



CASO CLÍNICO

Utilidad del estudio molecular de la hipercalcemia hipocalciúrica familiar; detección de una nueva mutación genética



Pilar Carrasco Salas^{a,*}, Ana Cía González^a, Álvaro Gragera Martínez^a,
Pilar Rodríguez Ortega^b, Antonio León Justel^a e Ignacio Vázquez Rico^a

^a Servicio de Análisis Clínicos, Hospital Juan Ramón Jiménez, Huelva, España

^b Servicio de Endocrinología, Hospital Juan Ramón Jiménez, Huelva, España

Recibido el 21 de febrero de 2017; aceptado el 17 de marzo de 2017

Disponible en Internet el 29 de abril de 2017

PALABRAS CLAVE

Hipercalcemia
hipocalciúrica
familiar;
Gen *CASR*;
Hiperparatiroidismo
primario;
Hiperparatiroidismo
neonatal grave;
Asesoramiento
genético

KEYWORDS

Familial hypocalciuric
hypercalcemia;
CASR gene;
Primary
hyperparathyroidism;

Resumen La hipercalcemia hipocalciúrica familiar representa una causa benigna de hipercalcemia de herencia autosómica dominante que no precisa normalmente tratamiento. Presentamos el caso de un varón de 21 años con perfil bioquímico típico de hipercalcemia hipocalciúrica familiar: hipercalcemia leve, niveles normales de PTH e hipocalciuria. Se solicitó el estudio genético del gen *CASR*, que objetivó en heterocigosis una variante no descrita previamente en la literatura. El padre, con hipercalcemia leve, también era portador de dicha variante.

Aunque se trata de una enfermedad sin repercusiones clínicas importantes, es de utilidad realizar la confirmación genética de la hipercalcemia hipocalciúrica familiar para diferenciarla del hiperparatiroidismo primario y para ofrecer un asesoramiento genético adecuado a los pacientes.

© 2017 AEBM, AEFA y SEQC. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Usefulness of molecular study of familial hypocalciuric hypercalcemia; detection of a new genetic mutation

Abstract Familial hypocalciuric hypercalcemia is a benign cause of hypercalcemia of autosomal dominant inheritance that does not normally require treatment. The case is presented on a 21 year-old male with a typical familial hypocalciuric hypercalcemia biochemical profile: mild hypercalcaemia, normal PTH levels, and hypocalciuria. A genetic study was requested on the

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: pcarrascos@gmail.com (P. Carrasco Salas).

Severe neonatal
hyperparathyroidism;
Genetic counselling

CASR gene, which showed a heterozygous variant not previously described in the literature. The father, with mild hypercalcaemia, was also a carrier of this variant.

Although it is a disease with no significant clinical repercussions, it is useful to perform genetic confirmation of familial hypocalciuric hypercalcemia to differentiate it from primary hyperparathyroidism and to provide adequate genetic counselling to patients.

© 2017 AEBM, AEFA y SEQC. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Presentación del caso clínico

Se trata de un varón de 21 años, hijo único de padres sanos y no consanguíneos, con síndrome de déficit de atención en tratamiento con metilfenidato y vitamina D, por déficit de 25-OH vitamina D. Es derivado a la consulta de endocrinología por presentar hipercalcemia crónica leve (calcio: 10,7 mg/dl; valores de referencia: 8,8-10,2 mg/dl). No hay antecedentes conocidos en la familia de hipercalcemia. En la analítica inicial, los valores de hormona paratiroidea (PTH) y de fósforo estaban dentro de rango: 39,2 pg/ml (valores de referencia 15-65: pg/ml) y 4 mg/dl (valores de referencia: 2,7-4,5 mg/dl), respectivamente. Se realizó ecografía de cuello, que no reveló agrandamiento de la glándula paratiroides, adenomas o tumores ectópicos. En la gammagrafía ósea tampoco se observaron anomalías.

Se solicitaron niveles de calcio y creatinina en orina de 24 h para valorar la excreción urinaria de calcio mediante el cociente aclaramiento de calcio/aclaramiento de creatinina (CCCR). Las concentraciones de calcio y creatinina en orina de 24 h fueron de 172 mg/24 h y 1,43 g/24 h, respectivamente, y el valor de CCCR obtenido de 0,007. El valor de CCCR, menor de 0,01, era indicativo de hipocalciuria.

