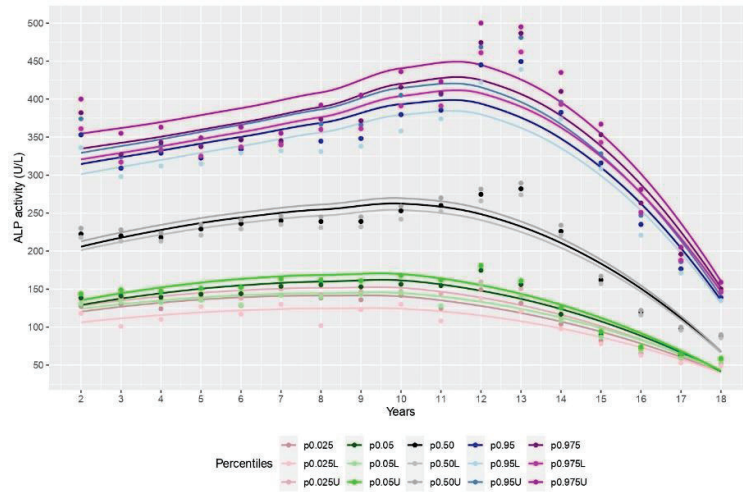
**Figura 12.** Gráficos de percentiles de FA para mujeres menores de 90 días, mostrando los percentiles 2.5, 5, 50, 95 y 97.5, con intervalos de confianza del 95%. El eje x corresponde a la edad en días de vida, y el eje y la actividad de la FA expresada en U/L.



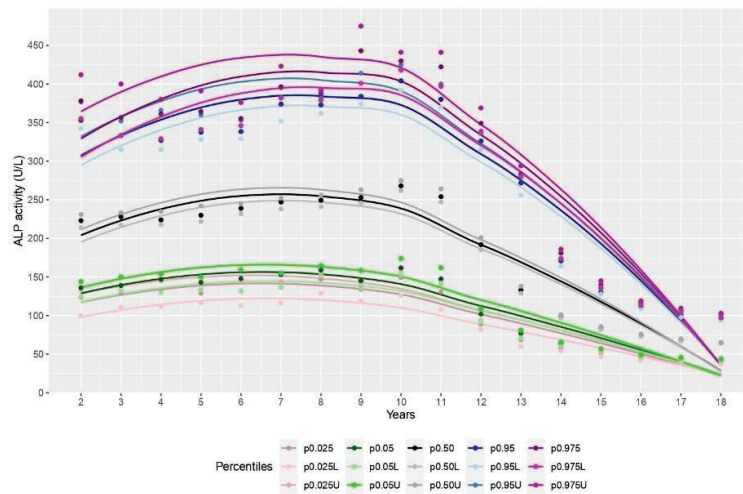
**Figura 13.** Gráficos de percentiles de FA para hombres menores de 1 año, mostrando los percentiles 2.5, 5, 50, 95 y 97.5, con intervalos de confianza del 95%. El eje x corresponde a la edad en días de vida, y el eje y la actividad de la FA expresada en U/L.



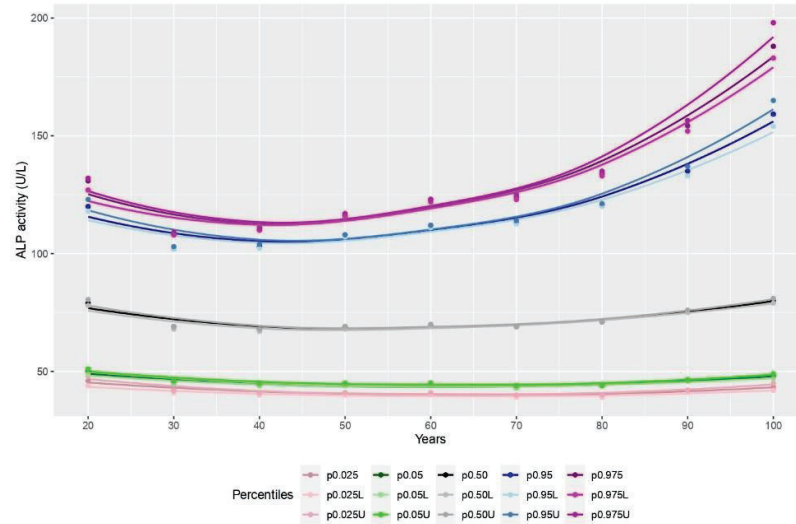
**Figura 14.** Gráficos de percentiles de FA para mujeres menores de 1 año, mostrando los percentiles 2.5, 5, 50, 95 y 97.5, con intervalos de confianza del 95%. El eje x corresponde a la edad en días de vida, y el eje y la actividad de la FA expresada en U/L.



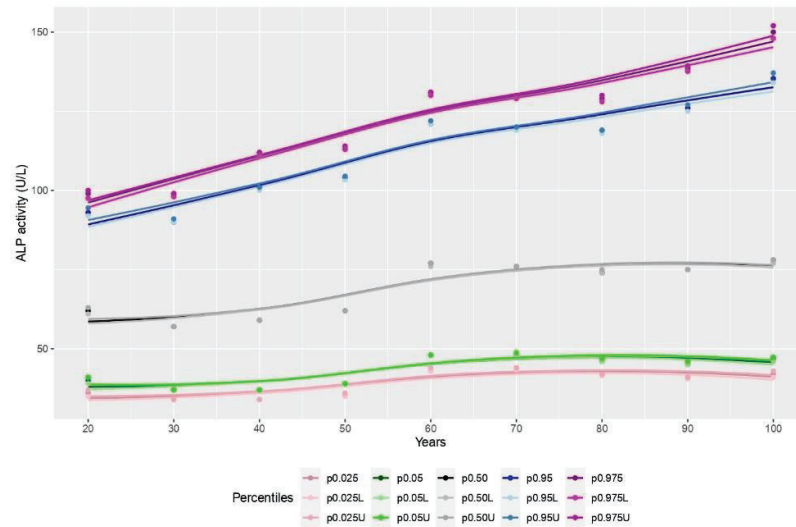
**Figura 15.** Gráficos de percentiles de FA para hombres entre 2 y 18 años, mostrando los percentiles 2.5, 5, 50, 95 y 97.5, con intervalos de confianza del 95%. El eje x corresponde a la edad en días de vida, y el eje y la actividad de la FA expresada en U/L.



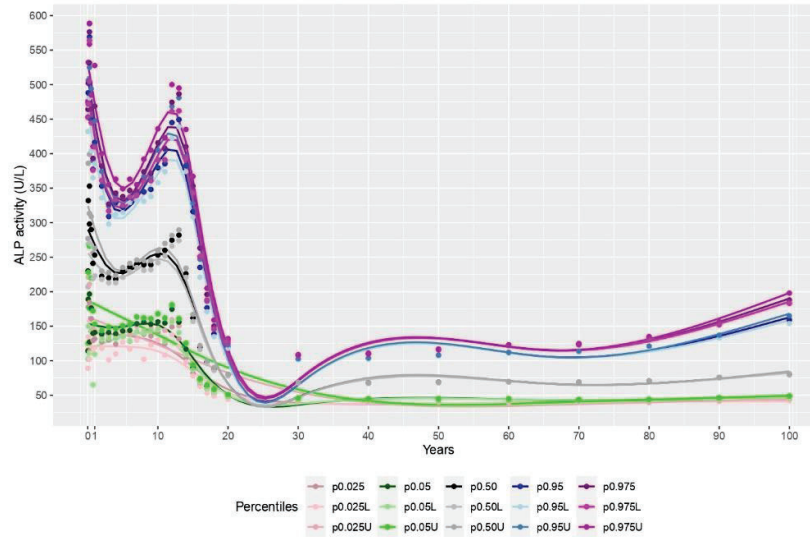
**Figura 16.** Gráficos de percentiles de FA para mujeres entre 2 y 18 años, mostrando los percentiles 2.5, 5, 50, 95 y 97.5, con intervalos de confianza del 95%. El eje x corresponde a la edad en días de vida, y el eje y la actividad de la FA expresada en U/L.



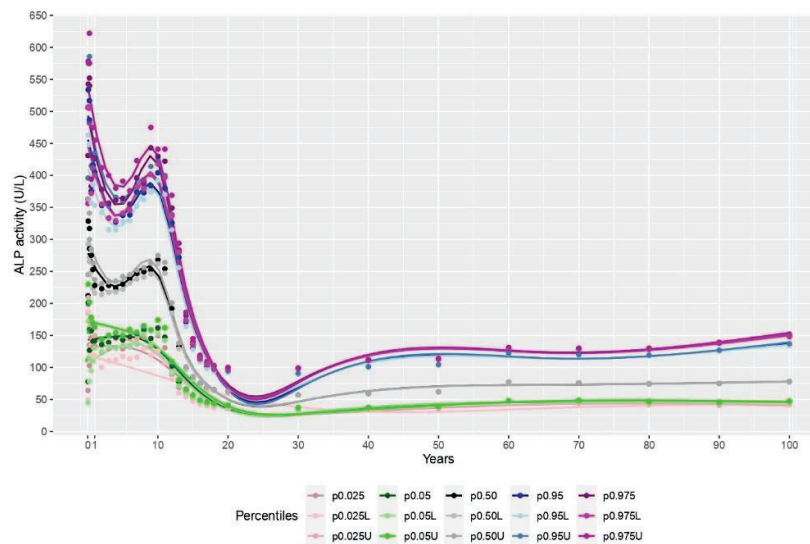
**Figura 17.** Gráficos de percentiles de FA para hombres mayores de 18 años, mostrando los percentiles 2.5, 5, 50, 95 y 97.5, con intervalos de confianza del 95%. El eje x corresponde a la edad en días de vida, y el eje y la actividad de la FA expresada en U/L.



**Figura 18.** Gráficos de percentiles de FA para mujeres mayores de 18 años, mostrando los percentiles 2.5, 5, 50, 95 y 97.5, con intervalos de confianza del 95%. El eje x corresponde a la edad en días de vida, y el eje y la actividad de la FA expresada en U/L.



**Figura 19.** Gráficos de percentiles de FA para hombres de todas las edades, mostrando los percentiles 2.5, 5, 50, 95 y 97.5, con intervalos de confianza del 95%. El eje x corresponde a la edad en días de vida, y el eje y la actividad de la FA expresada en U/L.



**Figura 20.** Gráficos de percentiles de FA para mujeres de todas las edades, mostrando los percentiles 2.5, 5, 50, 95 y 97.5, con intervalos de confianza del 95%. El eje x corresponde a la edad en días de vida, y el eje y la actividad de la FA expresada en U/L.

## 5. DISCUSIÓN

## DISCUSIÓN

El origen de este trabajo de tesis empezó con el nacimiento del protagonista de la primera publicación (**Anexo 1**), un neonato al que se le diagnosticó, a las 24 horas de vida, una enfermedad rara, desconocida por la mayoría del entorno de la Neonatología, la HPP perinatal grave o letal. Motivada por este desconocimiento de la enfermedad y al evidenciar, por un lado, la falta de reconocimiento de los niveles bajos de FA por parte de los clínicos, y por otro, la ausencia de estandarización de los valores de referencia de la FA según edad y sexo en población española surgió este trabajo.

Esta tesis se llevó pues a cabo con el objetivo de dar a conocer la HPP, establecer los IR y gráficos de percentiles para la actividad de la FA en la población española, y facilitar el diagnóstico de esta enfermedad que actualmente ya dispone de un tratamiento esperanzador, mediante un algoritmo diagnóstico.

A continuación, se procede al análisis y desarrollo del tema, respondiendo a los objetivos definidos en esta tesis.

### **5.1. Justificación e importancia de la publicación de nuestro caso y revisión de la enfermedad.**

La baja incidencia de la HPP y más aún en su forma neonatal grave como nuestro caso descrito en el primer artículo de esta tesis doctoral (**Anexo 1**), motivaron su publicación. La difusión de los casos de enfermedades muy raras como la HPP es, por tanto, crucial por diversos motivos. Esta enfermedad, caracterizada por una actividad baja de la TNSALP, puede tener un espectro fenotípico muy variable, desde formas leves a formas graves con complicaciones potencialmente mortales.

Este primer artículo se describe el caso de un recién nacido de sexo masculino con HPP en su forma más infrecuente y grave, la forma neonatal grave o letal, diagnosticado por datos clínicos, analíticos y radiológicos a las 24 horas de vida. En la ecografía prenatal realizada a las 28 semanas de gestación se evidencia acortamiento femoral, sospechándose inicialmente una acondroplasia. La familia rechazó la realización de otras exploraciones o pruebas diagnósticas prenatales. A las 37 semanas de gestación, se

realiza cesárea electiva por sospecha de patología fetal, de acuerdo con la familia. Nace un recién nacido a término, en apnea, bradicardia e hipotónico, que requiere intubación y ventilación mecánica en la sala de partos por insuficiencia respiratoria grave. A la exploración física destaca acortamiento y deformidad de extremidades superiores e inferiores, *caput membranaceum* e hipotonía severa.

Se realizan radiografías donde se evidencia hipoplasia pulmonar y torácica, así como signos de hipomineralización grave generalizada. Así mismo, la analítica de sangre realizada muestra niveles de FA indetectables, hipercalcemia con hipercalciuria.

Ante los hallazgos clínicos, analíticos y radiológicos, la sospecha diagnóstica fue de HPP perinatal grave. La determinación de PLP sérico y PEA en orina confirmaron la sospecha. Con estos datos, en el tercer día de vida, se indicó el tratamiento con TRE con asfotasa alfa, aprobado por la Agencia Europea del Medicamento en el 2015, previo consentimiento familiar. No obstante, el paciente falleció horas más tarde debido a la insuficiencia respiratoria grave secundaria a la hipoplasia torácica.

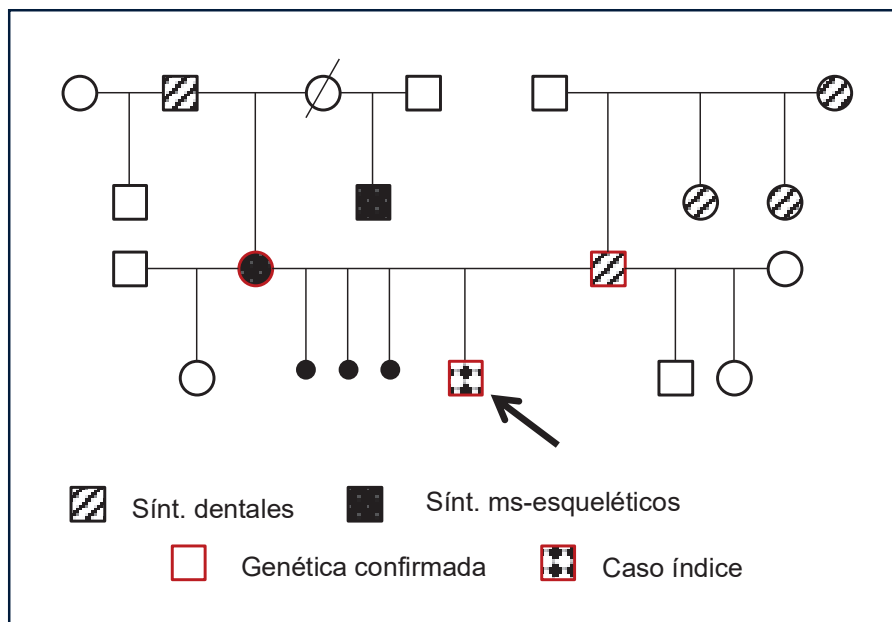


Figura 21. Árbol genealógico familiar. La flecha muestra el caso índice. *Figura original.*

Dada que la HPP es una enfermedad hereditaria y ante la confirmación genética de nuestro caso, se realizó un árbol genealógico familiar detectando casos clínicamente sospechosos en varios familiares, que inicialmente rechazaron el estudio (**Figura 21**).

El diagnóstico precoz es especialmente importante en las formas graves de la enfermedad, ya que la TRE con asfotasa alfa puede mejorar significativamente el pronóstico de los pacientes. La TRE ha demostrado aumentar la supervivencia de los pacientes, especialmente en aquellos con formas más graves, con necesidad de ventilación mecánica o convulsiones dependientes de la vitamina B<sub>6</sub>.

El diagnóstico de las enfermedades raras por estudios genéticos, que suponen un 80% de todas ellas incluida la HPP, ofrece una serie de beneficios significativos para los pacientes y sus familias. Este enfoque, basado en la identificación de la alteración molecular subyacente a la enfermedad, permite un manejo más adecuado, la prevención de complicaciones y un asesoramiento preconcepcional para las familias de riesgo.

Los principales beneficios del diagnóstico de enfermedades raras como la HPP incluyen:

- Certeza diagnóstica: Saber la causa exacta de la enfermedad alivia la ansiedad y pone fin a la “odisea diagnóstica” que implica múltiples visitas médicas y pruebas diagnósticas, que a menudo son invasivas o costosas.
- Mejora de la atención médica: El diagnóstico preciso permite un manejo médico más adecuado, la elección de tratamientos específicos y la prevención de complicaciones. En algunas enfermedades raras, el diagnóstico de precisión abre la puerta a terapias innovadoras como la terapia génica, que pueden modificar el curso de la enfermedad y mejorar la calidad de vida del paciente.
- Asesoramiento genético y reproductivo: En aquellas enfermedades de causa genética como la HPP, su diagnóstico permite identificar el riesgo de recurrencia de la enfermedad en la familia y ofrecer opciones reproductivas, como son el diagnóstico prenatal o preconcepcional. Así ocurrió en nuestro caso, en el que los padres del paciente fallecido lograron concebir otro hijo, pero libre de esta enfermedad.

- Concienciación social: Conocer el diagnóstico permite a los pacientes conectar con otras personas afectadas por la misma enfermedad, compartir experiencias y obtener soporte, así como, facilitar el acceso a servicios educativos y sociales específicos para personas con enfermedades raras.

Además, la publicación de casos clínicos como el nuestro puede contribuir a una mejor comprensión de la historia natural de la enfermedad y a la identificación de nuevas variantes del gen *ALPL*, el gen responsable de la HPP.

En conclusión, la publicación y difusión de casos de HPP es esencial para:

- Aumentar la conciencia sobre esta enfermedad tan poco frecuente.
- Mejorar el conocimiento de los profesionales de la salud sobre sus signos y síntomas.
- Facilitar el diagnóstico precoz y el acceso a un tratamiento adecuado.
- Contribuir a la investigación sobre la enfermedad y al desarrollo de nuevas terapias.

Nuestro artículo proporciona un valioso ejemplo de un caso de HPP neonatal letal, la forma más grave de la enfermedad. La publicación de este caso ayuda a destacar la importancia del diagnóstico prenatal y la búsqueda de tratamientos más eficaces para las formas graves de HPP.

Cabe destacar que, además de la publicación en revistas científicas, la difusión de información sobre la HPP a través de medios de comunicación y organizaciones de pacientes también es importante para llegar a un público más amplio, como ha sido con el Registro Estatal de HPP creado en el año 2014(100). Esto puede ayudar a las familias afectadas por la enfermedad a conectarse entre ellas y a encontrar soporte y recursos, como a través de las existentes asociaciones de familias afectas de HPP(101–103).

## 5.2. Infradiagnóstico de la HPP y necesidad de definir los valores de referencia de la FA.

El desconocimiento de esta enfermedad puede conducir a retrasos en el diagnóstico y, por tanto, un manejo inadecuado de los pacientes. Diversos estudios han demostrado que la HPP está muy probablemente infradiagnosticada por una falta de reconocimiento de unos niveles bajos de FA, ya sea por la ausencia de valor clínico por parte de los profesionales, bien por ausencia de notificación de un valor anormalmente bajo en los informes de laboratorio, o bien la ausencia de valores de normalidad ajustados por edad y sexo(47,94).