Ante la presencia en el paciente de hipercalcemia leve, niveles de PTH normales e hipocalciuria, se le solicita consentimiento informado para realizar el estudio molecular de la hipercalcemia hipocalciúrica familiar (HHF).

Dado que la HHF se produce por mutaciones en el gen *CASR*, y que en la gran mayoría de casos se trata de alteraciones puntuales, se solicitó al laboratorio externo de referencia la secuenciación Sanger de dicho gen. La ampliación se realizó con cebadores específicos de las regiones codificantes y las regiones intrónicas flanqueantes de los 7 exones del gen (secuencia de referencia NM.001178065). Se observó que el paciente presentaba un cambio en heterocigosis consistente en la sustitución de guanina por timina en la posición 76 (c.76G > T) del ADN codificante, lo que conlleva a nivel proteico el cambio aminoacídico alanina por serina en el aminoácido 26 de la proteína (p.Ala26Ser). Este cambio no estaba descrito en las bases de datos que se consultaron (HGMD, ExAC, dbSNP, ClinVar). Además, las herramientas bioinformáticas utilizadas para predecir el efecto de la variante sobre la proteína (Polyphen2, SIFT) la catalogaban como patogénica. Se estudió la conservación del aminoácido 26 de la proteína que codifica el gen *CASR* en la base de datos PhyloP, y se vio que está muy conservado en vertebrados.

Aunque no ha sido descrito ningún cambio en este nucleótido del gen, sí hay descrito en un artículo en el que se comparan dos métodos para detectar mutaciones del gen *CASR*, un cambio en el segundo nucleótido de ese mismo codón (c.77C > G), en un paciente con HHF¹. Este cambio da lugar a la sustitución aminoacídica alanina por glicina (p.Ala26Gly) en el aminoácido 26 de la proteína. El análisis *in silico* del cambio c.77C > G (p.Ala26Gly) usando las mismas herramientas informáticas (Polyphen2, SIFT), lo cataloga también como probablemente patogénico. En el artículo no hay más información acerca de la patogenicidad de esta variante o de las características clínicas del paciente.

Para identificar si el cambio c.76G > T (p.Ala26Ser) identificado en nuestro caso índice, había sido heredado o se había producido *de novo*, se solicitó el estudio mediante secuenciación Sanger en los progenitores. Dicho estudio confirmó que la variante había sido heredada por vía paterna. Tras conocer este resultado, se realizó una analítica en el padre del caso índice, el cual mostraba una leve hipercalcemia (10,3 mg/dl) y PTH con valores dentro de rango (50,78 pg/ml). El estudio de la excreción de calcio en orina de 24 h no fue posible.

Estos datos indican que, en esta familia, el cambio detectado en el gen *CASR* segrega con la hipercalcemia leve identificada en dos de sus miembros. Por tanto, esta información, junto con los datos de conservación del aminoácido 26, los resultados del análisis *in silico* y el hecho de que se trate de una variante no descrita en base de datos como ExAC, que recoge la información genética de más 60.000 individuos, permitió clasificar a la variante c.76G > T (p.Ala26Ser) como variante probablemente patogénica y, por tanto, posiblemente causante de HHF.

Discusión

La HHF constituye una causa poco común de hipercalcemia; su prevalencia se estima que es de 1/78000 personas². Está causada por mutaciones en heterocigosis en el gen del receptor sensible al calcio (*CASR*, de sus siglas en inglés), localizado en el brazo largo del cromosoma 3³. Estas mutaciones disminuyen el número de receptores funcionantes en las células paratiroides y en el riñón, lo que las hace parcialmente resistentes al calcio, de forma que se requieren cantidades elevadas de este para disminuir la PTH y se reabsorbe calcio y magnesio en el riñón aun en presencia de hipercalcemia. La HHF cursa por tanto, con hipercalcemia

Tabla 1 Criterios actuales de indicación quirúrgica del HPTP asintomático. Cuarto taller internacional del HPTP asintomático (2013)

Nivel de calcio sérico	>1,0 mg/dl (0,25 mmol/litro) por encima del límite superior del rango normal
Renal	Aclaramiento de creatinina: <60 ml/min Calciuria en orina 24 h: > 400 mg/día (> 10 mmol/día), junto con riesgo óseo aumentado determinado por el análisis de los marcadores bioquímicos de remodelado óseo Presencia de nefrolitiasis o nefrocalcinosis mediante rayos x, ultrasonidos o TAC
Densidad mineral ósea	Densitometría: T score < -2,5 en columna lumbar, cadera, cuello de fémur, 1/3 distal de radio Fractura vertebral objetivada mediante rayos x, TAC, RMN, VFA
Edad	<50 años

RNM: resonancia magnética nuclear; TAC: tomografía axial computarizada; VFA: morfometría vertebral.

persistente, concentraciones inapropiadamente normales o a veces elevadas de PTH (20% de los casos) e hipocalciuria (CCCR < 0,01)^{4,5}.

La hipercalcemia en la HHF suele ser leve o moderada, no tiene consecuencias clínicas importantes y no requiere tratamiento. La importancia de realizar un diagnóstico de confirmación radica en distinguirla del hiperparatiroidismo primario (HPTP) leve asintomático, proceso mucho más común⁶. El tratamiento del HPTP asintomático consiste en tratamiento farmacológico con bifosfonatos, estrógenos-progestágenos, raloxifeno o calcinet, o en paratiroidectomía, ya que no se puede asegurar la estabilidad bioquímica y densitométrica de los pacientes⁷. Los criterios de cirugía en el HPTP asintomático se recogen en la [tabla 1](#)⁸.

Por tanto, si un paciente es diagnosticado erróneamente de HPTP puede ser sometido a un tratamiento inadecuado o innecesario⁹.

A nivel bioquímico, tanto la HHF como el HPTP, se caracterizan por hipercalcemia con niveles de PTH normales o elevados, pero se diferencian en la excreción renal de calcio. Entre los parámetros bioquímicos disponibles para evaluar la excreción renal de calcio, se considera al CCCR como índice de elección para distinguir entre ambas entidades⁹. El CCCR se calcula mediante la fórmula: calcio en orina de 24 h x creatinina sérica / calcio sérico x creatinina en orina, expresando todos los valores en mmol/l. Si es inferior a 0,01, es sugestivo de HHF, y si es mayor a 0,02, de HPTP. Sin embargo, en el rango entre 0,01 y 0,02, este cociente se ve limitado. Por ello, se recomienda establecer el punto de corte en 0,02, y realizar el estudio molecular del gen *CASR* solo en los pacientes con hipercalcemia, valores de PTH normales o elevados y CCCR menor de 0,02⁶.

Hay que tener en cuenta, no obstante, que las pruebas genéticas no son sensibles en el 100% de los casos. Hasta en

un 30% de las familias no se observan mutaciones en el gen *CASR*, lo que puede ser debido a la presencia de mutaciones en otras zonas no estudiadas (promotor, intrones, etc.), a una insuficiente capacidad de detección de las técnicas utilizadas, o bien, a la presencia de una mutación en otro gen diferente al gen *CASR*, no relacionado hasta la fecha con la HHF⁹.

En muchas ocasiones, hay que realizar además una evaluación cuidadosa de la historia familiar para ayudar a confirmar o a descartar el diagnóstico⁶. En nuestro paciente se identificó una variante no descrita en la literatura, y fue necesario el estudio de los progenitores para detectar que el padre, posteriormente diagnosticado de hipercalcemia leve asintomática, era también portador en heterocigosis de la variante. Los estudios de segregación, como el realizado en esta familia, ayudan a esclarecer la patogenicidad de las variantes encontradas en los estudios moleculares.