Los síntomas de la HPP pueden ser inespecíficos y coincidir con otras enfermedades más comunes, hecho que dificulta aún más su diagnóstico(58,73,80). Por ejemplo, la HPP en adultos puede presentarse con fracturas, dolor óseo crónico y osteomalacia, síntomas que también pueden ser causados por otras enfermedades(3,26,104). En niños, los síntomas pueden incluir raquitismo, deformidades esqueléticas, convulsiones y problemas respiratorios, que también podrían confundirse con otras patologías(29,31).

La FA es una enzima omnipresente en los seres humanos y un importante biomarcador de enfermedades esqueléticas y hepatobiliares. Es pues un parámetro de laboratorio que habitualmente está incluido en los paneles de estudio de la función hepática y en los análisis de enfermedades óseas(92). En cambio, concentraciones anormalmente disminuidas son mucho más infrecuentes, hecho que conlleva al escaso reconocimiento, confiriéndole escaso valor clínico, habitualmente por desconocimiento de las causas atribuibles que suelen ser de causa genética o por déficits nutricionales(25,26,47,58).

La FA sérica juega pues un papel fundamental en el diagnóstico y pronóstico de varias enfermedades como el raquitismo, la cirrosis hepática y los tumores óseos. El diagnóstico de la cirrosis biliar primaria y de la HPP depende precisamente de la evaluación de los niveles séricos de FA. Por tanto, niveles de referencia fiables de la FA sérica son necesarios para evitar diagnósticos erróneos(89).

Aunque la medición de la actividad de FA es una de las pruebas más utilizadas en el laboratorio clínico y los procedimientos analíticos están en su mayoría automatizados, existen cuestiones que deben considerarse para evitar errores de interpretación.

Pueden surgir errores si las muestras de sangre no se recogen correctamente, ya que la enzima puede desactivarse por la presencia de magnesio, zinc, citrato o EDTA(3,6,28,32,42). El método analítico utilizado puede provocar que los resultados obtenidos no sean directamente comparables a los obtenidos con un método diferente. Por este motivo, es importante confiar en valores de referencia específicos del ensayo.

Como ya ha quedado evidente en nuestro estudio y así lo respalda también la literatura publicada, la actividad de la FA cambia en función de la edad, del sexo, y del estado puberal(42,90,92,95–97,105–113). En la interpretación de la FA, la caracterización de los diferentes isoenzimas e isoformas pueden también contribuir a confusión. La isoforma ósea de la FA prevalece en la infancia y la adolescencia, y su actividad refleja los cambios que ocurren durante el crecimiento. Como resultado, los límites normales varían durante la edad de desarrollo como la pubertad, y son más altos en niños que en adultos. Un error común es comparar los valores obtenidos en un niño con los de referencia para individuos adultos(42). Además, una actividad normal de la FA no excluye la presencia de un patrón anómalo de la isoenzima, particularmente en niños(1,95,97,98,107,108,114).

Los resultados del laboratorio deben ser interpretados basándose en IR que permitan distinguir entre sanos y enfermos, y que sean de utilidad para el diagnóstico o prevención de enfermedades. Generalmente, los pacientes y los profesionales dan por hecho que los resultados que recibirán de cualquier laboratorio será el mismo, o al menos comparable, pero, desgraciadamente no siempre es así dado que la interpretación de los resultados, y a veces por los métodos usados, varían más de lo esperado.

La ausencia pues de una estandarización de la FA en las diferentes edades puede contribuir al infradiagnóstico de determinadas patologías, especialmente cuando el diagnóstico se basa en el reconocimiento de niveles bajos, como en el caso de la HPP.

Las mediciones bajas de la FA no son tan infrecuentes. En publicaciones recientes como la de Schmidt *et al.* y Maman *et al.*, estiman que la prevalencia de unos niveles persistentemente bajos de FA en la práctica clínica es del 0,52%(115) y del 0,13%(47) respectivamente, pero según la literatura, la tasa de reconocimiento de una actividad

baja de FA es tan baja como del 3%(47,115). Así pues, unos niveles bajos de FA son raros, pero probablemente tengan una prevalencia mayor que la previamente reconocida si se usaran IR ajustados a edad y sexo.

La interpretación clínica es posible gracias a estos IR, que permiten clasificar las muestras en el contexto de la variación intra e interindividual. Sin embargo, el crecimiento, los cambios en el metabolismo óseo y los cambios en el sistema hepatobiliar dan lugar a una pronunciada variabilidad de la actividad de la FA en función de la edad y el sexo durante la infancia, especialmente en la niñez y la pubertad. Los niveles normales pueden variar además de con la edad y el sexo, con el estado hormonal, el ayuno y el grupo sanguíneo(6,92,96,105,116–120). Cabe destacar que el metabolismo óseo de los adolescentes difiere del de los adultos. Los huesos crecen y se remodelan con mayor rapidez a medida que aumenta la edad, debido a la elevada velocidad de crecimiento esquelético y al rápido recambio óseo de los adolescentes. Así pues, los marcadores óseos en esta población específica pueden tener características únicas en comparación con las de los adultos. Esta dinámica debe tenerse en cuenta a la hora de definir y utilizar los IR de la actividad de la FA para distinguir entre los cambios debidos al desarrollo fisiológico y los debidos a la enfermedad(95).

En resumen, la hipofosfatemia no es un hallazgo tan raro en muestras de sangre, aunque habitualmente sea de forma transitoria y asociada a procesos como anemia, infecciones, deficiencias nutricionales o procesos malignos. No obstante, cuando se detecte un valor bajo de la FA, los clínicos deben pensar en la posibilidad de formas severas o moderadas de HPP. A su vez, una sola determinación no es suficiente para diagnosticar o excluir HPP, ya que se necesitan al menos dos muestras de sangre repetidas para confirmar la actividad de FA consistentemente baja(42,69).

Aunque el diagnóstico precoz y el tratamiento son cruciales para las formas severas de HPP, el seguimiento y el asesoramiento genético son también muy importantes en las formas moderadas. No obstante, debemos tener en cuenta que, como ya se ha comentado, la mayoría de hipofosfatasemias son transitorias y asociadas a condiciones médicas, pero cuando se asocian a condiciones médicas críticas, suelen indicar un peor pronóstico(74).

### 5.3. Definición de IR y gráficos de percentiles de la FA en población española.

Como ya se ha comentado, dado que la medición de la actividad de la FA es una práctica habitual en los laboratorios y existe una falta de estandarización por edad, sexo y población, se puso de manifiesto la necesidad urgente de definir los IR y los percentiles de la FA en nuestra población, tal y como algunos países ya han reportado en la literatura como se muestra en la Tabla 1 de la publicación de nuestro estudio (**Anexo 2**).

Los IR son rangos de valores considerados normales o esperados para una determinada población y varían según factores como la edad, el sexo, la raza, o el estado de salud, entre otros(121). Por tanto, la definición de los IR de parámetros de laboratorio como la FA, requiere considerar varios factores clave para asegurar que los intervalos serán precisos y aplicables a la población a la que van dirigidos. Los aspectos clave que consideramos en nuestro estudio para la definición de los IR de la FA y la elaboración posterior de los gráficos de percentiles en población española son:

#### 5.3.1. Selección de la población de referencia.

Al definir los IR de un parámetro de laboratorio es necesario excluir aquellos factores que pueden alterar su valor. Además, los IR deben basarse en individuos que sean representativos de la población general sana(117,122). Para asegurar la salubridad de los datos para la definición de los IR de la FA, se deberían excluir las enfermedades hepáticas, óseas o renales, o el uso de determinados fármacos que podrían alterar fisiológica o analíticamente la determinación de FA. En nuestro estudio se excluyeron aquellas muestras de pacientes con las enfermedades mencionadas que fueran previamente conocidas. No se pudieron excluir aquellas de pacientes que recibían determinados tratamientos que pudieran alterar el valor de la FA.

Es importante contar con un tamaño de muestra suficientemente grande y representativo de la población para asegurar que los IR sean estadísticamente significativos y generalizables. En nuestro estudio, 664.675 muestras de FA fueron incluidas, pertenecientes a edades comprendidas entre 0 y 99 años, de

las cuales 23.672 correspondían a población pediátrica ( $\leq 18$  años), y con un leve predominio del sexo femenino (337.810 muestras; 52,4%). En el momento de la publicación de nuestro estudio, era el de mayor tamaño muestral publicado hasta la fecha.

### 5.3.2. Características demográficas y geográficas.

La actividad de la FA puede variar significativamente dependiendo de la edad, el sexo y la raza. Por tanto, es esencial establecer IR específicos para cada población. En la literatura existen publicaciones de IR y percentiles específicos para grupos de población de distintos países como China, Alemania, Canadá, Brasil, Australia, India, entre otros(89,92,95–99,107,112,116–121,123–128), como se muestra en la Tabla 1 del segundo artículo de esta tesis (**Anexo 2**). No obstante, no existían publicaciones de IR de FA en población española publicados hasta la fecha.

### 5.3.3. Método estadístico.

Tradicionalmente, los IR se definen entre el percentil 2,5 y el percentil 97,5 de los valores de la población sana. Esto incluye el 95% de la población, lo que implica que el 2,5% de los individuos estarán por debajo del límite inferior y el 2,5% por encima del límite superior.

Para nuestro análisis estadístico de los datos se utilizó el método estadístico software R, versión 4.2.2,28 en el entorno Rstudio(129). El método “Loess” se utilizó para estimar las curvas que siguen los percentiles (p2.5, p5, p50, p95 y p97.5) del nivel de FA para ambos sexos, según los grupos de edad establecidos(130). El método “Loess” es un método de mínimos cuadrados locales robusto y no paramétrico que no requiere normalidad de los datos, lo que produce un ajuste suave de las curvas percentiles.

### 5.3.4. Estandarización y metodología analítica.

Para garantizar la comparabilidad de los datos entre diferentes laboratorios, es crucial utilizar procedimientos analíticos estandarizados y participar en

programas de control de calidad, ya que el método utilizado para la FA puede influir en los resultados(98,124). En nuestro estudio, la actividad de la FA se determinó mediante el método colorimétrico enzimático en la plataforma Roche/Hitachi Cobas, utilizando AMP como tampón, así como magnesio y zinc como cationes, con los analizadores bioquímicos automáticos, todos de *Roche Diagnostics* (COBAS 6000 en 6 laboratorios participantes, COBAS 8000 en 2 laboratorios, e INTEGRA 400 en el laboratorio restante). El método utilizado para este estudio está estandarizado según el procedimiento de la IFCC de 2011(88). De este modo, los resultados obtenidos son más precisos, consistentes y fiables, permitiendo una óptima interpretación para estandarizar la atención del paciente.

#### 5.3.5. Consideración de factores fisiológicos.

La FA presenta fluctuaciones fisiológicas durante diversas etapas de la vida dependientes de la edad y el sexo como son las etapas de crecimiento, la pubertad, la menopausia y el embarazo(43,95,97,98,107,110,113,118,131) Por tanto, es de crucial importancia tener en cuenta estos factores cuando se definen los IR, como hemos tenido en nuestro estudio.

#### 5.3.6. Validación y revisión continua.

A pesar de que los valores normales de FA se establecieron hace ya muchos años, estos no han sido validados en las diferentes etnias. Varios trabajos como el de González *et al.* encontraron diferencias significativas en los percentiles 97,5 de la FA, según el sexo y la raza /etnia estudiados(92,120). El conocimiento de los valores de FA ajustados a edad, sexo y etnias puede permitir la identificación precoz de enfermedades como la HPP, ofrecer un tratamiento preciso y precoz, así como un pronóstico y un cuidado adecuado del paciente, de ahí la importancia de esta tesis.

En nuestro estudio, la evolución de la actividad de la FA durante la infancia y la adolescencia confirma las fluctuaciones temporales observadas en estudios previos(92,95–98,107,112,116–119,121,124,125). La actividad de la FA aumenta

durante el primer mes de vida, alcanzando su pico a los 3 meses. Después del primer año de vida, la actividad de la FA disminuye y se mantiene relativamente estable hasta los 10 años, seguido por un aumento específico según sexo en la adolescencia. Tal y como otros estudios han descrito(95–97,132), también en nuestra serie, la actividad de la FA fue ligeramente superior en varones adolescentes. La edad es otra variable importante que afecta a las concentraciones de marcadores de formación ósea en adolescentes(113). Existen dos picos de crecimiento óseo durante el desarrollo infantil. El primer pico aparece durante la infancia; el segundo pico se produce durante el inicio de la pubertad. Se conoce que los marcadores óseos aumentan rápidamente durante el inicio de la pubertad, cuando la velocidad de crecimiento es mayor y el período de acumulación mineral ósea más rápida(133,134). Al inicio de la pubertad, el aumento de los niveles de estrógenos y otras hormonas sexuales va seguido de cerca por el aumento de las concentraciones de la hormona del crecimiento (GH) y del factor de crecimiento semejante a la insulina tipo I (IGF-I), que son hormonas tróficas óseas importantes para el modelado óseo puberal(135–137). La pubertad se caracteriza por un crecimiento longitudinal acelerado, el llamado “estirón puberal”, y el aumento de diferentes marcadores de recambio óseo coincide con este estirón puberal(106,135,138,139). El inicio de este crecimiento puberal se estableció recientemente en los 10-11 años en las niñas y en 12-13 años en los niños de Cataluña, España(140–143). Según publicaciones anteriores, el estirón se produce aproximadamente entre los 10 y los 12 años en las niñas y entre los 12 y los 14 años en los niños(135,144).

En nuestro estudio, los niveles séricos de FA en los niños fueron superiores a los de las niñas, lo que sugiere una fuerte relación de estos marcadores con el estirón puberal masculino más tardío, como ya han demostrado otros autores(92,122). Este dato concuerda con el pico de FA observado en niños entre los 12-13 años (p50: 282 U/L), pero no en los de las niñas adolescentes, donde el pico se observa más entre los 9-10 años (p50: 268 U/L) como puede verse en las tablas de percentiles (**Tablas 6 y 7**). Durante la edad adulta, después de la segunda década de la vida, observamos que la actividad de la FA se mantiene

estable hasta la octava década en hombres y la quinta década en mujeres, con niveles más elevados en hombres de 20 a 49 años (p50: 69 U/L) que en mujeres (p50: 57-62 U/L). Se observa una inversión de esta tendencia a partir de los 50 años (en hombres, 69 U/L; y en mujeres, 77 U/L) que podría explicarse en parte por el aumento de los marcadores de recambio óseo en mujeres posmenopáusicas. Es decir, en nuestro estudio hemos observado diferencias significativas entre hombres y mujeres, siendo la media superior en los hombres de entre 20 y 49 años, y en las mujeres de entre 50 y 80 años. Nuestros datos refuerzan la correlación positiva entre la FA plasmática y la edad descrita para ambos sexos y están de acuerdo con series anteriores que también encontraron una actividad de FA consistentemente mayor en mujeres mayores de 65 años que en hombres y con la actividad de FA reportada en mujeres españolas posmenopáusicas (128,131,145–148).

#### **5.4. Identificación de pacientes con hipofosfatemia y realización de diagnóstico diferencial.**

La principal característica bioquímica de la HPP es la hipofosfatemia. Sin embargo, como ya se ha comentado, en la práctica clínica, existe una falta de reconocimiento y los niveles bajos de FA a menudo se pasan por alto y sus causas no suelen investigarse, incluso cuando se evalúa la fragilidad ósea(25,26,47,149). Esta falta de atención clínica a menudo conduce a diagnósticos erróneos y a la prescripción de fármacos contraindicados en la HPP, como los agentes antirresortivos(66,149–151).

La identificación de pacientes con niveles bajos de FA y clínica sugestiva de HPP es crucial para diagnosticar la enfermedad y proporcionar un tratamiento adecuado, mejorar la calidad de vida de los pacientes y prevenir complicaciones asociadas a tratamientos inadecuados. Para conseguir esta identificación y realización de un diagnóstico diferencial, se requiere una evaluación exhaustiva de los siguientes puntos clave:

#### 5.4.1. Medición de la actividad de la FA.

El primer paso diagnóstico es la determinación de la actividad de la FA, utilizando métodos colorimétricos como los usados en los laboratorios participantes en nuestro estudio, siendo esencial su comparación con los valores de referencia ajustados por edad y sexo para evitar errores diagnósticos(90,120,152). Algunos laboratorios no alertan de los valores anormalmente bajos de FA y otros utilizan IR para adultos en pacientes de todas las edades, conllevando un potencial infradiagnóstico.

#### 5.4.2. Evaluación clínica y radiológica.

El obstáculo inicial en el diagnóstico de HPP es su sospecha, debido a su diverso fenotipo clínico(43,45,67,79,80,104). Particularmente en la HPP, una correcta historia clínica, exploración física, e interpretación radiológica serán fundamentales para la sospecha diagnóstica.

#### 5.4.3. Exclusión de otras causas de hipofosfatemia.

La HPP no es la única causa de disminución de la actividad de la FA, si no que múltiples condiciones pueden causar niveles bajos de FA como, por ejemplo, déficits nutricionales, hipotiroidismo, enfermedad celíaca, tratamiento con bifosfonatos, entre otras causas, como ya se ha comentado previamente. Dependiendo de la edad de presentación de los síntomas, deberemos realizar el diagnóstico diferencial con determinadas enfermedades, ya que ciertas condiciones comparten similitudes en diferentes etapas de la vida, como se muestra en las **Tabla 2 y Tabla 3** (4,28,34,58,65,69,70). Además, muchos pacientes con niveles bajos de FA transitoria tienen fluctuaciones debidas al curso de su enfermedad de base o bien al tratamiento que reciben. Así pues, hay que tener en cuenta esta posibilidad y distinguir entre hipofosfatemia persistente o transitoria(69).

#### 5.4.4. Análisis de sustratos de la FA.

En pacientes con niveles bajos de FA, es recomendable determinar los niveles de los sustratos de la TNSALP como el PLP en plasma y la PEA en orina, siendo el aumento de los niveles de PLP, un indicador especialmente sensible y específico de HPP y que generalmente refleja la gravedad de la enfermedad, incluso en la forma dental(3).

El análisis del PLP sérico parece ser particularmente útil cuando la hipofosfatemia no es causada por la enfermedad de HPP, porque se podría esperar un nivel elevado exclusivamente en la HPP. Las otras causas de hipofosfatemia parecen suprimir particularmente la actividad del TNSALP óseo(3).

La detección de un nivel elevado de PEA en sangre u orina respalda el diagnóstico de HPP. Algunos laboratorios ofrecen esta prueba como componente del perfil de aminoácidos. Sin embargo, la excreción de PEA está condicionada por la edad, la dieta y el ritmo circadiano, pudiendo ser normal en la HPP leve y elevada en otras enfermedades metabólicas óseas(3).

#### 5.4.5. Estudio genético.

Ante la sospecha clínica, analítica y radiológica de HPP, el estudio en el gen *ALPL* de mutaciones patogénicas, permite establecer un diagnóstico de certeza, sobre todo en aquellos casos en los que el fenotipo es dudoso.

En resumen, la identificación precisa y el diagnóstico diferencial de la HPP requieren una combinación de la determinación precisa de la FA, ajustada a edad y sexo, el análisis de los sustratos de la FA, una evaluación clínica y radiológica, la exclusión de otras causas de hipofosfatemia y, se debe realizar la confirmación mediante estudio genético. Los profesionales sanitarios deberían conocer y concienciarse que un nivel bajo de FA puede tener significancia clínica y que debería ser confirmado y reevaluado si existe justificación clínica. Disponer de IR específicos ajustados a la población es una herramienta esencial para la

investigación de casos de HPP no diagnosticados. Este enfoque integral es esencial para un diagnóstico preciso y un manejo adecuado de la enfermedad.

### 5.5. Algoritmo diagnóstico para la detección de pacientes con HPP y confirmación diagnóstica.

El diagnóstico de HPP supone un reto debido a su baja prevalencia y la variabilidad fenotípica. En este trabajo de tesis, tras la definición de los IR y de los percentiles de la FA se propone el cribado de HPP para la detección de pacientes no diagnosticados con el objetivo de ofrecerles un tratamiento óptimo de esta enfermedad y una mejor calidad de vida. Para ello, se ha diseñado este algoritmo diagnóstico, usando la hipofosfatemia o una actividad de la FA baja como signo guía, para pacientes con o sin síntomas de HPP (**Figura 22**). El uso del algoritmo tiene en cuenta los síntomas clínicos, las pruebas bioquímicas y los signos radiológicos, facilitando así el diagnóstico de HPP detallado previamente en el apartado 5.4., u otros diagnósticos diferenciales comunes para individuos con actividades bajas de FA, siempre que se utilicen IR adecuados como los propuestos en esta tesis doctoral.

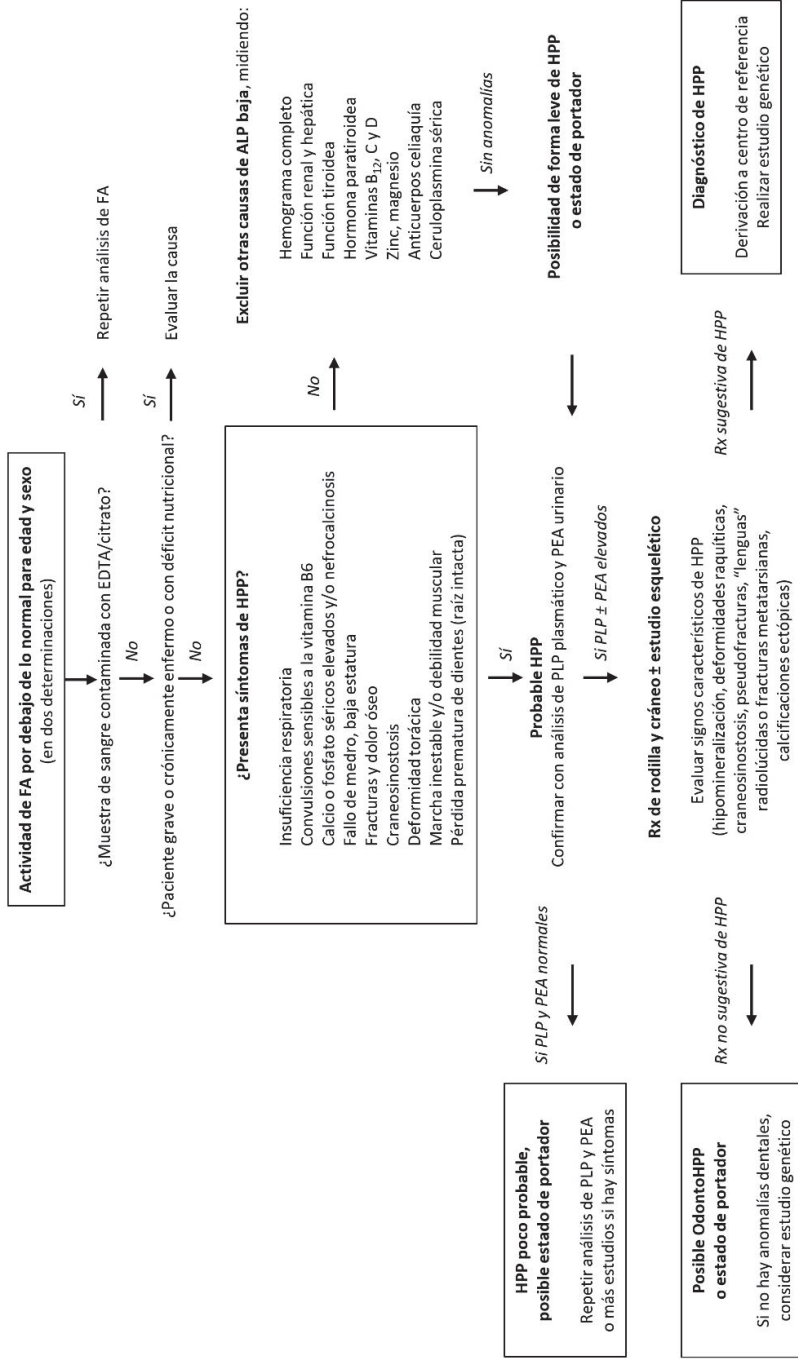


Figura 22. Algoritmo diagnóstico de pacientes con hipofosfatemia con o sin signos de HPP. Figura original, a partir de Saraff et al.(40)

## 5.6. Fortalezas de la tesis doctoral

La publicación de nuestro caso de HPP perinatal grave aporta mayor conocimiento de la forma más grave de esta enfermedad que se considera mortal en un muy elevado % de casos. El artículo se presenta como reporte de un caso y realiza una extensa revisión de la literatura, ofreciendo una perspectiva más amplia de la historia natural de la enfermedad y sus manifestaciones clínicas. El artículo destaca la importancia del reconocimiento precoz y el inicio de la TRE con asfotasa alfa lo antes posible tras el nacimiento para mejorar los resultados y la supervivencia. Esto subraya la necesidad de establecer un consenso de recomendaciones para el manejo de la enfermedad.

En el segundo artículo, se definen los percentiles de FA en población española mediante un estudio multicéntrico realizado en nueve centros hospitalarios terciarios de seis Comunidades de España, con el mayor número de muestras publicadas hasta la fecha. Este enfoque multicéntrico aumenta la robustez del estudio y la generalización de los resultados para la población española, ya que incluye una muestra más representativa en comparación con un estudio realizado en un solo centro y/o región.

Los nueve hospitales participantes pertenecen al mismo grupo hospitalario y utilizan la misma compañía de laboratorio, garantizando que los resultados estén bien alineados y sean comparables. Esta homogeneidad en los procedimientos del laboratorio reduce la variabilidad que se podría observar en estudios que involucren múltiples laboratorios con diferentes métodos o protocolos.

El estudio analizó las medidas de la FA en una amplia gama de edad, desde recién nacidos a adultos de 99 años. Este amplio rango de edad ha permitido establecer IR específicos para diferentes grupos de edad, además de la diferenciación por sexo, reflejando las variaciones fisiológicas de la FA a lo largo de la vida.

Estas fortalezas contribuyen a la validez y utilidad de nuestro estudio para la determinación de los IR de la FA en población española.

### **5.7. Limitaciones de la tesis doctoral**

Nuestro estudio de percentiles está realizado sobre población residente en varias comunidades autónomas de España, pero no se ha podido tener en cuenta su etnia en el caso de pacientes de otros países, pero residentes en España.

Al depurar la base de datos, se pudieron excluir pacientes con enfermedades hepáticas, óseas o renales conocidas, pero otras condiciones médicas que podrían afectar al valor de la FA no fue posible excluirlas por no estar disponibles esa información clínica. Del mismo modo, no fue posible excluir pacientes que recibían fármacos que podrían interferir fisiológica o analíticamente en las medidas de FA.

Nuestro estudio de definición de percentiles e IR de la actividad de la FA realizado en población española proporciona datos muy valiosos. No obstante, es esencial tener en cuenta estas limitaciones.

### **5.8. Perspectivas futuras y posibles líneas de investigación.**

Desde una perspectiva de futuro sólida y con la intención de seguir profundizando en esta línea de investigación, resulta esencial ampliar la representatividad de nuestra muestra. Esta ampliación debe llevarse a cabo controlando meticulosamente los factores de confusión para asegurar la robustez y generalización de nuestros resultados. Paralelamente resulta imprescindible la validación de los IR en poblaciones y entornos clínicos específicos. Esta validación es crucial para garantizar una interpretación precisa de los niveles de FA, un marcador clave en la sospecha de la HPP.

En una línea continuista y con un claro potencial para avanzar en la detección de la HPP, proponemos la implementación de un cuestionario de salud detallado, basado en los criterios diagnósticos establecidos, dirigido a todos los sujetos con percentiles de FA por debajo del p10. Esta estrategia proactiva tiene el objetivo de identificar a pacientes con una alta probabilidad de padecer la enfermedad, optimizando su reconocimiento en la práctica clínica y permitiendo un abordaje diagnóstico más eficaz y preciso.

Aquellos individuos que presenten hipofosfatemia persistente y criterios clínicos sugestivos de HPP serán la población candidata para un exhaustivo estudio genético. A

estos participantes se les ofrecerá la posibilidad de confirmar su diagnóstico mediante la secuenciación del gen *ALPL* en una muestra de saliva, una técnica accesible y poco invasiva. De esta forma, ofreceremos un diagnóstico de certeza a individuos que hasta ahora desconocían la etiología de sus manifestaciones clínicas, abriendo la puerta a un tratamiento eficaz recientemente disponible y mejorando sustancialmente su calidad de vida. Este diagnóstico preciso es fundamental para la implementación de la TRE.

Por último, con una visión de impacto poblacional y diagnóstico precoz, consideramos que el cribado neonatal podría revolucionar la identificación de pacientes con HPP antes de la aparición de síntomas clínicos. Esto permitiría un diagnóstico y tratamiento precoces, con la consecuente mejora de los resultados clínicos. Pese a algunos ensayos con análisis genéticos en sangre seca y medida de PEA urinaria, una nueva línea de investigación prioritaria sería la validación rigurosa de una prueba diagnóstica fiable y coste-efectiva, con una alta sensibilidad y especificidad, para su potencial inclusión en los programas de cribado neonatal de nuestro país. Esta iniciativa podría transformar el panorama de la detección y manejo de la HPP.

## 6. CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

1. La interpretación de la actividad de la fosfatasa alcalina es esencial para el diagnóstico de ciertas enfermedades. Los niveles de fosfatasa alcalina cambian durante la vida y pueden variar entre diferentes etnias y poblaciones. La falta de estandarización de la fosfatasa alcalina a diferentes edades y la falta de reconocimiento clínico de la hipofosfatemia dificulta la toma de decisiones médicas precisas y apropiadas y pueden contribuir al infradiagnóstico de ciertas patologías.
2. Establecer intervalos de referencia y gráficos de percentiles de la actividad de la fosfatasa alcalina, ajustados por edad y sexo, es crucial para una interpretación diagnóstica correcta. Nuestro estudio aporta gráficos de percentiles continuos para la fosfatasa alcalina según el sexo y la edad en la población española, basados en el mayor análisis publicado hasta la fecha. Estos gráficos pueden utilizarse como intervalos de referencia específicos para esta población.
3. Nuestro estudio ratifica que los intervalos de referencia de la fosfatasa alcalina varían significativamente con la edad y el sexo. Los niveles más altos se observan durante las primeras semanas de vida, y a partir de la pubertad se ve una evolución diferencial entre sexos. Esta variabilidad hace que sea inadecuado utilizar los mismos intervalos de referencia para pacientes de todas las edades y sexo, ya que puede conducir a un diagnóstico erróneo y a una clasificación incorrecta de la enfermedad.
4. La medición correcta de la actividad de la fosfatasa alcalina ajustada por edad y sexo es fundamental para el diagnóstico de la hipofosfatemia. Niveles persistentemente bajos de actividad de la fosfatasa alcalina sérica, obligan a la realización de exploraciones clínicas, bioquímicas, radiológicas y genéticas para descartar o confirmar la posible hipofosfatemia.
5. La combinación de la utilización de intervalos de referencia de la fosfatasa alcalina específicos por edad y sexo con la aplicación de algoritmos diagnósticos estructurados es fundamental para un diagnóstico precoz y preciso de la hipofosfatemia. Este diagnóstico es en especial relevante dado que actualmente se dispone de un tratamiento para la hipofosfatemia que ha demostrado ser eficaz para mejorar la morbilidad y la calidad de vida de los pacientes con hipofosfatemia. Por lo tanto, es crucial aumentar la concienciación sobre el hipofosfatemia y promover el uso de herramientas diagnósticas adecuadas para garantizar un tratamiento precoz.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

## BIBLIOGRAFÍA

1. Van Hoof VO, De Broe ME. Interpretation and clinical significance of alkaline phosphatase isoenzyme patterns. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 1994;31(3):197–293.
2. Siller AF, Whyte MP. Alkaline Phosphatase: Discovery and Naming of Our Favorite Enzyme. *Bone Miner Res.* 2018 Feb;33(2):362-364.
3. Whyte MP. Hypophosphatasia-aetiology, nosology, pathogenesis, diagnosis and treatment. *Nat Rev Endocrinol.* 2016;12(4):233–46.
4. Khan AA, Josse R, Kannu P, Villeneuve J, Paul T, Van Uum S, et al. Hypophosphatasia: Canadian update on diagnosis and management. *Osteoporos Int.* 2019;30(9):1713–22.
5. Salles JP. Hypophosphatasia: Biological and Clinical Aspects, Avenues for Therapy. *Clin Biochem Rev.* 2020 Feb;41(1):13–27.
6. Whyte MP. Hypophosphatasia: An overview For 2017. *Bone.* 2017 Sep;102:15-25.
7. Whyte MP. Physiological role of alkaline phosphatase explored in hypophosphatasia. *Ann N Y Acad Sci.* 2010 Mar;1192:190–200.
8. Rathbun J. Hypophosphatasia. *Am J Dis Child.* 1948;75(6):822–31.
9. Galeano-Valle F, Vengoechea J, Galindo RJ. A rare mutation in hypophosphatasia: a case report of adult form and review of the literature. *Arch Endocrinol Metab.* 2019;63(1):89–93.
10. Fraser D. Hypophosphatasia. *Am J Med.* 1957;22(5):730–46.
11. Huhne T, Schonfeld E. Eine eigenartige Wachstumstörung in Kindesalter. *Monatsschr Kinderheilkd.* 1929;42:267.
12. Kubatsch H. Über eine seltene Knochenerkrankung. *Monatsschr. Kinderheilkd.* 1938;75:253.
13. Anspach W, Clifton W. Hyperparathyroidism in children. *Am J Dis Child.* 1939;58(3):540-57.
14. Macey H. Multiple pseudofractures: Report of case. *Proc Staff Meet Mayo Clin.* 1940;15:789-91.
15. Sobel E, Clark L, Fox P, Robinow M. Rickets, deficiency of alkaline phosphatase activity and premature loss of teeth in childhood. *Pediatrics.* 1953 Apr;11(4):309–22.
16. Fraser D, Yendt E, Christie F. Metabolic abnormalities in hypophosphatasia. *Lancet.* 1955 Feb 5; 268(6858):286.
17. McCance R, Morrison A, Dent C. The excretion of phosphoetanolamine and hypophosphatasia. *Lancet.* 1955 Jan 15; 268(6855):131.
18. Anderson H. Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage. *J Cell Biol.* 1969 Apr 1;41(1):59–72.

19. Negri AL. Regulación de la mineralización ósea por factores inorgánicos y peptídicos. *Rev Argent Endocrinol Metab.* 2011;48(4):216–24.
20. Zaher DM, El-Gamal MI, Omar HA, Aljareh SN, Al-Shamma SA, Ali AJ, et al. Recent advances with alkaline phosphatase isoenzymes and their inhibitors. *Arch Pharm (Weinheim).* 2020 May;353(5):e2000011.
21. Vanneuville F, Leroy J. Hypophosphatasia: biochemical diagnosis in post-mortem organs, plasma and diploid skin fibroblasts. *Arch Int Physiol Biochim.* 1979 Oct;87(4):854–5.
22. Mueller H, Stinson R, Mohyuddin, F, Milne J. Isoenzymes of alkaline phosphatase in infantile hypophosphatasia. *J Lab Clin Med.* 1983 Jul;102(1):24–30.
23. Gorodischer R, Davidson R, Mosovich L, Yaffe S. Hypophosphatasia: a developmental anomaly of alkaline phosphatase?. *Pediatr Res.* 1976 Jul;10(7):650–6.
24. Weiss M, Cole D, Ray K, Whyte M, Lafferty M, Mulivor R, et al. A missense mutation in the human liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene causing a lethal form of hypophosphatasia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988;85(20):7666–9.
25. Linglart A, Biosse-Duplan M. Hypophosphatasia. *Curr Osteoporos Rep.* 2016 Jun;14(3):95–105.
26. Mornet E. Hypophosphatasia. *Metabolism.* 2018 May;82:142-155.
27. Seefried L, Petryk A, del Angel G, Reder F, Bauer P. Whole genome sequencing in adults with clinical hallmarks of hypophosphatasia negative for ALPL variants. *Mol Biol Rep.* 2024 Sep 14;51(1):984.
28. Bianchi ML, Bishop NJ, Guañabens N, Hofmann C, Jakob F, Roux C, et al. Hypophosphatasia in adolescents and adults: overview of diagnosis and treatment. *Osteoporos Int.* 2020 Aug;31(8):1445–60.
29. Martos-Moreno GA, Calzada J, Couce ML, Argente J. Hipofosfatasa: manifestaciones clínicas, recomendaciones diagnósticas y opciones terapéuticas. *An Pediatr (Engl Ed).* 2018 Jun;88(6):356.e1-356.e11.
30. Högler W, Langman C, Gomes da Silva H, Fang S, Linglart A, Ozono K, et al. Diagnostic delay is common among patients with hypophosphatasia: initial findings from a longitudinal, prospective, global registry. *BMC Musculoskelet Disord.* 2019 Feb;20(1):80.
31. Caballero Mora FJ, Martos Moreno GA, Garía Esparza E, Argente J. Hipofosfatasa infantil. *An Pediatr.* 2012 Jun;76(6):368-9.
32. Aranda MA, Di Carlo MB. Fosfatasa alcalina: características generales y determinación sérica. *Acta Bioquímica Clínica Latinoam.* 2022;56(3):257–72.
33. Moss DW. Perspectives in Alkaline Phosphatase Research. *Clin Chem.* 1992 Dec;38(12):2486–92.
34. Whyte M, Walkenhorst D, Fedde K, Henthorn P, Hill C. Hypophosphatasia: levels

- of bone alkaline phosphatase immunoreactivity in serum reflect disease severity. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 1996;81(6):2142–8. Available from: of bone alkaline phosphatase immunoreactivity in serum reflect disease severity. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996 Jun;81(6):2142–8.
35. Vimalraj S. Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization. *Gene*. 2020 Sep 5;754:144855.
  36. Whyte MP, Coburn SP, Ryan LM, Ericson KL, Zhang F. Hypophosphatasia: Biochemical hallmarks validate the expanded pediatric clinical nosology. *Bone*. 2018 May;110:96–106.
  37. McKiernan FE, Dong J, Berg RL, Scotty E, Mundt P, Larson L, et al. Mutational and biochemical findings in adults with persistent hypophosphatasemia. *Osteoporos Int*. 2017 Aug;28(8):2343–8.
  38. McKiernan FE, Berg RL, Fuehrer J. Clinical and radiographic findings in adults with persistent hypophosphatasemia. *J Bone Min Res*. 2014 Jul;29(7):1651–60.
  39. Rauch F, Bardai G, Rockman-Greenberg C. ALPL mutations in adults with rheumatologic disorders and low serum alkaline phosphatase activity. *J Bone Miner Metab*. 2019 Sep;37(5):893-9.
  40. Saraff V, Narayanan VK, Lawson AJ, Shaw NJ, Preece MA, Högler W. A diagnostic algorithm for children with low alkaline phosphatase activities: Lessons learned from laboratory screening for hypophosphatasia. *J Pediatr*. 2016 May;172:181-6.e1.
  41. Tournis S, Yavropoulou MP, Polyzos SA, Doulgeraki A. Hypophosphatasia. *J Clin Med*. 2021 Dec 1;10(23):5676.
  42. Baroncelli GI, Carlucci G, Freri E, Giuca MR, Guarnieri V, Navarra G, et al. The diagnosis of hypophosphatasia in children as a multidisciplinary effort: an expert opinion. *J Endocrinol Invest*. 2024 Mar;47(3):739–47.
  43. Reis FS, Lazaretti-Castro M. Hypophosphatasia: from birth to adulthood. *Arch Endocrinol Metab*. 2023 May 25;67(5):1-9.
  44. Choida V, Bubbear JS. Update on the management of hypophosphatasia. *Ther Adv Musculoskelet Dis*. 2019 Aug 1;11:1–8.
  45. Khan AA, Brandi ML, Rush ET, Ali DS, Al-Alwani H, Almonaei K, et al. Hypophosphatasia diagnosis: current state of the art and proposed diagnostic criteria for children and adults. *Osteoporos Int*. 2024 Mar;35(3):431–8.
  46. Lefever E, Witters P, Gielen E, Vanclooster A, Meersseman W, Morava E, et al. Hypophosphatasia in Adults: Clinical Spectrum and Its Association With Genetics and Metabolic Substrates. *J Clin Densitom*. 2020 Jul-Sep;23(3):340-8.
  47. Maman E, Borderie D, Roux C, Briot K. Absence of recognition of low alkaline phosphatase level in a tertiary care hospital. *Osteoporos Int*. 2016 Mar;27(3):1251–4.
  48. Mornet E. Hypophosphatasia. *Orphanet J Rare Dis*. 2007 Oct 4;2:40.