Las mutaciones en el gen *CASR* pueden afectar a un solo alelo (heterocigosis), en cuyo caso se genera el fenotipo característico de HHF o a los dos alelos, originando un hiperparatiroidismo neonatal grave (HPNG), una entidad rara que se caracteriza por hipercalcemia grave (> 15 mg/dl) desde el nacimiento, asociada a un hiperparatiroidismo importante. Las manifestaciones clínicas se inician durante el primer año de vida e incluyen distrés respiratorio, hipotonía, deformidades de la caja torácica, desmineralización ósea y fracturas múltiples. En la gran mayoría de los casos precisa paratiroidectomía; si esta no se realiza, la evolución puede ser fatal¹⁰. Los pacientes con HHF y una mutación en heterocigosis el gen *CASR* se consideran portadores asintomáticos del HPNG. Por tanto, el estudio genético del gen *CASR* es también importante para detectar portadores de esta forma neonatal grave. En el caso presentado, si el paciente quisiera tener descendencia, estaría recomendado el estudio completo del gen *CASR* en su pareja, para descartar que fuera portadora asintomática de la HPNG. En estos pacientes, está también indicado ofrecer el estudio prenatal del HPNG, dada la posibilidad de que se produzca una mutación *de novo* en el feto en el otro alelo del gen.

Conclusiones

Aunque la HHF representa una causa poco común de hipercalcemia, el estudio genético del gen *CASR*, el único relacionado hasta la fecha con la enfermedad, es recomendable para distinguirla del HPTP, cuyo tratamiento es diferente. Además, el estudio molecular ayuda a identificar a portadores del HPNG. En el caso clínico presentado, la secuenciación del gen *CASR*, permitió establecer el diagnóstico de HHF, evitar tratamientos innecesarios y ofrecer un asesoramiento genético adecuado en esta familia.

En muchas ocasiones, se detectan variantes de significado clínico incierto en las pruebas genéticas, y es necesario realizar estudios adicionales, como los estudios de segregación para tener más información de la patogenicidad de las variantes identificadas.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Bibliografía

1. Nissen PH, Christensen SE, Ladefoged SA, Brixen K, Heickendorff L, Mosekilde L. Identification of rare and frequent variants of the *CASR* gene by high-resolution melting. *Clinica Chimica Acta* 413. 2012;605–11.
2. Hinnie J, Bell E, McKillop E, Gallacher S. The prevalence of familial hypocalciuric hypercalcemia. *Calcif Tissue Int*. 2001;68:216–8.
3. Pollak MR, Chou YH, Marx SJ, Steinmann B, Cole DE, Brandi ML, et al. Familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism Effects of mutant gene dosage on phenotype. *J Clin Invest*. 1994;93:1108–12.
4. Firek AF, Kao PC, Heath H. Plasma intact parathyroid hormone (PTH) and PTH-related peptide in familial benign hypercalcemia: greater responsiveness to endogenous PTH than in primary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*. 1991;72:541–6.
5. Nissen PH, Christensen SE, Heickendorff L, Brixen K, Mosekilde L. Molecular genetic analysis of the calcium sensing receptor gene in patients clinically suspected to have familial hypocalciuric hypercalcemia: phenotypic variation and mutations spectrum in a Danish population. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92:4373–9.
6. Merino M, Vega B, Guijarro G, Navea C, Torán C, Civantos S. Hipercalcemia hipocalciúrica familiar: a veces no es lo que parece. *Rev Osteoporos Metab Miner*. 2015 7;1:20–2.
7. Albarrán J. Tratado de Endocrinología. Madrid: Ed. Panamericana. 2.ª ed. 2010.
8. Bilezikian JP, Brandi ML, Eastell R, Silverberg SJ, Udelsman R, Marcocci C, et al. Guidelines for the management of asymptomatic primary hyperparathyroidism: Summary Statement from the Fourth International Workshop. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99:3561–9.
9. Fernández López I, Fernández Peña I, Cózar León V, Viloria Peñas MM, Martínez de Pinillos Gordillo G, Tomé Fernández-Ladreda M, et al. Utilidad del estudio genético en la hipercalcemia hipocalciúrica familiar en familias con presentaciones clínicas atípicas. *Endocrinol Nutr*. 2011;58:325–30.
10. Pollak MR, Chou YH, Marx SJ, Steinmann B, Cole DE, Brandi ML, et al. Familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism effects of mutant gene dosage on phenotype. *J. Clin. Invest*. March. 1999;93:1108–12.