49. Mao X, Liu S, Lin Y, Chen Z, Shao Y, Yu Q, et al. Two novel mutations in the ALPL gene of unrelated Chinese children with Hypophosphatasia: Case reports and literature review. *BMC Pediatr.* 2019 Nov 25;19(1):456.
50. Spodzieja K, Olczak-Kowalczyk D. Premature Loss of Deciduous Teeth as a Symptom of Systemic Disease: A Narrative Literature Review. *Int J Environ Res Public Health.* 2022 Mar 13;19(6):3386.
51. Lira Dos Santos EJ, Mohamed FF, Kramer K, Foster BL. Dental manifestations of hypophosphatasia: translational and clinical advances. *JBMR Plus.* 2025 Jan 6;9(2):ziae180.
52. Larid G, Vix J, Preuss P, Robin F, Tison A, Delaveau C, et al. Detection of hypophosphatasia in hospitalised adults in rheumatology and internal medicine departments: a multicentre study over 10 years. *RMD Open.* 2024 Apr 4;10(2):e004316.
53. Orimo H. Pathophysiology of hypophosphatasia and the potential role of asfotase alfa. *Ther Clin Risk Manag.* 2016 May 17;12:777-86.
54. Bangura A, Wright L, Shuler T. Hypophosphatasia: Current Literature for Pathophysiology, Clinical Manifestations, Diagnosis, and Treatment. *Cureus.* 2020 Jun 13;12(6):e8594.
55. Whyte MP, Zhang F, Wenkert D, McAlister WH, Mack KE, Benigno MC, et al. Hypophosphatasia: Validation and expansion of the clinical nosology for children from 25years experience with 173 pediatric patients. *Bone.* 2015 Jun;75:229–39.
56. Berkseth KE, Tebben PJ, Drake MT, Hefferan TE, Jewison DE, Wermers RA. Clinical spectrum of hypophosphatasia diagnosed in adults. *Bone.* 2013 May; 54(1):21–7.
57. Wenkert D, McAlister WH, Coburn SP, Zerega JA, Ryan LM, Ericson KL, et al. Hypophosphatasia: Nonlethal disease despite skeletal presentation in utero (17 new cases and literature review). *J Bone Miner Res.* 2011 Oct;26(10):2389–98.
58. Vinan-Vega MN, Abate EG. Hypophosphatasia: Clinical assessment and management in the adult patient—a narrative review. *Endocr Pract.* 2018 Dec;24(12):1086–92.
59. Villa-Suárez JM, García-Fontana C, Andújar-Vera F, González-Salvatierra S, de Haro-Muñoz T, Contreras-Bolívar V, et al. Hypophosphatasia: A unique disorder of bone mineralization. *Int J Mol Sci.* 2021 Apr 21;22(9):4303.
60. Greenberg CR, Taylor CL, Haworth JC, Seargeant LE, Philipps S, Triggs-Raine B, et al. A Homoallelic Gly317 → Asp Mutation in ALPL Causes the Perinatal (Lethal) Form of Hypophosphatasia in Canadian Mennonites. *Genomics.* 1993 Jul;17(1):215–7.
61. Whyte MP, Zhang F, Mack KE, Wenkert D, Gottesman GS, Ericson KL, et al. Pyridoxine challenge reflects pediatric hypophosphatasia severity and thereby examines tissue-nonspecific alkaline phosphatase’s role in vitamin B metabolism. *Bone.* 2024 Apr;181:117033.

62. Michigami T, Ohata Y, Fujiwara M, Mochizuki H, Adachi M, Kitaoka T, et al. Clinical practice guidelines for hypophosphatasia. *Clin Pediatr Endocrinol*. 2020;29(1):9–24.
63. Pauli RM, Modaff P, Sipes SL, Whyte MP. Mild hypophosphatasia mimicking severe osteogenesis imperfecta in utero: Bent but not broken. *Am J Med Genet*. 1999 Oct 29;86(5):434–8.
64. Whyte MP, Greenberg CR, Salman NJ, Bober MB, McAlister WH, Wenkert D, et al. Enzyme-Replacement Therapy in Life-Threatening Hypophosphatasia. *N Engl J Med*. 2012 Mar 8;366(10):904–13.
65. Offiah AC, Vockley J, Munns CF, Murotsuki J. Differential diagnosis of perinatal hypophosphatasia: radiologic perspectives. *Pediatr Radiol*. 2019 Jan;49(1):3–22.
66. Sutton RAL, Mumm S, Coburn SP, Ericson KL, Whyte MP. “Atypical femoral fractures” during bisphosphonate exposure in adult hypophosphatasia. *Bone Miner Res*. 2012 May;27(5):987–94.
67. Montero-Lopez R, Farman MR, Högler F, Saraff V, Högler W. Challenges in Hypophosphatasia: Suspicion, Diagnosis, Genetics, Management, and Follow-Up. *Horm Res Paediatr*. 2024 Aug 5:1–10.
68. Linglart A, Salles JP. Hypophosphatasia: the contribution of imaging. *Arch Pediatr*. 2017 May;24(5S2):5S74–9.
69. Cárdenas-Aguilera JG, González-López V, Zarante-Bahamón AM, Prieto-Rivera JC, Baquero-Rodríguez R, Chacón-Acevedo KR, et al. Diagnosis, treatment, and follow-up of patients with hypophosphatasia. *Endocrine*. 2025 Feb; 87(2):400-19.
70. Gennero I, Conte-Auriol F, Salles JP. Laboratory diagnosis of hypophosphatasia. *Arch Pediatr*. 2017 May;24(5S2):5S57–60.
71. Lum G. Significance of low serum alkaline phosphatase activity in a predominantly adult male population. *Clin Chem*. 1995 Apr;41(4):515–8.
72. McKiernan FE, Shrestha LK, Berg RL, Fuehrer J. Acute hypophosphatasemia. *Osteoporos Int*. 2014 Feb;25(2):519–23.
73. Vogt M, Girschick H, Schweitzer T, Benoit C, Holl-Wieden A, Seefried L, et al. Pediatric hypophosphatasia: Lessons learned from a retrospective single-center chart review of 50 children. *Orphanet J Rare Dis*. 2020 Aug 18;15(1):212.
74. Bayramli R, Cevlik T, Guran T, Atay Z, Bas S, Haklar G, et al. Clinical Significance of Hypophosphatasemia in Children. *Calcif Tissue Int*. 2020 Jun;106(6):608–15.
75. Rush E, Brandi ML, Khan A, Ali DS, Al-Alwani H, Almonaei K, et al. Proposed diagnostic criteria for the diagnosis of hypophosphatasia in children and adolescents: results from the HPP International Working Group. *Osteoporos Int*. 2024 Jan;35(1):1–10.
76. Rauch F, Bardai G, Rockman-Greenberg C. ALPL mutations in adults with rheumatologic disorders and low serum alkaline phosphatase activity. *J Bone Miner Metab*. 2019 Sep;37(8):893-9.

77. Takahashi Y, Sawai H, Murotsuki J, Satoh S, Yamada T, Hayakawa H, et al. Parental serum alkaline phosphatase activity as an auxiliary tool for prenatal diagnosis of hypophosphatasia. *Prenat Diagn.* 2017 May;37(5):491–6.
78. Lambert V, Matthews A, MacDonell R, Fitzsimons J. Paediatric early warning systems for detecting and responding to clinical deterioration in children: A systematic review. *BMJ Open.* 2017 Mar;7(3):e014497.
79. Schindeler A, Ludwig K, Munns CF. Enzyme replacement therapy for hypophosphatasia—The current paradigm. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2024 Dec;101(6):593–601.
80. Noda Y, Kido J, Sawada T, Tanaka K, Kumeda K, Yoshida S, et al. Newborn screening for hypophosphatasia: development of a high-throughput tissue nonspecific alkaline phosphatase activity assay using dried blood spots. *JBMR Plus.* 2024 Dec 28;9(3):ziae172.
81. Tokuchi S, Kawano T, Ntege EH, Murahashi M, Ide K, Maruyama N, et al. Adult-onset hypophosphatasia diagnosed after consecutive tooth loss during orthodontic treatment: a case report. *J Med Case Reports.* 2024 Dec 20;18(1):626.
82. Kishnani PS, Martos-Moreno GA, Linglart A, Petryk A, Messali A, Fang S, et al. Effectiveness of asfotase alfa for treatment of adults with hypophosphatasia: results from a global registry. *Orphanet J Rare Dis.* 2024 Mar;19(1):109.
83. Millán JL, Whyte MP. Alkaline Phosphatase and Hypophosphatasia. *Calcif Tissue Int.* 2016 Apr;98(4):398–416.
84. Jaswanthi N, Sindhu R, Nimmy P, Prabu D, RajMohan M, Bharathwaj VV, et al. Effect of Asfotase Alfa in the Treatment of Hypophosphatasia- A Systematic Review. *J Pharm Bioallied Sci.* 2023 Jul;15(Suppl 1):S101–4.
85. Garcia Ribes M. El diagnóstico de las enfermedades raras desde la consulta de atención primaria: desmontando el mito. *Aten Primaria.* 2013 Aug-Sep;45(7):338–40.
86. Cortés M. F. Las Enfermedades Raras. *Rev Med Clin Condes.* 2015 Jul;26(4):425–31.
87. Cortés M. F. Medicina de precisión de Enfermedades Raras. *Rev Med Clin Condes.* 2022;33(2):148–53.
88. Schumann G, Klauke R, Canalias F, Bossert-Reuther S, Franck PFH, Gella FJ, et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37°C. Part 9: reference procedure for the measurement of catalytic concentration of alkaline phosphatase International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) Scientific Division, Committee on Reference Systems of Enzymes (C-RSE) (1)). *Clin Chem Lab Med.* 2011 Sep;49(9):1439-46.
89. Han L, Wang J, Zhang Q, Ke P, Wu X, Wan Z, et al. Development of reference intervals for serum alkaline phosphatase among adults in Southern China traced to the new IFCC reference measurement procedure. *Clin Chem Lab Med.* 2016

- Apr;54(4):659–65.
90. Turan S, Topcu B, Gökçe I, Güran T, Atay Z, Omar A, et al. Serum alkaline phosphatase levels in healthy children and evaluation of alkaline phosphatase z-scores in different types of rickets. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*. 2011;3(1):7–11.
  91. Hoq M, Matthews S, Donath S, Carlin J, Ignjatovic V, Monagle P. Paediatric Reference Intervals: Current Status, Gaps, Challenges and Future Considerations. *Clin Biochem Rev*. 2020 May;41(2):43-52.
  92. Wanjian G, Jie H, Liang G, Cheng W, Tian X, Jianjiang S, et al. Establishment of Reference Interval for Alkaline Phosphatase in Healthy Children of Various Ethnicities, Aged 0–12 Years. *Lab Med*. 2017 May 1;48(2):166–71.
  93. Cho SM, Lee SG, Kim HS, Kim JH. Establishing pediatric reference intervals for 13 biochemical analytes derived from normal subjects in a pediatric endocrinology clinic in Korea. *Clin Biochem*. 2014 Dec;47(18):268–71.
  94. Deeb A, Elfatih A. Could Alerting Physicians for Low Alkaline Phosphatase Levels Be Helpful in Early Diagnosis of Hypophosphatasia? *J Clin Res Pediatr Endocrinol*. 2018 Mar 1;10(1):19-24.
  95. Zierk J, Arzideh F, Haeckel R, Cario H, Frühwald MC, Groß HJ, et al. Pediatric reference intervals for alkaline phosphatase. *Clin Chem Lab Med*. 2017 Jan 1;55(1):102–10.
  96. Ahmed S, Zierk J, Khan AH. Establishment of Reference Intervals for Alkaline Phosphatase in Pakistani Children Using a Data Mining Approach. *Lab Med*. 2020 Sep 1;51(5):484-490.
  97. Colantonio DA, Kyriakopoulou L, Chan MK, Daly CH, Brinc D, Venner AA, et al. Closing the gaps in pediatric laboratory reference intervals: A CALIPER database of 40 biochemical markers in a healthy and multiethnic population of children. *Clin Chem*. 2012 May;58(5):854–68.
  98. Fontes R, Cavalari E, Neto LV, Shrank Y, Santos AS, Gomes DM, et al. Alkaline phosphatase: Reference interval transference from CALIPER to a pediatric Brazilian population. *J Bras Patol Med Lab*. 2018 Aug;54(4):227–31.
  99. Prabha K, al-Sulieman A, Olusi SO, Sugathan TN. Reference intervals for some serum biochemical markers of bone metabolism in Kuwait. *Clin Chim Acta*. 1996 May 30;249(1-2):67-75.
  100. Alexion AstraZeneca Rare Disease. HPP Registry [Internet]. [Citado 20 de marzo de 2025]. Disponible en: <https://hppregistry.com/>
  101. The US Hypophosphatasia Foundation. Soft Bones [Internet]. [Citado 20 de marzo de 2025]. Disponible en: <https://softbones.org/>
  102. Alexion AstraZeneca Rare Disease. HPP Resources and Support [Internet]. 2024 [Citado 20 de marzo de 2025]. Disponible en: <https://hypophosphatasia.com/hpp-resources-and-support/>
  103. Federación Española de Enfermedades Raras (FEDER) [Internet]. 2022 [Citado 20

de marzo de 2025]. Disponible en: <https://www.enfermedades-raras.org/enfermedades-raras/patologias/hipofosfatasia/>

104. Taillandier A, Domingues C, De Cazanove C, Porquet-Bordes V, Monnot S, Kiffer-Moreira T, et al. Molecular diagnosis of hypophosphatasia and differential diagnosis by targeted Next Generation Sequencing. *Mol Genet Metab*. 2015 Nov;116(3):215-20..
105. Sbrocchi AM, Cavin R, Marleau A, Fournier T, Beecroft M, Dos Santos BF. Aetiologies of low alkaline phosphatase in a Canadian Paediatric Tertiary Care Centre. *Paediatr Child Heal*. 2023;28(8):483–8.
106. Van Coeverden SCCM, Netelenbos JC, De Ridder CM, Roos JC, Popp-Snijders C, Delemarre-van De Waal HA. Bone metabolism markers and bone mass in healthy pubertal boys and girls. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2002;57(1):107–16.
107. Lü KL, Xie SS, Liu E, Yu XM, Wang L, Yang ZY, et al. Age-wise trends in alkaline phosphatase activity in 167,625 Chinese children aged 0–18 years. *Clin Biochem*. 2020 May 1;79:34–40.
108. Garnotel R. Pediatric reference values for alkaline phosphatase and pathophysiological variations. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2020 Nov 1;78(6):604–8.
109. Strauch J-M, Vogel M, Meigen C, Ceglarek U, Kratzsch J, Willenberg A, et al. Pediatric reference values of alkaline phosphatase: Analysis from a German population-based cohort and influence of anthropometric and blood parameters. *Bone*. 2023;174:116809.
110. Zierk J, Arzideh F, Rechenauer T, Haeckel R, Rascher W, Metzler M, et al. Age- and sex-specific dynamics in 22 hematologic and biochemical analytes from birth to adolescence. *Clin Chem*. 2015;61(7):964–73.
111. Diemar SS, Møllehave LT, Quardon N, Lylloff L, Thuesen BH, Linneberg A, et al. Effects of age and sex on osteocalcin and bone-specific alkaline phosphatase—reference intervals and confounders for two bone formation markers. *Arch Osteoporos*. 2020;15(1):1–10.
112. Diemar SS, Lylloff L, Rønne MS, Møllehave LT, Heidemann M, Thuesen BH, et al. Reference intervals in Danish children and adolescents for bone turnover markers carboxy-terminal cross-linked telopeptide of type I collagen ( $\beta$ -CTX), pro-collagen type I N-terminal propeptide (PINP), osteocalcin (OC) and bone-specific alkaline phosphatase (bone ALP). *Bone*. 2021 May;146:115879.
113. Rauchenzauner M, Schmid A, Heinz-Erian P, Kapelari K, Falkensammer G, Griesmacher A, et al. Sex- and age-specific reference curves for serum markers of bone turnover in healthy children from 2 months to 18 years. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(2):443–9.
114. Dattagupta A, Petak S. A Case of Hypophosphatasia With Normal Alkaline Phosphatase Levels. *AACE Clin Case Reports*. 2023 Nov 22;10(2):38–40.
115. Schmidt T, Schmidt C, Amling M, Kramer J, Barvencik F. Prevalence of low alkaline

- phosphatase activity in laboratory assessment: Is hypophosphatasia an underdiagnosed disease? *Orphanet J Rare Dis.* 2021 Oct 28;16(1):452.
116. Dortschy R, Schaffrath Rosario A, Scheidt-Nave C, Thierfelder W, Thamm M, Gutsche J et al. Bevölkerungsbezogene Verteilungswerte ausgewählter Laborparameter aus der Studie zur Gesundheit von Kindern und Jugendlichen in Deutschland (KiGGS). Robert-Koch-Institut (Hrsg). 2009;11–45.
  117. Loh TP, Antoniou G, Baghurst P, Metz MP. Development of paediatric biochemistry centile charts as a complement to laboratory reference intervals. *Pathology.* 2014 Jun;46(4):336-43.
  118. Ridefelt P, Gustafsson J, Aldrimer M, Hellberg D. Alkaline phosphatase in healthy children: Reference intervals and prevalence of elevated levels. *Horm Res Paediatr.* 2014;82(6):399–404.
  119. Gallo S, Comeau K, Sharma A, Vanstone CA, Agellon S, Mitchell J, et al. Redefining normal bone and mineral clinical biochemistry reference intervals for healthy infants in Canada. *Clin Biochem.* 2014 Oct;47(15):27-32.
  120. Gonzalez HC, Imam Z, Wong R, Li J, Lu M, Trudeau S, et al. Normal alkaline phosphatase levels are dependent on race/ethnicity: National Health and Nutrition Examination Survey data. *BMJ Open Gastroenterol.* 2020 Oct;7(1):e000502.
  121. Birk R, Heifetz EM. Variations in biochemical values for common laboratory tests: a comparison among multi-ethnic Israeli women cohort. *Ir J Med Sci.* 2019 Feb;188(1):249–58.
  122. Huang Y, Eapen E, Steele S, Grey V. Establishment of reference intervals for bone markers in children and adolescents. *Clin Biochem.* 2011 Jul;44(10-11):771-8.
  123. Achila OO, Semere P, Andemichael D, Gherezgihier H, Mehari S, Amanuel A, et al. Biochemistry reference intervals for healthy elderly population in Asmara, Eritrea. *BMC Res Notes.* 2017 Dec 19;10(1):748.
  124. Adeli K, Higgins V, Secombe D, Collier CP, Balion CM, Cembrowski G, et al. National Survey of Adult and Pediatric Reference Intervals in Clinical Laboratories across Canada: A Report of the CSCC Working Group on Reference Interval Harmonization. *Clin Biochem.* 2017 Nov;50(16-17):925-935.
  125. Marwaha RK, Khadgawat R, Tandon N, Kanwar R, Narang A, Sastry A, et al. Reference intervals of serum calcium, ionized calcium, phosphate and alkaline phosphatase in healthy Indian school children and adolescents. *Clin Biochem.* 2010 Oct;43(15):1216-9.
  126. Strømme JH, Rustad P, Steensland H, Theodorsen L, Urdal P. Reference intervals for eight enzymes in blood of adult females and males measured in accordance with the International Federation of Clinical Chemistry reference system at 37°C: Part of the Nordic Reference Interval Project. *Scand J Clin Lab Invest.* 2004;64(4):371-84.
  127. Rustad P, Felding P, Franzson L, Kairisto V, Lahti A, Mårtensson A, et al. The Nordic

- Reference Interval Project 2000: Recommended reference intervals for 25 common biochemical properties. *Scand J Clin Lab Invest.* 2004;64(4):271–84.
128. Sinton TJ, Cowley DM, Bryant SJ. Reference intervals for calcium, phosphate, and alkaline phosphatase as derived on the basis of multichannel-analyzer profiles. *Clin Chem.* 1986 Jan;32(1 Pt 1):76-9.
  129. RStudio Team. RStudio: Integrated Development Environment for R. Boston, MA. [Internet]. 2015. Disponible en: <http://www.rstudio.com/>
  130. Cleveland WS. Robust Locally Weighted Regression and Smoothing Scatterplots. *J Am Stat Assoc.* 1979;74(368):829-36.
  131. Martínez J, Olmos JM, Hernández JL, Pinedo G, Llorca J, Obregón E, et al. Bone turnover markers in Spanish postmenopausal women. The Camargo cohort study. *Clin Chim Acta.* 2009 Nov;409(1-2):70-4.
  132. Wang X, Liu L, Li P, Ma J, Jiang R, Wang R, et al. Reference and Influential Factors of Serum Bone Markers in Chinese Adolescents. *Sci Rep.* 2017 Dec 11;7(1):17340.
  133. Cadogan J, Blumsohn A, Barker ME, Eastell R. A longitudinal study of bone gain in pubertal girls: Anthropometric and biochemical correlates. *J Bone Miner Res.* 1998 Oct;13(10):1602-12.
  134. Szulc P, Seeman E, Delmas PD. International Review Article Biochemical Measurements of Bone Turnover in Children and Adolescents. *Osteoporos Int.* 2000;11(4):281-94.
  135. Jürimäe J. Interpretation and application of bone turnover markers in children and adolescents. *Curr Opin Pediatr.* 2010 Aug;22(4):494-500.
  136. Jürimäe J, Cicchella A, Jürimäe T, Lätt E, Haljaste K, Purge P, et al. Regular physical activity influences plasma ghrelin concentration in adolescent girls. *Med Sci Sports Exerc.* 2007 Oct;39(10):1736-41..
  137. Léger J, Mercat I, Alberti C, Chevenne D, Armoogum P, Tichet J, et al. The relationship between the GH/IGF-I axis and serum markers of bone turnover metabolism in healthy children. *Eur J Endocrinol.* 2007 Nov;157(5):685-92.
  138. Rotteveel J, Schoute E, Delemarre-Van De Waal HA. Serum procollagen I carboxyterminal propeptide (PICP) levels through puberty: Relation to height velocity and serum hormone levels. *Acta Paediatr.* 1997 Feb;86(2):143-7.
  139. Van Der Sluis IM, Hop WC, Van Leeuwen JPTM, Pols HAP, De Muinck Keizer-Schrama SMPF. A cross-sectional study on biochemical parameters of bone turnover and vitamin D metabolites in healthy dutch children and young adults. *Horm Res.* 2002;57(5–6):170–9.
  140. Carrascosa A, Yeste D, Moreno-Galdó A, Gussinyé M, Ferrández Á, Clemente M, et al. Pubertal growth of 1,453 healthy children according to age at pubertal growth spurt onset. The Barcelona longitudinal growth study. *An Pediatr (Engl Ed).* 2018 Sep;89(3):144-152.
  141. Marrodán MD, Mesa MS, Aréchiga J, Pérez-Magdaleno A. Trend in menarcheal

- age in Spain: Rural and urban comparison during a recent period. *Ann Hum Biol.* 2000 May-Jun;27(3):313–9.
142. Mendoza N, Galliano D, Salamanca A, Castro JER, Mozas J, Sánchez-Borrego R, et al. Lowering the age at menarche and risk of early menarche in a population of Spanish postmenopausal women during the past two decades. *Menopause Int.* 2010 Sep;16(3):111-4.
  143. Cabanes A, Ascunce N, Vidal E, Ederra M, Barcos A, Erdozain N, et al. Decline in age at menarche among Spanish women born from 1925 to 1962. *BMC Public Health.* 2009 Dec 4;9:449.
  144. Biro FM, Greenspan LC, Galvez MP. Puberty in Girls of the 21st Century. *J Pediatr Adolesc Gynecol.* 2012 Oct;25(5):289-94.
  145. Genç S, Ömer B, Aycan-Üstyol E, Kumral A GF. Bone turnover markers and vitamin D status in postmenopausal Turkish women. *Int J Vitam Nutr Res.* 2012 Feb;82(1):27-33.
  146. Gordon T. Factors associated with serum alkaline phosphatase level. *Arch Pathol Lab Med.* 1993 Feb;117(2):187-90.
  147. Negrao MR, Martins MJ, Ramos E, Barros H, Hipólito-Reis C AI. Fosfátase alcalina sérica humana e envelhecimento. *Acta Med Port.* 2003 Nov-Dec;16(6):395-400.
  148. Boyd J, Delost M, Holcomb J. Calcium, phosphorus, and alkaline phosphatase values of elderly subjects. *Clin Lab Sci.* 1998 Jul-Aug;11(4):223-7.
  149. Tornero C, Navarro-Compán V, Tenorio JA, García-Carazo S, Buño A, Monjo I, et al. Can we identify individuals with an ALPL variant in adults with persistent hypophosphatasemia? *Orphanet J Rare Dis.* 2020 Feb 17;15(1):51
  150. Charoenngam N, Thongpiya J, Yingchoncharoen P, Ponvilawan B, Marangoz MS, Chenbhanich J, et al. Atypical Femoral Fracture in Hypophosphatasia: A Systematic Review. *Int J Endocrinol.* 2023 Sep 12;2023:5544148.
  151. Inoue D. Diagnosis and treatment of adult hypophosphatasia: Still a big challenge? *Osteoporos Sarcopenia.* 2024 Mar;10(1):1-2.
  152. Niu X, Ye K, Wang L, Lin Y, Du D. A review on emerging principles and strategies for colorimetric and fluorescent detection of alkaline phosphatase activity. *Anal Chim Acta.* 2019 Dec 4;1086:29-45.

## 8. ANEXOS

## ANEXO 1:

### “Neonatal lethal hypophosphatasia: A case report and review of literature.”

Castells L, Cassanello P, Muñiz F, de Castro MJ, Couce ML.

Medicine (Baltimore). 2018 Nov;97(48):e13269.

#### **Resumen:**

En este primer artículo se reporta un caso de HPP neonatal letal que diagnosticamos y se revisa la literatura. El resumen es el siguiente:

**Justificación:** La HPP es una enfermedad metabólica ósea muy rara causada por mutaciones en el gen *ALPL* que codifica la TNSALP. La forma neonatal grave se considera letal pero el conocer las manifestaciones de la enfermedad puede ayudar a aumentar el conocimiento de la historia natural de la enfermedad para un tratamiento precoz y así mejorar la supervivencia.

**Caso clínico:** Reportamos el caso de un recién nacido en el que sus imágenes fetales mostraron hallazgos de displasia esquelética, considerándose inicialmente la acondroplasia como un diagnóstico potencial.

**Diagnóstico:** En los primeros días de vida se estableció el diagnóstico definitivo de HPP letal perinatal debido a la presentación al nacer de hipoplasia torácica y pulmonar, hipomineralización ósea y FA indetectable. El análisis genético identificó una nueva mutación c.413G>C y otra c.473-2G>C previamente descrita en el gen *ALPL*.

**Resultados:** El paciente falleció al 4<sup>º</sup> día por una evolución clínica complicada sin haber iniciado la terapia enzimática de reemplazo. Retrospectivamente, análisis previos de sus padres ya mostraron una disminución de la FA.

# Neonatal lethal hypophosphatasia

## A case report and review of literature

Laura Castells, MD<sup>a,\*</sup>, Pía Cassanello, MD<sup>a</sup>, Felix Muñoz, MD<sup>a</sup>, María-José de Castro, MD<sup>b</sup>,  
María L. Couce, MD, PhD<sup>b,\*</sup>

### Abstract

**Rationale:** Hypophosphatasia (HPP) is a very rare metabolic bone disease caused by loss-of-function mutations in the *ALPL* gene encoding the tissue nonspecific alkaline phosphatase. The severe neonatal form is considered lethal but insights into manifestations of the disease can help to increase our knowledge of the natural history for an early initiation of treatment and improvement of survival.

**Patient concerns:** We report the case of a newborn in which his fetal imaging showed findings of skeletal dysplasia disorder, considering initially achondroplasia as a potential diagnosis.

**Diagnosis:** A definitive diagnosis compatible with perinatal lethal HPP was established in the 1st days due to the presentation at birth with thoracic and pulmonary hypoplasia, bone hypomineralization, and undetectable alkaline phosphatase. The genetic analysis identified a new heterozygous c.413G>C mutation and another 1 c.473-2G>C previously described in the *ALPL* gene.

**Outcomes:** The patient died on the 4th day by clinical course complicated without having started enzyme replacement therapy (ERT). Retrospectively, previous analyzes of the parents already showed both a decreased alkaline phosphatase.

**Lessons:** This report highlights the importance of prenatal differential diagnosis of bone dysplasia with the key biochemical marker of alkaline phosphatase in the parents. Substitutive ERT administered very soon after birth, seems to change the prognosis in these patients with neonatal HPP.

**Abbreviations:** ALP = alkaline phosphatase, ERT = enzyme replacement therapy, HPP = hypophosphatasia, PLP = pyridoxal 5'-phosphate, TNSALP = tissue nonspecific alkaline phosphatase.

**Keywords:** alkaline phosphatase, asfotase alfa, respiratory failure, rickets

## 1. Introduction

Hypophosphatasia (HPP) is an inherited “ultra-rare” disease of the bone and mineral metabolism, due to a low activity of the tissue nonspecific isoenzyme of alkaline phosphatase (TNSALP). This enzyme is encoded by *ALPL* gene (1p36.12; MIM 171760), more than 315 different mutations were identified worldwide.<sup>[1]</sup> TNSALP hydrolyzes pyrophosphate phosphodiesterase yielding inorganic phosphate, thereby promoting hydroxyapatite formation. In the brain, TNSALP hydrolyzes the phosphorylated version of pyridoxine, allowing this vitamin to cross the blood-brain barrier.<sup>[2]</sup>

Editor: N/A.

The study was supported by the Fundación IDIS-C012.

The authors have no conflicts of interest to disclose.

<sup>a</sup> Neonatal and Perinatal Unit, Hospital Universitari General de Catalunya Quirónsalud, Sant Cugat del Vallès, Barcelona, <sup>b</sup> Neonatal Service, Metabolic Unit, Department of Pediatrics, Santiago de Compostela University Hospital, IDIS (Health Research Institute of Santiago de Compostela), Ciberer, Spain.

\* Correspondence: María L. Couce, and Laura Castells, Head of Neonatal and Perinatal Unit. Santiago de Compostela University Hospital and Hospital Universitari General de Catalunya, Carrer Pedro i Pons 1, 08190 Sant Cugat del Vallès, Barcelona, Spain (e-mails: maria.luz.couce.pico@sergas.es, lcastells@quironsalud.es).

Copyright © 2018 the Author(s). Published by Wolters Kluwer Health, Inc. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial-No Derivatives License 4.0 (CCBY-NC-ND), where it is permissible to download and share the work provided it is properly cited. The work cannot be changed in any way or used commercially without permission from the journal.

Medicine (2018) 97:48(e13269)

Received: 1 August 2018 / Accepted: 23 October 2018

<http://dx.doi.org/10.1097/MD.00000000000013269>

Neonatal lethal HPP is the most severe form of the disease, with estimated prevalence at 1:300,000 in Europe and 1:182,000 in Japan.<sup>[3,4]</sup> It is radiographically visible in the fetal period as bowed and shorter long bones, low or no skeletal mineralization, and more specific signs such as osteochondral spurs and pretibial dimpling.<sup>[4]</sup> Newborns at birth present respiratory distress due to chest deformities and lung hypoplasia; skeletal alterations with generalized lack of ossification, *caput membranaceum*, short and arched limbs, cup-shaped and “moth-eaten” metaphysis, bone spicules and spontaneous fractures, small rib cage with thin ribs; and vitamin B<sub>6</sub>-dependent epileptic seizures. A pseudo-metabolic alteration can be present: hypercalcemia and hyperphosphatemia and can be complicated by early nephrocalcinosis. A conjunctival bluish color may be observed, enabling differential diagnosis and ruling out osteogenesis imperfecta.<sup>[4–6]</sup> The key biochemical marker is markedly decreased serum alkaline phosphatase (ALP).

Until very recently, severe perinatal HPP was lethal at birth or in the 1st months of life. The treatment with a recombinant enzyme replacement therapy (ERT), asfotase alfa, had substantially improved bone mineralization, survival, and ventilation-free survival, although few cases are known.<sup>[7,8]</sup> According to a PubMed search, just 71 cases of neonatal HPP have been published<sup>[7–28]</sup> since the 1st case was characterized in 1948 by Campbell. Twelve of them received ERT, out of which 10 survived (Table 1) with an average evolution time of 13 months (range from 1 month to 5 years). All the others, except one that his family wanted to go home after 4 days of life,<sup>[16]</sup> were mostly exitus during the 1st month of life. The case presented here is a newborn affected by severe HPP with complicated management. For publishing, informed consent was obtained by the parents and no other ethical accuracies were necessary.

**Table 1****Characteristics and outcome of published hypophosphatasia neonatal cases treated with enzyme replacement therapy.**

Author	Year	Prenatally suspected	Sex	Serum ALP IU/L	TNSALP genotype	Survival	Respiratory support at birth (Y/N)	Radiographic changes after treatment*
Whyte et al <sup>[7]</sup>	2012	-	F	19	c.98C>T/c.98C>T	5 y	Y	Y
Whyte et al <sup>[7]</sup>	2012	Y	M	21	c.119C>T/c.1231A>G	7 mo	Y	Y
Whyte et al <sup>[7]</sup>	2012	-	M	20	c.215T>C/c.881A>C	19 mo	Y	Y
Whyte et al <sup>[7]</sup>	2012	Y	F	6	c.920C>T/c.1171C>T	1 y	Y	Y
Okazaki et al <sup>[25]</sup>	2016	Y	F	2	c.1471G>A/c.1471G>A	18 mo	Y	Y
Costain et al <sup>[27]</sup>	2017	Y	F	Und.	c.1171C>T/c.1348C>T	Exitus 3 mo	Y	-
Kitaoka et al <sup>[28]</sup>	2017	-	M	23	c.1559delT/c.1559delT	84 wk	Y	Y
Kitaoka et al <sup>[28]</sup>	2017	-	F	Und.	c.1559delT/c.1559delT	4 wk	Y	Y
Kitaoka et al <sup>[28]</sup>	2017	-	F	1	c.1471 G>A/c.1471 G>A	120 wk	Y	Y
Kitaoka et al <sup>[28]</sup>	2017	-	F	15	c.1559delT/c.1559delT	24 wk	Y	Y
Kitaoka et al <sup>[28]</sup>	2017	-	F	23	c.1559delT/c.1559delT	12 wk	Y	Y
Kitaoka et al <sup>[28]</sup>	2017	-	F	39	c.1478 C>T/c.1559delT	72 wk	Y	Y

Survival is at time of last visit reflected in each publication.

ALP = alkaline phosphatase, F = female, M = male, TNSALP = tissue nonspecific alkaline phosphatase, Und = undetectable, Y = yes.

\* Radiographic changes are shown in terms of increased mineralization and they were significant in all the cases reported treated with enzyme replacement therapy.

## 2. Case report

A male infant was born by cesarean section due to antenatal history of short long bone at 37 weeks of gestation. This was the 5th pregnancy of the mother, aged 35 years, with a healthy daughter from a previous partner and 3 previous abortions with the current partner. There was no history of consanguinity. The antenatal ultrasound at 29 weeks of gestation had shown a fetus with short long bones and generalized hypomineralization suggestive of skeletal dysplasia disorder, considering initially achondroplasia as a potential diagnosis. The parents chose not to undertake any further genetic or invasive test other than gestational ultrasound follow-up.

The birth weight was 2850 g, head circumference 34 cm (both 50th percentile) whereas his length was 42 cm (10th percentile). The Apgar score was 3 at 1 minute and 5 at 5 minutes after birth. He required intubation and mechanical ventilation immediately upon birth due to severe respiratory insufficiency, and showed generalized hypotonia and hypoactivity; however, he was responsive to stimulus and with spontaneous eye opening. On his physical examination was found to have shortened and bowed arms and legs, *caput membranaceum*, widely open fontanelles, short neck, poor muscle tone, and loose joints. Heart

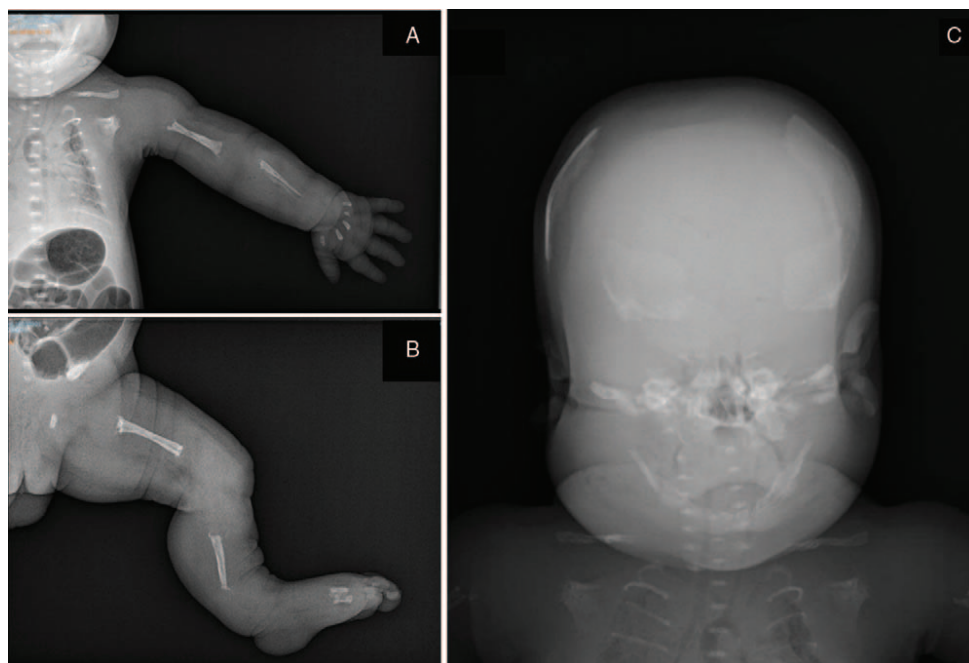
auscultation showed a multifocal systolic murmur II/VI. The external genitalia showed bilateral hydrocele (Fig. 1).

An initial chest X-ray showed thoracic and pulmonary hypoplasia with thin rib bone cortices. Based upon physical examination, prenatal ultrasound and present X-rays, search for hypomineralization defects was initiated. Biochemical analysis showed hypercalcemia (calcium: 11.2 mg/dL) and undetectable serum ALP levels. Urine analysis showed hypercalciuria with increased calcium creatinine ratio (>0.7). Blood count as well as liver function was normal. Further whole-body X-ray was undertaken, showing generalized severe hypomineralization (Fig. 2).

Based on clinical data, the suspected diagnosis was severe perinatal HPP. The data were confirmed by biochemical determination of plasma pyridoxal 5'-phosphate (PLP) levels (>200 nmol/L; normal reference range 23–172 nmol/L) and phosphoethanolamine levels in urine (7567 μmol/g, normal reference below 150 μmol/g). With these data, on the 3rd day treatment with ERT asfotase alfa (approved by EMA in 2015) was indicated obtaining parental informed consent. However, some hours later, the patient died of severe respiratory insufficiency secondary to thoracic hypoplasia.



**Figure 1.** (A) Extreme short neck is showed. (B, C) Pictures of the neonate showing profound deformities and accordion-like skinfolds, explained by no underlying bone mineralization.



**Figure 2.** (A, B) Radiographic features. Skeletal mineralization is nearly absent in this neonate. Pathognomonic metaphyseal “tongues” of radiolucency, gracile ribs, and long-bone deformities are apparent. (C) Almost no mineralization of the cranial skeleton.

Genetic analysis confirmed 2 heterozygous c.473-2G>C/c.413G>C (p.Arg138Pro) mutations in the *ALPL* gene. The parent DNA identified both of them heterozygous carrier.

### 3. Discussion

We have presented a new case of neonatal lethal HPP with 2 heterozygous c.473-2G>C/c.413G>C mutations in the *ALPL* gene. His inheritance pattern was autosomal recessive, like as in severe forms of HPP.<sup>[1]</sup> In the prenatal period, the findings of bone alteration show considerable overlap with other skeletal dysplasia such as achondrogenesis in our case, similar to what is described in the literature, especially with osteogenesis imperfecta types IIA and IIC, and achondrogenesis type IA.<sup>[29]</sup> If present, “spurs” of the limbs and pretibial dimpling are diagnostic for HPP.<sup>[4,29]</sup> In addition, it is also interesting to keep in mind that parental low serum ALP levels of the pregestation and gestation also contributes to the diagnosis of suspicion.<sup>[30]</sup> During the gestation, serum ALP levels increase during the 2nd half of pregnancy at the expense of placental production of ALP, and to a lesser degree, in the production of bone ALP.<sup>[31]</sup> ALP levels of the mother and father were 26 and 32 UI/L, respectively (normal range 35–110 IU/L), in the present case.

At birth, skeletal abnormalities, respiratory distress with pulmonary hypoplasia, hypercalcemia established initial suspicion of bone dysplasia. Neurologic signs with epileptic encephalopathy or hemorrhage were not present undetectable PLP in 2 determinations strongly suspected the diagnosis of HPP at 48 hours. In the literature, all the cases published with neonatal lethal HPP have low PLP levels and a correlation between the severity of the disease and the serum PLP level has been reported.<sup>[32]</sup> However, it is important to reflect that in the first 48 hours PLP concentrations may be those of the mother and may not yet be significantly low. Later results confirmed elevated

serum PLP concentration, which represents a sensitive and specific biochemical marker for HPP, elevated phosphoethanolamine levels are also elevated in serum and urine, although less specific.<sup>[33]</sup> Both are substrates of TNSALP that accumulate endogenously in HPP. Genetic study revealed a known pathogenic mutation and a new mutation c.413G>C (p.Arg138Pro) in exon 5 of the gene, not described in the database [http://www.sesep.uvsq.fr/03\\_hypo\\_mutations.ph](http://www.sesep.uvsq.fr/03_hypo_mutations.ph). Bioinformatic analyzes with SIFT and polyphen 2 algorithms predict harmful and possibly harmful behavior, respectively, for the structure and/or function of the protein.

Before treatment with ERT, no patient reported survived more than 1 year and most died in the 1st days of life, the main cause was respiratory failure and in some cases epileptic encephalopathy.<sup>[13,23]</sup> However, 83.3% of ERT reported cases survived and substantially improved its clinical evolution. Our case died on the 4th day of life without having begun receiving ERT treatment. The HPP in the differential diagnosis was not considered in the pregnancy and the determinations of alkaline phosphatases in the parents were not assessed. This would have facilitated early availability of enzymatic treatment.

In conclusion, earlier diagnosis of perinatal HPP with prenatal recognition and starting ERT as soon as possible after birth may improve outcomes and might have a positive impact on survival. It is therefore necessary to establish a consensus of recommendations.

### Author contributions

**Conceptualization:** Laura Castells.

**Formal analysis:** Laura Castells, Pía Cassanello.

**Methodology:** Laura Castells, Pía Cassanello, José Félix Muñoz.

**Supervision:** María-Luz Couce.

**Writing – original draft:** Laura Castells, María José De Castro.

**Writing – review & editing:** María-Luz Couce.

## References

- [1] Mornet E. Genetics of hypophosphatasia. *Arch Pediatr* 2017;24:S51–56.
- [2] Orimo H. Pathophysiology of hypophosphatasia and the potential role of asfotase alfa. *Ther Clin Risk Manag* 2016;12:777–86.
- [3] Mornet E, Yvard A, Taillandier A, et al. A molecular-based estimation of the prevalence of hypophosphatasia in the European population. *Ann Hum Genet* 2011;75:439–45.
- [4] Mornet E. Hypophosphatasia. *Metabolism* 2018;82:142–55.
- [5] Baujat G, Michot C, Le Quan Sang KH, et al. Perinatal and infantile hypophosphatasia: clinical features and treatment. *Arch Pediatr* 2017;24:S61–5.
- [6] Martos-Moreno GA, Calzada J, Couce ML, et al. Hypophosphatasia: Clinical manifestations, diagnostic recommendations and therapeutic options. *An Pediatr (Barc)* 2018;88:356e1–1.
- [7] Whyte MP, Greenberg CR, Salman NJ, et al. Enzyme-replacement therapy in life-threatening hypophosphatasia. *N Engl J Med* 2012;366:904–13.
- [8] Whyte MP, Rockman-Greenberg C, Ozono K, et al. Asfotase alfa treatment improves survival for perinatal and infantile hypophosphatasia. *J Clin Endocrinol Metab* 2016;101:334–42.
- [9] Weiss MJ, Cole DE, Ray K, et al. A missense mutation in the human liver/kidney alkaline phosphatase gene causing a lethal form of hypophosphatasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:7666–9.
- [10] Shohat M, Rimoin DL, Gruber HE, et al. Perinatal lethal hypophosphatasia; clinical, radiologic and morphologic findings. *Pediatr Radiol* 1991;21:421–7.
- [11] Lorda Sánchez I, Urioste Azcorra M, Martínez Santana S, et al. Perinatal congenital hypophosphatasia: a report of 3 cases, its prevalence in Spain and reflexions on its mode of inheritance [in Spanish]. *An Esp Pediatr* 1996;44:601–4.
- [12] Gehring B, Mornet E, Plath H, et al. Perinatal hypophosphatasia: diagnosis and detection of heterozygote carriers within the family. *Clin Genet* 1999;56:313–7.
- [13] Litmanovitz I, Reish O, Dolfin T, et al. Glu274Lys/Gly309Arg mutation of the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene in neonatal hypophosphatasia associated with convulsions. *J Inherit Metab Dis* 2002;25:35–40.
- [14] Sawai H, Kanazawa N, Tsukahara Y, et al. Severe perinatal hypophosphatasia due to homozygous deletion of T at nucleotide 1559 in the tissue nonspecific alkaline phosphatase gene. *Prenat Diagn* 2003;23:743–6.
- [15] Smilari P, Romeo DM, Palazzo P, et al. Neonatal hypophosphatasia and seizures. A case report. *Minerva Pediatr* 2005;57:319–23.
- [16] Kritsaneepai boon S, Jaruratanasirikul S, Dissaneevate S. Clinics in diagnostic imaging (112). Perinatal lethal hypophosphatasia (PLH). *Singapore Med J* 2006;47:987–92.
- [17] Brun-Heath I, Chabrol E, Fox M, et al. A case of lethal hypophosphatasia providing new insights into the perinatal benign form of hypophosphatasia and expression of the ALPL gene. *Clin Genet* 2008;73:245–50.
- [18] Balasubramaniam S, Bowling F, Carpenter K, et al. Perinatal hypophosphatasia presenting as neonatal epileptic encephalopathy with abnormal neurotransmitter metabolism secondary to reduced co-factor pyridoxal-5'-phosphate availability. *J Inherit Metab Dis* 2010;33:S25–33.
- [19] Nakamura-Utsunomiya A, Okada S, Hara K, et al. Clinical characteristics of perinatal lethal hypophosphatasia: a report of 6 cases. *Clin Pediatr Endocrinol* 2010;19:7–13.
- [20] Chang KC, Lin PH, Su YN, et al. Novel heterozygous tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP) gene mutations causing lethal perinatal hypophosphatasia. *J Bone Miner Metab* 2012;30:109–13.
- [21] Rodriguez E, Bober MB, Davey L, et al. Respiratory mechanics in an infant with perinatal lethal hypophosphatasia treated with human recombinant enzyme replacement therapy. *Pediatr Pulmonol* 2012;47:917–22.
- [22] Leung EC, Mhanni AA, Reed M, et al. Outcome of perinatal hypophosphatasia in manitoba mennonites: a retrospective cohort analysis. *JIMD Rep* 2013;11:73–8.
- [23] Hofmann C, Liese J, Schwarz T, et al. Compound heterozygosity of two functional null mutations in the ALPL gene associated with deleterious neurological outcome in an infant with hypophosphatasia. *Bone* 2013;55:150–7.
- [24] Taketani T, Onigata K, Kobayashi H, et al. Clinical and genetic aspects of hypophosphatasia in Japanese patients. *Arch Dis Child* 2014;99:211–5.
- [25] Okazaki Y, Kitajima H, Mochizuki N, et al. Lethal hypophosphatasia successfully treated with enzyme replacement from day 1 after birth. *Eur J Pediatr* 2016;175:433–7.
- [26] Sağlam H, Erdöl Ş, Dorum S. Clinical and genetic findings of Turkish hypophosphatasia cases. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 2017;9:229–36.
- [27] Costain G, Moore AM, Munroe L, et al. Enzyme replacement therapy in perinatal hypophosphatasia: case report of a negative outcome and lessons for clinical practice. *Mol Genet Metab Rep* 2017;14:22–6.
- [28] Kitaoka T, Tajima T, Nagasaki K, et al. Safety and efficacy of treatment with asfotase alfa in patients with hypophosphatasia: Results from a Japanese clinical trial. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2017;87:10–9.
- [29] Zankl A, Mornet E, Wong S. Specific ultrasonographic features of perinatal lethal hypophosphatasia. *Am J Med Genet A* 2008;146A:1200–4.
- [30] Takahashi Y, Sawai H, Murotsuki J, et al. Parental serum alkaline phosphatase activity as an auxiliary tool for prenatal diagnosis of hypophosphatasia. *Prenat Diagn* 2017;37:491–6.
- [31] Whyte MP, Landt M, Ryan LM, et al. Alkaline phosphatase: placental and tissue-nonspecific isoenzymes hydrolyze phosphoethanolamine, inorganic pyrophosphate, and pyridoxal 5'-phosphate. Substrate accumulation in carriers of hypophosphatasia corrects during pregnancy. *J Clin Invest* 1995;95:1440–5.
- [32] Whyte MP, Whyte MP. Hypophosphatasia and the role of alkaline phosphatase in skeletal mineralization. *Endocr Rev* 1994;15:439–61.
- [33] Gennero I, Conte-Auriol F, Salles JP. Laboratory diagnosis of hypophosphatasia. *Arch Pediatr* 2017;24:5S57–60.

## ANEXO 2:

### **“Age- and Sex-Dynamic Fluctuations and Reference Intervals for Alkaline Phosphatase Among the Spanish Population.”**

Castells Vilella L, Sánchez-Pintos P, Muñiz Llama JF, Gámez Martínez M, Couce ML, Antón J.

Arch Pathol Lab Med 2025;149(1): e19-e25.

En este segundo artículo se definen los IR y percentiles de la FA, ajustados a las fluctuaciones por edad y sexo, en la población española. El resumen es el siguiente:

La interpretación de la actividad de la FA es fundamental para el diagnóstico de determinadas enfermedades. El valor de la FA cambia a lo largo de la vida y puede variar entre diferentes poblaciones.

El objetivo del trabajo es establecer los IR y las tablas de percentiles de la actividad de la FA en la población española, a través de un estudio observacional multicéntrico y comparar los IR obtenidos con aquellos ya definidos en otros países.

Se recogieron un total de 662.350 mediciones de FA de personas de 0 a 99 años entre el periodo de años 2020 y 2022. Este estudio es el más grande publicado en la literatura hasta la fecha.

Se establecieron los gráficos de percentiles para la FA según edad y sexo, pudiendo utilizarse como IR. Los niveles más altos se alcanzan durante las primeras semanas de vida. En la pubertad, se observa una evolución diferente en ambos sexos, alcanzando un pico entre los 10 y 13 años en los niños, permaneciendo estable en las niñas de esta edad. También se encontraron diferencias significativas en adultos, siendo mayor la FA en los hombres entre 20 y 49 años y entre 50 y 79 años en mujeres, tal y como han reportado otros países.

La actividad de FA sigue una fluctuación dependiente de la edad y el sexo, con diferencias geográficas. Es importante contar con valores de referencia apropiados para cada población para permitir una correcta interpretación diagnóstica, así como un diagnóstico precoz de enfermedades relacionadas con alteraciones de la FA.

# Age- and Sex-Dynamic Fluctuations and Reference Intervals for Alkaline Phosphatase Among the Spanish Population

Laura Castells Vilella, MD; Paula Sánchez-Pintos, MD, PhD; José Félix Muñoz Llama, MD; Matías Gámez Martínez, PhD; María Luz Couce, MD, PhD; Jordi Antón, MD, PhD

• **Context.**—Interpretation of alkaline phosphatase (ALP) activity is essential for the diagnosis of certain diseases. ALP changes during life and may vary between different populations.

**Objective.**—To establish reference intervals (RIs) and percentile charts for ALP activity in the Spanish population through a multicentric observational study and to compare the RIs to those defined in other countries.

**Design.**—A total of 662 350 ALP measurements from individuals ages 0 to 99 years from 9 Spanish tertiary care centers collected between 2020 and 2022 were analyzed. This study is the largest published in the literature to date.

**Results.**—Continuous percentile charts for ALP according to sex and age were established which can be used as RIs.

Higher levels are reached during the first weeks of life. In puberty, a differential evolution is observed in both sexes, reaching a peak at 10 to 13 years of age in boys and remaining stable in girls at this age. Significant differences were also observed in adults, higher in men between ages 20 and 49 years and between ages 50 and 79 years in women, as reported in some countries.

**Conclusions.**—ALP activity follows an age- and sex-dependent fluctuation with geographic differences. It is important to have appropriate reference values for each population in order to allow for a correct diagnostic interpretation and early diagnosis of diseases related to ALP abnormalities.

(*Arch Pathol Lab Med.* doi: 10.5858/arpa.2023-0335-OA)

**A**lkaline phosphatase (ALP) is a membrane-bound phosphomonoesterase that catalyzes dephosphorylation reactions of inorganic pyrophosphate and other molecules and participates in various significant functions, such as hydrolyzing a variable spectrum of phosphate-containing physiologic compounds, contributing to DNA synthesis, bone calcification, and

attenuation of inflammation.<sup>1</sup> Four isoenzymes, with distinct functions and expressed by 4 separate genes, are known: 3 tissue-specific ALPs (intestinal, placental, and germ cell) and the ubiquitous tissue-nonspecific ALP, strongly expressed in bone, liver, and kidney, which accounts for approximately 95% of total serum ALP activity and plays a key role in the calcification of bones.<sup>2</sup>

Changes in ALP activity represent a sensitive indicator of skeletal and hepatobiliary diseases, so the establishment of reliable reference intervals (RIs) is the key to avoiding misdiagnosis.<sup>3</sup> Recently, the discovery of an enzyme replacement therapy for hypophosphatasia (HPP),<sup>4,5</sup> an inherited metabolic bone disease with highly variable clinical manifestations, mainly related to defective bone and tooth mineralization<sup>6</sup> and characterized by low serum ALP and tissue-nonspecific ALP activity and increased levels of ALP substrates, makes the requirement for having ALP reference levels adapted to each population, especially in the pediatric age, more important.

Serum level of ALP changes with age and sex.<sup>7</sup> Interpretation of ALP activity requires taking into consideration the dynamic sex- and age-specific changes in ALP activity during a lifetime. Because ALP is a marker of osteoblastic activity, its level is higher in growing children than in adults. Thus, the highest level is detected during rapid growth phases, as in childhood, especially during puberty.<sup>8–11</sup> Some studies on bone markers in pediatric age showed that serum levels of ALP followed a course similar to that of the puberty stages, with higher levels of ALP between 10 and 12 years of age in girls, and between 13 and 15 years of age in boys, corresponding to Tanner stage 2.<sup>8,10</sup> Physicians should be aware that many laboratories use

Accepted for publication March 21, 2024.

Supplemental digital content is available for this article. See text for hyperlink.

From the Department of Pediatrics, Hospital Universitari General de Catalunya, Grupo Quirónsalud, Sant Cugat del Vallès, Barcelona, Spain (Castells Vilella, Muñoz Llama); the Diagnosis and Treatment Unit of Congenital Metabolic Diseases, Department of Pediatrics, University Clinical Hospital of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain (Sánchez-Pintos, Couce); IDIS-Health Research Institute of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain (Sánchez-Pintos, Couce); CIBERER, Instituto Salud Carlos III, Madrid, Spain (Sánchez-Pintos, Couce); MetabERN, Udine, Italy (Sánchez-Pintos, Couce); Quantitative Methods and Socioeconomic Development, Institute for Regional Development, University of Castilla-La Mancha (Gámez Martínez); Pediatric Rheumatology Division, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain (Antón); Immune Deficiency Dysfunction Diseases in Pediatrics (GEMDIP), Institut de Recerca Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain (Antón); and the Department of Surgery and Surgical Specializations at the Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, University of Barcelona, Barcelona, Spain (Antón).

Statistical support funded by Grupo Quirónsalud.

The authors have no relevant financial interest in the products or companies described in this article.

Corresponding author: María Luz Couce, MD, PhD, Department of Pediatrics, University Clinical Hospital of Santiago de Compostela, A Choupana, s/n, 15706 Santiago de Compostela, Spain (email: maria.luz.couce.pico@sergas.es).

same adult ALP reference ranges for patients of all ages and sexes. The wide geographic differences observed in previous studies may be related to racial/ethnicity differences<sup>12</sup> or environmental factors, which makes it essential to standardize the reference values of ALP in each population.<sup>8,10,11</sup>

In 2011, standard procedures for the establishment of serum ALP RIs were published by the Committee on Reference Systems for Enzymes of the International Federation of Clinical Chemistry.<sup>3,13</sup> However, there is a wide variation in results of ALP from various laboratories due to measurement procedure differences or diverse commercial kits, or because they use RIs adjusted from intervals that are old, that are not distinguished by sex and/or age, or that are simply obtained from the literature.<sup>3,12</sup> Furthermore, many countries have published their RIs derived from studies of homogeneous populations according to race or ethnicity, such as Northern Europe,<sup>7,14–16</sup> Germany,<sup>8,17,18</sup> China,<sup>3,19</sup> Israel,<sup>20</sup> and Canada,<sup>21–23</sup> among others, as shown in Table 1. Some of these and other publications have also described differentiated percentiles by age and sex in their population, whether in pediatric<sup>8,10,22,24–26</sup> or adult populations.<sup>3,14,15,25,27</sup> However, there are no published RIs and percentiles adjusted by sex and for all ages in Spanish population. In addition, as shown in Table 1, our study is the largest yet published in terms of number of participants and samples analyzed using an indirect approach. Therefore, it is essential to have reliable ALP reference values adjusted by age and sex and by its population to avoid misdiagnoses.

## MATERIALS AND METHODS

### Study Participants

This multicentric observational study was carried out during the period of January 1, 2020, to June 30, 2022, at 9 tertiary care centers in 6 regions in Spain (Table 2). These 9 Spanish hospitals belong to the same private hospital group with the same laboratory company. In this way, our results are well aligned and comparable. Measurements of ALP activity performed during clinical care of inpatients and outpatients of all ages in the hospitals included were analyzed. ALP blood measurements performed were retrieved from the participating laboratories' databases. The ages range from newborns to 99 years, differentiated by sex and by their pathology. Exclusion criteria included those participants with known liver, renal, or bone diseases, or else abnormal results of other tests of liver, kidney, or bone metabolism assessment, to ensure the healthiness of the data set as reference values because this would interfere with alkaline phosphatase measurement (Figure 1).

The age intervals that have been taken to measure the values of the reference percentiles (2.5, 5, 50, 75, and 97.5) and differentiated by sex are: (1) up to 3 months of age: [0, 15], (15, 30), (30, 45), (45, 60), (60, 75), and (75, 90) days; (2) from 3 months to 1 year: [0, 3], (3, 6), (6, 9), and (9, 12) months; (3) from 1 to 18 years: (1, 2), (2, 3), ... up to (17, 18) years; (4) older than 18 years: (18, 20), (20, 30), (30, 40), ... up to (90, 100).

The research complied with all the relevant national regulations and the tenets of the Declaration of Helsinki. The present study was approved by the Clinical Research Ethics Committee of "Ibérica de Diagnóstico y Cirugía" Salud in Catalonia, Spain (code No. 2019/32-UPN-HUGC).

### Analytic Procedures

ALP activity (U/L) was determined by the enzymatic colorimetric method on the Roche/Hitachi Cobas platform, using amino-methyl-propanol (AMP) as a buffer as well as magnesium and zinc as cations, with the following automatic biochemical analyzers, all of them of from Roche Diagnostics (Roche COBAS 6000 in 6 of the participating laboratories; Rocha COBAS 8000; in 2 laboratories;

and Roche Integra 400 in the remaining laboratory), as Table 2 shows. The same Roche platform and analyzer were used for the establishment of pediatric reference intervals by the CALIPER reference study.<sup>21</sup> The method used for this study is standardized against the 2011 International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) procedure.

To ensure that data were comparable between the various laboratories, we chose to use the study period during which the same *in vitro* test for the quantitative determination of alkaline phosphatase in human serum and plasma (ALP2L: ACN 8683) on Roche COBAS systems analyzers was mostly used. In addition, quality controls and the frequency of calibrations were the same for all laboratories because they belong to the same lab company. In this way, the results obtained were more precise and consistent, and they allowed an optimal interpretation of them to ensure the accuracy of the reported results and their comparability.

The measuring range was 5 to 1200 U/L. The intra-assay percentage coefficient of variation (intra %CV) was 0.7% at concentrations between 83.7 and 84.9 U/L, 0.5% at concentrations between 221 and 223 U/L, and 0.3% at concentrations between 963 and 969 U/L. The interassay percentage coefficient of variation (inter %CV) was 2.4% at concentrations of  $92.8 \pm 2.2$  U/L, 1.7% at concentrations of  $224 \pm 4$  U/L, and 0.9% at concentrations of  $1025 \pm 9$  U/L.

### Statistical Analysis and Calculation of Percentile Charts

The statistical analysis of the data was performed using the statistical software R, version 4.2.2,<sup>28</sup> in the Rstudio environment.<sup>29</sup> The "Loess" method was used to estimate the curves that follow the percentiles (p2.5, p5, p50, p95, and p97.5) of the alkaline phosphatase level for both sexes, according to the established age groups. The "Loess" method<sup>30</sup> is a robust and nonparametric local least squares method that does not require normality of the data, producing a smooth fit of the percentile curves.

## RESULTS

We evaluated the ALP activity in blood samples taken from 662350 outpatients and inpatients from 0 to 99 years of age from 9 tertiary hospitals in Spain. We further established the continuous percentile charts of ALP activity divided by age groups and differentiated by sex. With these 662350 samples and after designing the database, some determinations were discarded when errors in the date of birth or date of extraction were observed that resulted in incongruous ages, accounting for 0.2% of the total samples. For patients who had several ALP measurements, median was calculated and chosen because it is the best representative of a data set. Likewise, in a first analysis to establish the percentiles (2.5, 5, 50, 75, and 97.5), data that exceeded the 97.5% percentile and were ALP values of several thousand units were considered clearly erroneous and outliers. To minimize this effect, these outliers, which represented the highest 2.5% of data, were eliminated from each age and sex group.

Finally, 644675 samples were included in this study, 23672 of them (3.7%) corresponding to pediatric samples ( $\leq 18$  years), with a slight predominance of women (337810 samples; 52.4%). No ethnicity differentiation was performed because the study population was mostly White.

### Percentile Distribution

We created percentile charts for ALP activity in participants according to sex and age which can be used as RIs (Figures 2 through 5; Supplemental Table 1; and Supplemental Figures 1 through 6 [see the [supplemental digital content](#) containing 1 table and 6 figures]). The higher levels in both sexes during early infancy are reached during the first year, with a slight

**Table 1. Reference Intervals for Alkaline Phosphatase Due to Study Population**

Source, y	Country/Region	Age Range	Data Base/Method	No.	Sampling Period	Percentile Charts
Lü et al, <sup>10</sup> 2020	Chongqing, China	Birth to 18 y	Provincial hospital	167 625 children, 361 405 samples	May 2013–May 2019	Yes
Ahmed et al, <sup>17</sup> 2020	Germany	1–17 y	Clinical laboratory, in and outpatients	246 845 samples/42 711 children	January 2013–December 2017	No
Gonzalez et al, <sup>12</sup> 2020	Diverse race/ethnicity	Healthy adults	National Health and Nutrition Examination Survey	3053 adults/samples	2009–2016	No
Diemar et al, <sup>16</sup> 2020	Denmark	Ages 6–11 y, 7 y of follow-up	CHAMPS-study DK	762 children	2008–2015	No
Birk et al, <sup>20</sup> 2019	Israel	18–52 y of age multiethnic Israeli women	Medical center database	483 women/samples	August 2004–August 2010	No
Achila et al, <sup>27</sup> 2017	Eritrea, Africa	Elderly healthy adults, ages 60–80 y	Provincial hospital	246 adults	March–June 2016	Yes
Adeli et al, <sup>23</sup> 2017	Canada	Children, adolescents, adults	National survey in 37 laboratories	Not specified	April–May 2016	No
Fontes et al, <sup>9</sup> 2018	Brazil	1–18 y of age	Private laboratory	1690 children/samples	April 2015–March 2016	No
Zierk et al, <sup>8</sup> 2017	Germany	Birth to age 18 y	Six tertiary care centers and 1 laboratory	361 405 samples/124 440 children	January 2004–June 2015	Yes
Han et al, <sup>3</sup> 2016	Guangdong, China	Healthy adults	Provincial hospital laboratory	658 healthy adults/samples	November 2014–February 2015	No
Wanjian et al, <sup>19</sup> 2017	China	Birth to age 12 y, healthy children	Provincial hospital laboratory	502 children/samples	February–November 2014	No
Loh et al, <sup>24</sup> 2014	Queensland, Australia	Birth to age 18 y	Australian primary care	56 712 children/samples	2012–2013	Yes
Gallo et al, <sup>22</sup> 2015	Canada	1–12 mo	Healthy Canadian children	132 children/651 samples	2007–2011	Yes
Ridefelt et al, <sup>7</sup> 2014	Falun region, central Sweden	6 mo to 18 y of age, healthy children	Provincial hospital laboratory	693 children/samples	Not specified	No
Colantonio et al, <sup>21</sup> 2012	Toronto area, Canada	Birth to 18 y of age, healthy children	CALIPER Study	1213 children/samples	Not specified	No
Marwahav et al, <sup>26</sup> 2010	India	6–17 y of age	Healthy Indian children	3327 children/samples	Not specified	Yes
Dortschy et al, <sup>18</sup> 2009	Germany	1–17 y of age	Healthy German children	14 255 children/samples	2003–2006	Yes
Strømme et al, <sup>14</sup> 2004	Nordic countries	Healthy adults	102 Nordic clinical biochemistry laboratories	3036 adults/959 samples	1999–2000	Yes
Rustad et al, <sup>15</sup> 2004						
Prabha, <sup>25</sup> 1996	Kuwait	Birth to 50+ y of age	Provincial hospital laboratory	1127 outpatient subjects	Not specified	Yes
Sinton et al, <sup>43</sup> 1986	Australia	Ages 20–80+ y	Hospitalized population	5599 men and 7299 women	2.5-y period not specified	No

**Table 2. List of the Participating Hospitals and the Analyzer Employed**

Name of Quirónsalud Hospital	Roche Analyzer	Sex, No.		Age, y				
		Male	Female	Percentile 5	Percentile 25	Percentile 50	Percentile 75	Percentile 95
Hospital Quirónsalud Albacete	COBAS 6000	12 421	17 402	21.37	41.48	57.14	71.56	87.55
Hospital Quirónsalud A Coruña	COBRA INTEGRA 400	6467	9060	21.56	42.04	57.74	71.72	87.55
Policlínica Gipuzkoa	COBAS 6000	13 739	18 998	18.36	40.62	55.88	70.41	86.90
Hospital Universitari General de Catalunya	COBAS 8000	18 563	26 144	17.72	40.74	55.61	70.24	86.65
Hospital Universitari Sagrat Cor	COBAS 6000	5562	7581	15.62	39.51	54.24	69.00	85.77
Hospital Quirónsalud Málaga	COBAS 6000	14 874	20 760	14.86	39.15	53.76	68.39	85.36
Hospital Quirónsalud Valencia	COBAS 6000	14 796	20 846	21.45	41.74	57.16	71.65	87.66
Hospital Quirónsalud Sevilla	COBAS 6000	19 220	27 075	12.21	38.53	51.97	66.34	83.74
Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz	COBAS 8000	171 083	237 713	21.69	42.36	57.96	72.10	87.77

increase after the first 2 weeks of life. In puberty a differential evolution is observed in both sexes, with a marked increase in ALP activity in boys, reaching a peak at 10 to 13 years of age and with a slightly lower value between 13 and 15 years; instead, in girls ALP activity remains stable between 10 and 13 years and decreases to less than a half of the previous levels in the next 2 years.

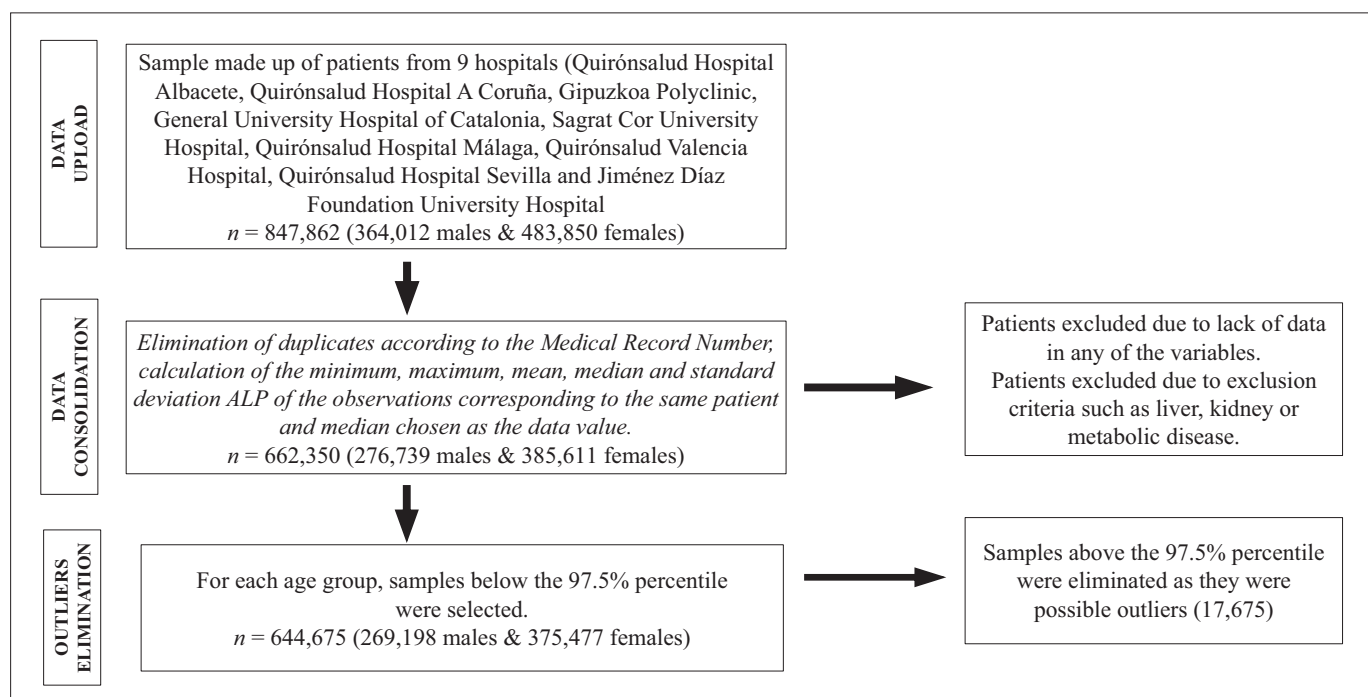
Afterwards, in men, a gradual decrease is subsequently observed until the beginning of the thirties, and later ALP activity remains practically unchanged until the age of 80 years. In women, after a progressive decrease up to 30 years of age, the levels remain stable for 2 decades, and subsequently an increase to 75 U/L is observed that remains from 50 to 90 years, with a minimal later increase.

Significant differences between men and women have been found, the median being higher in men between 20 and 49 years of age and between 50 and 79 years of age in women. These differences were also previously reported.<sup>3,25</sup>

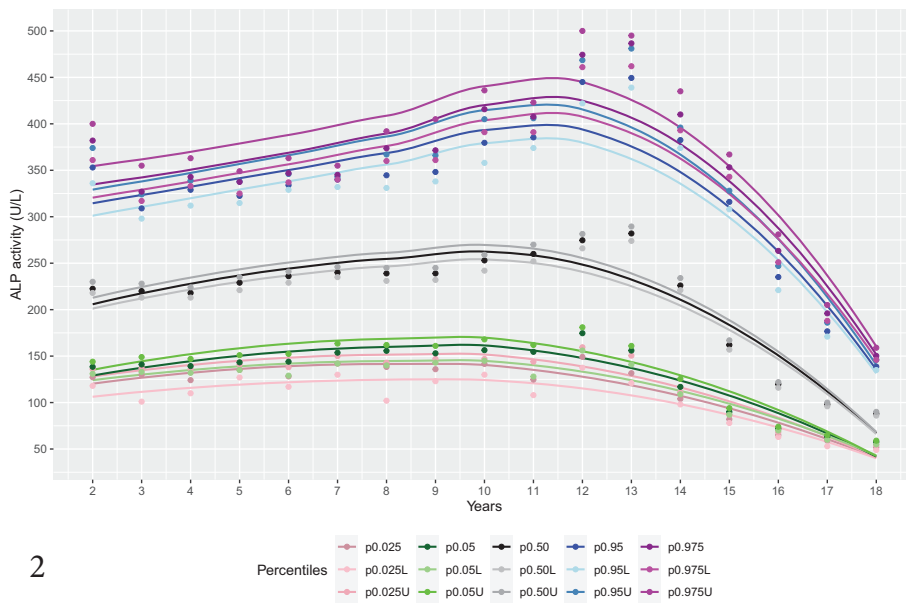
## DISCUSSION

Laboratory results must be interpreted based on an RI that is used to distinguish between “health” and “disease” and to assist in the diagnosis and/or prevention of disease. Generally, patients and physicians assume they will receive the same, or at least comparable, results from any laboratory; unfortunately, result interpretation—and for some methods, the result itself—may vary more than expected. In ALP interpretation the characterization of different isoenzymes and isoforms contributes to further confusion.<sup>31</sup> There is consensus among researchers regarding age- and sex-related changes in serum ALP activity<sup>8–11,21</sup> that should be kept in mind for a proper interpretation and, moreover, a normal total ALP activity does not rule out the presence of an abnormal isoenzyme pattern, particularly in children.<sup>31</sup>

The lack of standardization of ALP at different ages can contribute to the underdiagnosis of certain pathologies, especially



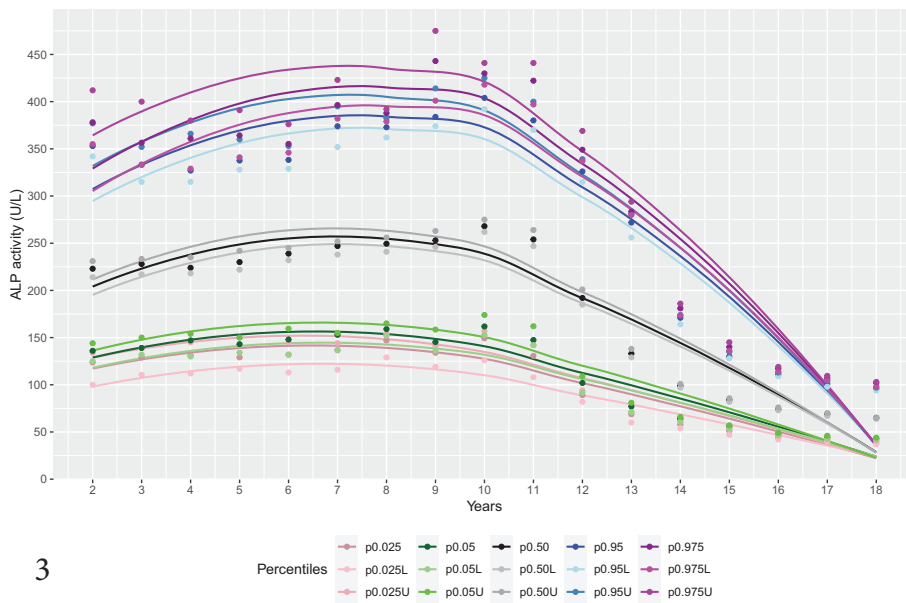
**Figure 1.** Flowchart showing the summary of data reading and purging.



**Figure 2.** Alkaline phosphatase percentiles for males aged 2 to 18 years, showing the 2.5th, 5th, 50th, 95th, and 97.5th percentiles, with 95% CIs. The x-axis corresponds to age in years, and the y-axis shows the ALP activity expressed in U/L.

**Figure 3.** Alkaline phosphatase percentiles for females aged 2 to 18 years, showing the 2.5th, 5th, 50th, 95th, and 97.5th percentiles, with 95% CIs. The x-axis corresponds to age in years, and the y-axis shows the ALP activity expressed in U/L.

2



3

when the diagnosis is based on the recognition of low levels, as in the case of HPP. A recent German study estimates that 0.52% of the adults (1:194) included show laboratory signs of HPP,<sup>32</sup> but according to the literature the rate of recognition of low ALP activity is as low as 3%.<sup>33</sup> Thus, more than 80% of adults with persistently low ALP activity received a diagnosis of HPP by genetic study, in both the osteoporotic and nonosteoporotic populations.<sup>34,35</sup>

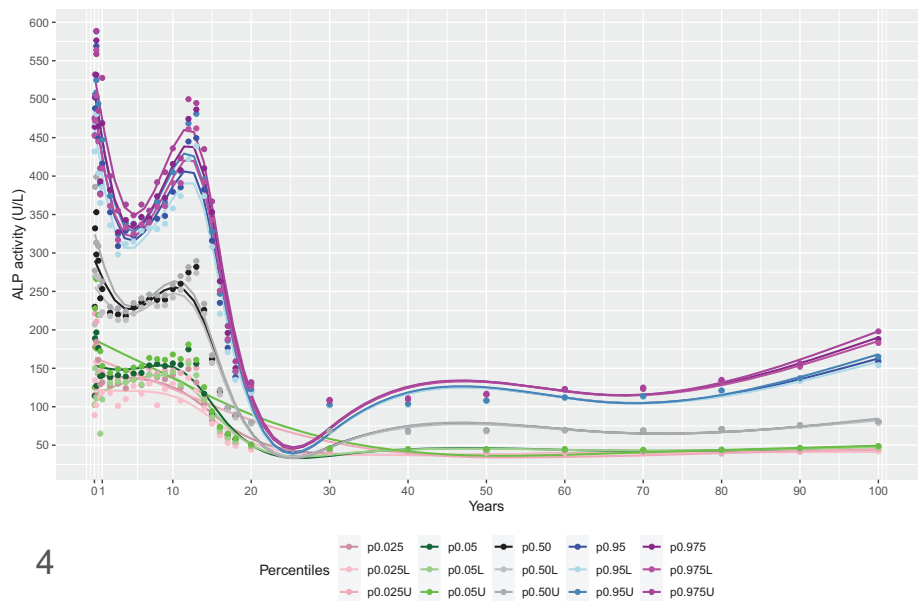
The evolution of ALP activity during childhood and adolescence confirms the temporal fluctuations observed in previous studies<sup>10,11</sup> except for the lack of an increase of ALP activity in female adolescents. ALP activity increases during the first month of life, reaching a peak at 3 months. After the first year of life ALP activity decreases and remains relatively stable until 10 years of age, succeeded by a sex-specific rise in adolescence. As previously described,<sup>36</sup> ALP activity in our series reached higher levels in male adolescents.

The start of pubertal growth was recently established predominantly at 10 to 11 years in girls and at 12 to 13 years in boys in Catalonia, Spain.<sup>37</sup> These data are consistent with the ALP peak level observed in 10- to 13-year-old boys in our population, but not with the adolescent girls' results. Moreover, the peak observed in pubertal boys agrees in age with that observed in Chinese pediatric population<sup>10</sup> but differs from results by Zierk et al,<sup>8</sup> because in the German population ALP activity peaks later in males (13–15 years). Nevertheless, the median and maximum ALP activity in males, 264 and 488.5 U/L (50th and 97.5th percentiles, respectively) are consistent with the published German results.<sup>8</sup>

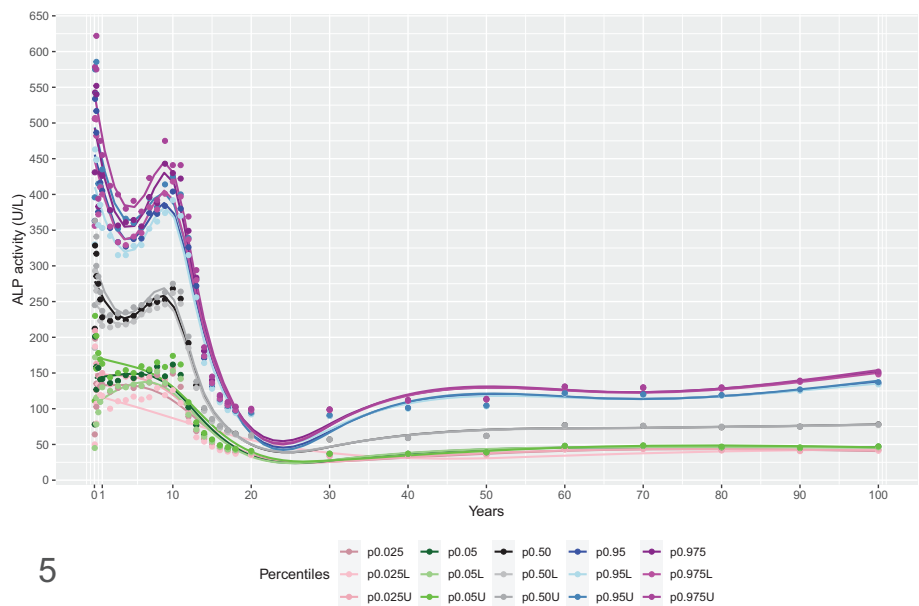
In females, in line with ALP activity in France,<sup>11</sup> there is not an increase in ALP activity at puberty. Strikingly, in females the maximum ALP peak reached was observed during the first year of life instead of at puberty. This observation is also consistent with data from Garnotel<sup>11</sup> in girls. Population-based studies

**Figure 4.** Alkaline phosphatase percentiles for males of all ages, showing the 2.5th, 5th, 50th, 95th, and 97.5th percentiles, with 95% CIs. The x-axis corresponds to age in years, and the y-axis shows the ALP activity expressed in U/L.

**Figure 5.** Alkaline phosphatase percentiles for females of all ages, showing the 2.5th, 5th, 50th, 95th, and 97.5th percentiles, with 95% CIs. The x-axis corresponds to age in years, and the y-axis shows the ALP activity expressed in U/L.



4



5

show a centennial decreasing trend in the age of onset of menarche among Spanish women.<sup>38–40</sup> Because serum ALP level showed marked differences between girls with precocious and normal puberty, with a significantly higher ALP activity in 5- to 8-year-old girls with precocious puberty than in age-matched girls with normal puberty,<sup>41</sup> we evaluate whether the lack of ALP increase levels in girls during puberty in our study could be related to an earlier menarche age. Despite the absence of pubertal ALP increase in females the median and maximum ALP activity in ages 10 to 13 years in girls (211 and 390 U/L respectively) is comparable to the German results (240 and 400 U/L).<sup>8</sup>

During adulthood, after the second decade of life, ALP activity remains stable until the eighth decade in men and the fifth decade in women, with higher levels in men from 20 to 49 years (p50: 73 U/L) than in women (65 U/L). An

inversion of this trend is observed from 50 to 80 years (ALP activity in males, 77 U/L; and in females, 82 U/L) that could be partially explained by the increase of markers of bone turnover in postmenopausal women. In other words, we have observed statistically significant differences between men and women, the average being higher in men between 20 and 49 years and in women between 50 and 80 years. A Turkish study demonstrates, along these lines, significantly higher total ALP activity in postmenopausal women than those in the premenopausal period.<sup>42</sup> Our data reinforced the positive correlation between plasma ALP and age described for both sexes<sup>43–45</sup> and are in agreement with previous series that also found consistently higher ALP activity in women older than 65 years than in men<sup>46</sup> and with reported ALP activity in postmenopausal Spanish women (mean  $\pm$  SD, 72  $\pm$  19 U/L).<sup>47</sup>

## CONCLUSIONS

ALP activity follows an age- and sex-dependent fluctuation with geographic differences that make it essential to have appropriate reference values for each population in order to allow a correct diagnostic interpretation and early diagnosis of diseases related to ALP abnormalities. Data tables of age- and sex-specific percentile values allow the incorporation of these results into laboratory information systems. This study provides data on normal ALP values in Spanish population, because it has been carried out with the largest number of samples published to date.

As a limitation of the study, we must point out that we could not exclude patients receiving drugs that could interfere physiologically or analytically in ALP measurements in the study population.

We thank Grupo Quirónsalud and MetabERN for their support in this study.

## References

1. Zaher DM, El-Gamal MI, Omar HA, et al. Recent advances with alkaline phosphatase isoenzymes and their inhibitors. *Arch Pharm (Weinheim)*. 2020;353(5):e2000011.
2. Vimalraj S. Alkaline phosphatase: structure, expression and its function in bone mineralization. *Gene*. 2020;754:144855.
3. Han L, Wang J, Zhang Q, et al. Development of reference intervals for serum alkaline phosphatase among adults in Southern China traced to the new IFCC reference measurement procedure. *Clin Chem Lab Med*. 2016;54(4):659–665.
4. Hofmann CE, Harmatz P, Vockley J, et al. Efficacy and safety of asfotase alfa in infants and young children with hypophosphatasia: a phase 2 open-label study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2019;104(7):2735–2747.
5. Whyte MP, Simmons JH, Moseley S, et al. Asfotase alfa for infants and young children with hypophosphatasia: 7 year outcomes of a single-arm, open-label, phase 2 extension trial. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2019;7(2):93–105.
6. Bianchi ML, Bishop NJ, Guanábens N, et al. Hypophosphatasia in adolescents and adults: overview of diagnosis and treatment. *Osteoporos Int*. 2020;31(8):1445–1460.
7. Ridefelt P, Gustafsson J, Aldrimer M, Hellberg D. Alkaline phosphatase in healthy children: Reference intervals and prevalence of elevated levels. *Horm Res Paediatr*. 2014;82(6):399–404.
8. Zierk J, Arzideh F, Haeckel R, et al. Pediatric reference intervals for alkaline phosphatase. *Clin Chem Lab Med*. 2017;55(1):102–110.
9. Fontes R, Cavalari E, Neto LV, et al. Alkaline phosphatase: reference interval transference from CALIPER to a pediatric Brazilian population. *J Bras Patol e Med Lab*. 2018;54(4):227–231.
10. Lü KL, Xie SS, Liu E, et al. Age-wise trends in alkaline phosphatase activity in 167,625 Chinese children aged 0–18 years. *Clin Biochem*. 2020;79:34–40.
11. Garnotel R. Valeurs de référence de la phosphatase alcaline en pédiatrie et variations physiopathologiques. *Ann Biol Clin*. 2020;78(6):604–608.
12. Gonzalez H, Imam Z, Wong R, et al. Normal alkaline phosphatase levels are dependent on race/ethnicity: NationalGEP Health and Nutrition Examination Survey data. *BMJ Open Gastroenterol*. 2020;7(1):1–4.
13. Schumann G, Klauke R, Canalias F, et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37°C, part 9: reference procedure for the measurement of catalytic concentration of alkaline phosphatase International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) Scientific Division, Committee on Reference Systems of Enzymes (C-RSE). *Clin Chem Lab Med*. 2011;49:14339–14346.
14. Strømme JH, Rustad P, Steensland H, Theodorsen L, Urdal P. Reference intervals for eight enzymes in blood of adult females and males measured in accordance with the International Federation of Clinical Chemistry reference system at 37°C: part of the Nordic Reference Interval Project. *Scand J Clin Lab Invest*. 2004;64(4):371–384.
15. Rustad P, Felding P, Franzson L, et al. The Nordic Reference Interval Project 2000: recommended reference intervals for 25 common biochemical properties. *Scand J Clin Lab Invest*. 2004;64(4):271–284.
16. Diemar SS, Møllehave LT, Qardon N, et al. Effects of age and sex on osteocalcin and bone-specific alkaline phosphatase—reference intervals and founders for two bone formation markers. *Arch Osteoporos*. 2020;15(1):1–10.
17. Ahmed S, Zierk J, Khan AH. Establishment of reference intervals for alkaline phosphatase in Pakistani children using a data mining approach. *Lab Med*. 2020;51(5):484–490.
18. Dortschy R, Schaffrath Rosario A, Scheidt-Nave C, et al. Bevölkerungsbezogene Verteilungswerte ausgewählter Laborparameter aus der Studie zur Gesundheit von Kindern und Jugendlichen in Deutschland (KiGGS) [Population-related distribution

values of selected laboratory parameters from the study on the health of German children and adolescents (KiGGS)]. *Robert-Koch-Institut (Hrsg)*. 2009;11–45.

19. Wanjian G, Jie H, Liang G, et al. Establishment of reference interval for alkaline phosphatase in healthy children of various ethnicities, aged 0–12 years. *Lab Med*. 2017;48(2):166–171.

20. Birk R, Heifetz EM. Variations in biochemical values for common laboratory tests: a comparison among multi-ethnic Israeli women cohort. *Ir J Med Sci*. 2019;188(1):249–258.

21. Colantonio DA, Kyriakopoulou L, Chan MK, et al. Closing the gaps in pediatric laboratory reference intervals: a caliper database of 40 biochemical markers in a healthy and multiethnic population of children. *Clin Chem*. 2012;58(5):854–868.

22. Gallo S, Comeau K, Sharma A, et al. Redefining normal bone and mineral clinical biochemistry reference intervals for healthy infants in Canada. *Clin Biochem*. 2015;47(15):27–32.

23. Adeli K, Higgins V, Seccombe D, et al. national survey of adult and pediatric reference intervals in clinical laboratories across Canada: a report of the CSCC Working Group on Reference Interval Harmonization. *Clin Biochem*. 2017;50(16–17):925–935.

24. Loh TP, Antoniou G, Baghurst P, Metz MP. Development of paediatric biochemistry centile charts as a complement to laboratory reference intervals. *Pathology*. 2014;46(4):336–343.

25. Prabha P, Al-Sulienan A, Olusi SO, Sugathan TN. Reference intervals for some serum biochemical markers of bone metabolism in Kuwait. *Clin Chim Acta*. 1996;249:67–75.

26. Marwaha RK, Khadgawat R, Tandon N, et al. Reference intervals of serum calcium, ionized calcium, phosphate and alkaline phosphatase in healthy Indian school children and adolescents. *Clin Biochem*. 2010;43(15):1216–1219.

27. Achila OO, Semere P, Andemichael D, et al. Biochemistry reference intervals for healthy elderly population in Asmara, Eritrea. *BMC Res Notes*. 2017;10(1):1–7.

28. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. 2022. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/>. Accessed October 8, 2023.

29. RStudio Team. RStudio: integrated development environment for R. 2015. <http://www.rstudio.com/>. Accessed October 8, 2023.

30. Cleveland WS. Robust locally weighted regression and smoothing scatterplots. *J Am Stat Assoc*. 1979;74(368):829.

31. Van Hoof VO, De Broe ME. Interpretation and clinical significance of alkaline phosphatase isoenzyme patterns. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 1994;31(3):197–293.

32. Schmidt T, Schmidt C, Amling M, Kramer J, Barvencik F. Prevalence of low alkaline phosphatase activity in laboratory assessment: is hypophosphatasia an underdiagnosed disease? *Orphanet J Rare Dis*. 2021;16(1):1–8.

33. Maman E, Borderie D, Roux C, Briot K. Absence of recognition of low alkaline phosphatase level in a tertiary care hospital. *Osteoporos Int*. 2016;27(3):1251–1254.

34. McKiernan FE, Dong J, Berg RL, et al. Mutational and biochemical findings in adults with persistent hypophosphatasemia. *Osteoporos Int*. 2017;28(8):2343–2348.

35. Alonso N, Larraz-Prieto B, Berg K, et al. Loss-of-function mutations in the *alpl* gene presenting with adult onset osteoporosis and low serum concentrations of total alkaline phosphatase. *J Bone Miner Res*. 2020;35(4):657–661.

36. Wang X, Liu L, Li P, et al. Reference and influential factors of serum bone markers in Chinese adolescents. *Sci Rep*. 2017;7(1):1–9.

37. Carrascosa A, Yeste D, Moreno-Galdó A, et al. Pubertal growth of 1,453 healthy children according to age at pubertal growth spurt onset: the Barcelona longitudinal growth study. *An Pediatr*. 2018;89(3):144–152.

38. Marrodán MD, Mesa MS, Aréchiga J, Pérez-Magdaleno A. Trend in menarcheal age in Spain: rural and urban comparison during a recent period. *Ann Hum Biol*. 2000;27(3):313–319.

39. Cabanes A, Ascunce N, Vidal E, et al. Decline in age at menarche among Spanish women born from 1925 to 1962. *BMC Public Health*. 2009;9:1–7.

40. Mendoza N, Galliano D, Salamanca A, et al. Lowering the age at menarche and risk of early menarche in a population of Spanish postmenopausal women during the past two decades. *Menopause Int*. 2010;16(3):111–114.

41. Jwa HJ, Yang SI, Lim HH. The difference in serum alkaline phosphatase levels between girls with precocious puberty and those with normal puberty. *Ann Pediatr Endocrinol Metab*. 2013;18(4):191.

42. Genç S, Ömer B, Aycan-Üstüoy E, Kumral A GF. Bone turnover markers and vitamin D status in postmenopausal Turkish women. *Int J Vitam Nutr Res*. 2012;82(1):27–33.

43. Sinton J, Cowley DM, Bryant J. Reference intervals for calcium, phosphate, and alkaline phosphatase as derived on the basis of multichannel-analyzer profiles. *Clin Chem*. 1986;32(1 pt 1):76–79.

44. Gordon T. Factors associated with serum alkaline phosphatase level. *Arch Pathol Lab Med*. 1993;117(2):187–190.

45. Negro MR, Martins MJ, Ramos E, et al. Fosfátase alcalina sérica humana e envelhecimento [Human serum alkaline phosphatase and ageing]. *Acta Med Port*. 2003;16:395–400.

46. Boyd JL, Delost ME, Holcomb JP. Calcium, phosphorus, and alkaline phosphatase values of elderly subjects. *Clin Lab Sci*. 1998;11(4):223–227.

47. Martínez J, Olmos JM, Hernández JL, et al. Bone turnover markers in Spanish postmenopausal women: the Camargo cohort study. *Clin Chim Acta*. 2009;409(1–2):70–74.

